

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



**PRESENCIA DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR
EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Olivia del Carmen Santiago Puertas
Granada, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Olivia del Carmen Santiago Puertas
D.L.: GR 4244-2010
ISBN: 978-84-693-5984-6



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

Los que suscriben, D. José Gutiérrez Fernández, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Granada y Facultativo Especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves, D. Antonio Sorlózano Puerto, Profesor Ayudante Doctor del área de Microbiología de la Universidad de Granada y D. Óscar Fernández Fernández, jefe del Servicio de Neurología del Complejo Hospitalario Universitario Carlos Haya y Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga


CERTIFICAN:

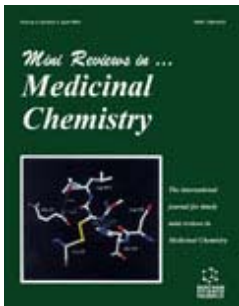
Que Dña. Olivia del Carmen Santiago Puertas, Licenciada en Biología, ha realizado el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "**Presencia del virus de Epstein-Barr en la Esclerosis Múltiple**", que ha sido realizado bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Granada, a 15 de Julio de 2010

Fdo: José Gutiérrez Fernández Fdo: Antonio Sorlózano Puerto Fdo: Óscar Fernández Fernández

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en:

| | | | | |
|--|--|--------------------------------|--|---------------------------|
| Autores: Santiago O, Gutiérrez J, Sorlózano A, Luna JD, Villegas E, Fernández O | | | | |
| Título: <i>Relation between Epstein-Barr virus and Multiple Sclerosis. Analytic study of scientific production</i> | | | | |
| Revista: European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases | | | | |
|  | Año: 2010 | Volumen (Nº): 29 (7) | Pág. inicial: 857 | Pág. final: 866 |
| | Ciudad: Heidelberg | País: Alemania | ISSN: 0934-9723 | Clave: Artículo |
| | Impacto (JCR): 2,605 | | Año: 2009 | Citas: |
| | Posición: 43 de 94 (T2/Q2) 25 de 57 (T2/Q2) | | Categoría: Microbiology Infectious Diseases | |

| | | | | |
|---|--------------------------------------|---------------------------------|---|---------------------------|
| Autores: Villegas E, Santiago O, Sorlózano A, Gutiérrez J | | | | |
| Título: <i>Epstein-Barr Virus: Novel Patented Therapeutics</i> | | | | |
| Revista: Mini-Reviews in Medicinal Chemistry | | | | |
|  | Año: 2010 | Volumen (Nº): 10 (10) | Pág. inicial: | Pág. final: |
| | Ciudad: Bussum | País: Holanda | ISSN: 1389-5575 | Clave: Revisión |
| | Impacto (JCR): 2,971 | | Año: 2009 | Citas: |
| | Posición: 14 de 46 (T1/Q2) | | Categoría: Chemistry, Medicinal | |

Al iniciar el desarrollo del presente trabajo, deseo expresar mi más sincera gratitud a todos aquellos que con su ayuda lo han hecho posible:

Al Dr. José Gutiérrez Fernández, por brindarme la posibilidad de realizar este proyecto en el Departamento de Microbiología, confiar en mí y dirigir esta Tesis con dedicación. Por todo lo que he aprendido trabajando a su lado, y por su apoyo en los momentos difíciles. Por ser una persona excepcional.

Al Dr. Antonio Sorlózano Puerto, por su apoyo incondicional en todo momento. Y por su saber hacer, su constancia y completa dedicación, que han sido un pilar fundamental en la consecución de este trabajo de investigación.

Al Dr. Oscar Fernández Fernández, por su dedicación y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A los tres gracias de corazón por hacer posible esta Tesis Doctoral.

A la Fundación Española de Esclerosis Múltiple y al grupo de investigación CTS-521, sin cuyo soporte económico hubiera sido imposible llevar a cabo el trabajo de experimentación.

Al Dr. Juan de Dios Luna del Castillo, por su estimable ayuda en los análisis estadísticos y sacar la máxima rentabilidad de los resultados del estudio, haciendo que esta parte del trabajo sea agradable y amena.

Mi gratitud al Dr. Miguel Guerrero Fernández, que siempre nos prestó la ayuda necesaria para la realización de este proyecto.

Al Dr. Enrique César Villegas Martínez, gracias por tu disposición, todo tu apoyo, tu ayuda y tus consejos. Al Dr. José Antonio Carrillo Ávila, por su apoyo en la parte experimental de esta Tesis.

A Elena y Pepi, técnicos del Departamento de Microbiología, por su ayuda y por estar siempre disponibles.

A mis colegas del CIBM y especialmente a mi compañera Leticia por sus ánimos incondicionales en todo momento, estoy segura que sin aquellas charlas interminables, probablemente no hubiera terminado esta Tesis.

A mi esposo, que ha compartido todos mis empeños en lo personal y lo profesional, llenando de alegría mis días y haciendo realidad mis ilusiones. Por la paciencia que demuestra día a día, al permitirme dedicar parte de nuestro tiempo, en mi realización personal y profesional. Sin ti esto no hubiera sido posible.

A mis padres, por educarme en el esfuerzo y la constancia como principio básico. A toda mi familia y amigos que han sabido comprender y perdonar la falta de dedicación que hacia ellos tuve durante el tiempo de este trabajo.

Pido perdón a todos aquellos que deberíais aparecer y no me he acordado, también os lo agradezco.

A la memoria de mi padre

A mi madre

A Roberto

ÍNDICE

| | Pág. |
|--|-------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Esclerosis múltiple | 3 |
| 1.1.1. Patogenia de la esclerosis múltiple | 3 |
| 1.1.2. Heterogeneidad clínica de la esclerosis múltiple | 10 |
| 1.1.3. Anatomía Patológica de las lesiones | 13 |
| 1.1.4. Epidemiología | 13 |
| 1.2. Virus de Epstein-Barr | 20 |
| 1.2.1. Biología general del virus | 21 |
| 1.2.2. Infección | 25 |
| 1.2.3. Latencia y persistencia | 28 |
| 1.2.4. Respuesta inmune frente al virus | 36 |
| 1.2.5. Epidemiología de la infección por el virus de Epstein-Barr | 40 |
| 1.2.6. Procesos clínicos relacionados con la infección por el virus de Epstein-Barr | 41 |
| 1.3. Asociación entre esclerosis múltiple y virus de Epstein-Barr | 46 |
| 1.3.1. Semejanzas epidemiológicas entre la mononucleosis infecciosa y la esclerosis múltiple | 46 |
| 1.3.2. Posibles mecanismos patogénicos que explican la relación entre la infección por el virus de Epstein-Barr y la esclerosis múltiple | 48 |
| 2. OBJETIVOS | 55 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODO | 59 |
| 3.1. Revisión bibliográfica | 61 |
| 3.1.1. Selección de los estudios | 61 |
| 3.1.2. Breve resumen del contenido de los estudios seleccionados | 66 |

| | Pág. |
|---|-------------|
| 3.2. Meta-análisis | 73 |
| 3.2.1. Recopilación de datos y obtención de la variable de resumen | 74 |
| 3.2.2. Evaluación de la heterogeneidad de los estudios | 75 |
| 3.2.3. Combinación de los resultados de los diferentes estudios | 76 |
| 3.2.4. Evaluación de la calidad de los estudios | 77 |
| 3.2.5. Software estadístico | 79 |
| 3.3. Estudio de casos y controles para determinar la posible relación entre infección por VEB y EM | 80 |
| 3.3.1. Pacientes y muestras | 80 |
| 3.3.2. Cálculo del índice de anticuerpos en LCR | 84 |
| 3.3.3. Determinación de la presencia de anticuerpos IgG anti-EBNA1 en suero y LCR | 86 |
| 3.3.4. Detección de ADN de VEB en LCR, suero y CMSP | 89 |
| 3.3.5. Método estadístico | 96 |
| 4. RESULTADOS | 97 |
| 4.1. Revisión bibliográfica y meta-análisis | 100 |
| 4.1.1. Estudios con determinación de IgG anti-VCA | 100 |
| 4.1.2. Estudios con determinación de IgG anti-complejo EBNA | 104 |
| 4.1.3. Estudios con determinación de IgG anti-EBNA1 | 106 |
| 4.1.4. Estudios con determinación de IgG anti-EA | 110 |
| 4.1.5. Estudios con determinación de IgM anti-EA | 112 |
| 4.1.6. Estudios con determinación de anticuerpos totales anti-VCA | 113 |
| 4.1.7. Estudios con determinación de IgG anti-VEB | 114 |

| | Pág. |
|--|-------------|
| 4.1.8. Estudios con determinación de anticuerpos heterófilos | 115 |
| 4.1.9. Estudios con determinación de ADN del virus de Epstein-Barr | 117 |
| 4.2. Detección de anticuerpos y ADN | 124 |
| 4.2.1. Producción intratecal de anticuerpos IgG específicos anti-EBNA1 | 124 |
| 4.2.2. Sensibilidad de la nested-PCR para la detección de ADN de VEB de VEB | 135 |
| 4.2.3. Detección de ADN de VEB mediante nested-PCR en suero, LCR y CMSP | 136 |
| 5. DISCUSIÓN | 145 |
| 5.1. Revisión sistemática y meta-análisis de la producción científica | 147 |
| 5.1.1. Asociación entre la detección de anticuerpos frente al virus de Epstein-Barr y riesgo de esclerosis múltiple | 147 |
| 5.1.2. Asociación entre la detección de ADN del virus de Epstein-Barr en sangre, LCR y tejido cerebral y riesgo de esclerosis múltiple | 156 |
| 5.2. Estudio de casos y controles | 159 |
| 5.2.1. Síntesis intratecal de anticuerpos | 159 |
| 5.2.2. Detección de ADN del virus de Epstein-Barr | 162 |
| 6. CONCLUSIONES | 165 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 169 |
| 8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA | 205 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- ACIF:** Inmunofluorescencia anti-complemento
- AH:** Anticuerpos heterófilos
- APC:** Célula presentadora de antígenos
- AR:** Artritis reumatoide
- BHE:** Barrera hemato-encefálica
- BO:** Bandas oligoclonales
- C:** Comparabilidad
- CM:** Células mononucleares
- CMSP:** Células mononucleares de sangre periférica
- CMV:** Citomegalovirus
- CNF:** Carcinoma nasofaríngeo
- CTLA-4:** Antígeno citotóxico de linfocito-4
- DE:** Desviación estándar
- dNTP:** Desoxirribonucleótido trifosfato
- DO:** Densidad óptica
- E:** Exposición
- EA/D:** Antígeno temprano difuso
- EA/R:** Antígeno temprano restringido
- EBNA:** Antígeno nuclear de VEB
- EIA:** Enzimoimmunoanálisis
- ELISA:** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- ELPT:** Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante
- EM:** Esclerosis múltiple
- EMPP:** Esclerosis múltiple primaria-progresiva
- EMPR:** Esclerosis múltiple progresiva-recurrente
- EMSP:** Esclerosis múltiple secundaria-progresiva
- EMRR:** Esclerosis múltiple remitente recurrente

ENA: Exacerbación no aguda

ENN: Enfermedad no neurológica

H: Hombre

HLA: "Human leukocyte antigen" (antígenos leucocitarios humanos)

IA: Índice de anticuerpos

IC: Intervalo de confianza

ICAM: Molécula de adhesión intracelular

IF: Inmunofluorescencia

IFD: Inmunofluorescencia directa

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IL: Interleucinas

INF: Interferón

IR: Repetición interna

LB: Linfoma de Burkitt

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LES: Lupus eritematoso sistémico

LFA: Antígeno asociado a la función linfocitaria

LNH: Linfoma no Hodgkin

M: Mujer

MGT: Media geométrica del título de anticuerpos

MI: Mononucleosis infecciosa

MMP: Metaloproteasas

MO: Medula ósea

MSIF: "Multiple Sclerosis International Federation" (Federación internacional de la esclerosis múltiple)

NC: No clasificado

NO: Neuritis óptica

n-PCR: Nested-PCR

OEN: Otras enfermedades neurológicas

OEND: Otra enfermedad no desmielinizante

OENI: Otra enfermedad neurológica inflamatoria

OENND: Otras enfermedades neurológicas no desmielinizantes

OENNI: Otra enfermedad neurológica no inflamatoria

OR: Odds ratio

ORF: "Open Reading frame" (fragmento abierto de lectura)

PCR: "Polymerase chain reaction" (reacción en cadena de la polimerasa)

PS: Plasma

RMN: Resonancia magnética nuclear

RT-PCR: "Real time-PCR" (PCR a tiempo real)

S: Selección

SDA: Síndrome clínico de desmielinización aislados

SMI: Sospecha de mononucleosis infecciosa

SNC: Sistema nervioso central

SR: Suero

TC: Tejido cerebral

TCR: Receptor de células T

TNF: Factor de necrosis tumoral

TR: Región terminal repetitiva

TT: Tratamiento

UI: Unidades internacionales

VCA: Antígeno de la cápside de VEB

VCAM: Molécula de adhesión vascular

VEB: Virus de Epstein-Barr

VHH-4: Herpesvirus humano tipo 4

VHH-6: Herpesvirus humano tipo 6

VHH-8: Herpesvirus humano tipo 8

VHS: Virus de herpes simple

VLA: Antígeno muy tardío

VVZ: Virus de la varicela zoster

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

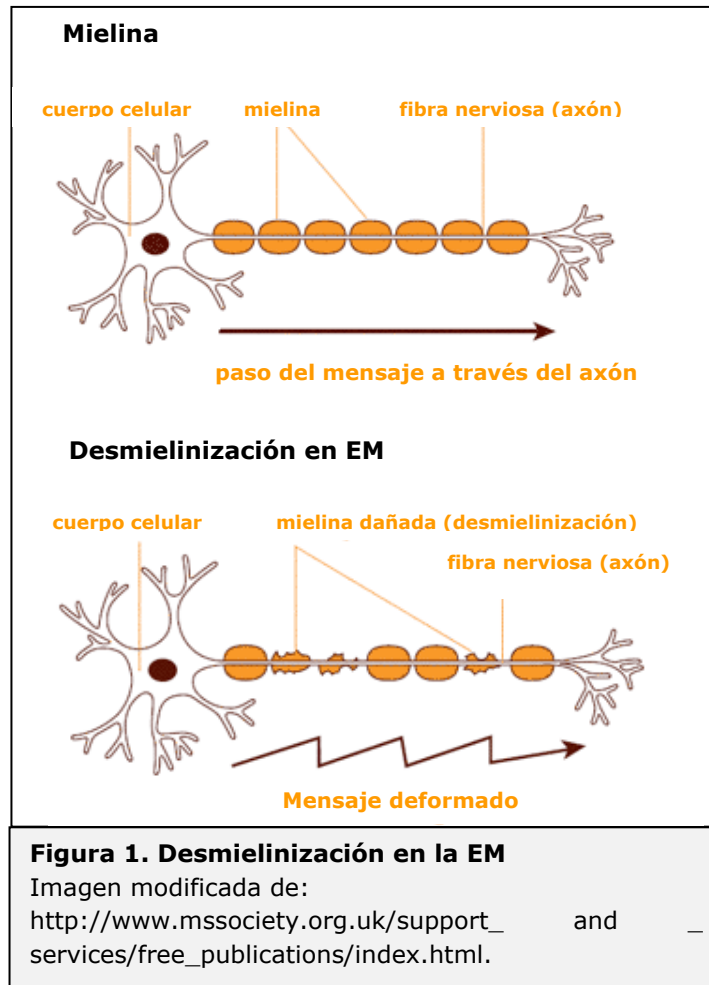
La esclerosis múltiple (EM) hace su aparición en los inicios del siglo XIX, aunque su reconocimiento oficial en la Neurología Clínica no tuvo lugar hasta 1860. Robert Carswell, en el año 1838, y Jean Cruveilhier, en 1841, describieron por primera vez algunas de las características que definen la enfermedad [Hickey, 1999], aunque las primeras descripciones clínicas y anatómicas detalladas, válidas hasta hoy, se atribuyen a Jean-Martin Charcot (1868). Fue uno de sus colaboradores, Alfred Vulpian, quien introdujo el término "esclerosis en placas", que aún se utiliza en la literatura francesa. Después fue llamada "esclerosis diseminada" y, posteriormente, se acuñó el término "esclerosis múltiple", que persiste en nuestros días [Noseworthy y cols., 2000].

Se trata de la enfermedad desmielinizante que más frecuentemente afecta al sistema nervioso central (SNC) y una de las causas más comunes de incapacidad neurológica en adultos jóvenes. Aunque no está totalmente aclarada, la patogenia de la enfermedad parece tener una base inmunológica en personas genéticamente susceptibles. Algunos factores, muchos de ellos aún desconocidos, desencadenan la activación del sistema inmunológico, produciendo un daño inflamatorio, seguido por una recuperación de la función y reparación estructural, gliosis post-inflamatoria y neurodegeneración.

Los síntomas de la EM son el resultado de la desmielinización, que lleva a una ralentización o bloqueo de la conducción nerviosa. Su curso clínico se caracteriza por episodios de recaídas (exacerbaciones o brotes) con recuperaciones o remisiones, seguidas en el tiempo por nuevos episodios que pueden dejar secuelas persistentes, y por un progreso de la discapacidad.

1.1.1. Patogenia de la esclerosis múltiple

La EM está clasificada como una enfermedad autoinmune [Chaudhuri y Behan, 2005], lo que implica que el sistema inmunológico ataca a la mielina que rodea las fibras nerviosas, dañándolas parcial o completamente y dejando cicatrices conocidas como lesiones, placas o esclerosis (figura 1). A veces, las mismas fibras nerviosas también resultan dañadas [Compston y Coles, 2002].



Por tanto, la lesión característica de la EM se localiza, predominantemente, en la mielina [Fernández y cols., 2005], tanto en el cerebro como en la médula espinal. Se caracteriza por desmielinización, daño axonal, pérdida de oligodendrocitos, gliosis e infiltración de células inmunitarias, que penetran en el SNC a través de la barrera hemato-encefálica (BHE), que ha perdido su impermeabilidad [Hickey, 1991a; Hickey, 1991b] y/o a través del plexo coroideo [Engelhardt y cols., 2001]. El daño perturba los mensajes al cerebro y a la médula espinal, pudiendo ralentizarse, distorsionarse, pasar de una fibra nerviosa a otra haciendo un cortocircuito, o no transmitirse en absoluto. También es frecuente observar remielinización con preservación relativa de los axones [Keirstead y Blakemore, 1999], y se piensa que, en parte, este proceso, que se produce tras el daño tisular, podría ser responsable de la recuperación de los síntomas clínicos.

Se han encontrado lesiones en el córtex cerebral [Peterson y cols., 2001], hipotálamo [Huitinga y cols., 2001], nervio óptico [Evangelou y cols., 2001], tronco cerebral [Bjartmar y cols., 2001] y médula espinal. La implicación de la sustancia gris en la EM es cada vez más conocida, demostrándose una clara conexión entre la aparición de disfunción cognitiva y la presencia de lesiones en la sustancia gris cortical, junto a la pérdida de volumen de ésta [Calabrese y cols., 2009; Roosendaal y cols., 2009].

1.1.1.1. Procesos inflamatorios en la esclerosis múltiple

La EM es una enfermedad mediada, principalmente, por células Th1 (CD4+), que aparecen, sobre todo, en las lesiones agudas de EM, donde hay una expresión anómala del antígeno leucocitario humano (HLA, *Human Leucocyte Antigens*) de clase II en macrófagos y astrocitos [Fernández y cols., 2005].

Aunque existen evidencias de presencia de otros tipos celulares en los infiltrados inflamatorios, como las células T citotóxicas (CD8+) [Babbe y cols., 2000; Booss y cols., 1983], algunos autores piensan que encontrar una población mayoritaria u otra depende del tiempo de evolución de la enfermedad. También se ha demostrado que el daño axonal se correlaciona mejor con el número de células T CD8+ que con el número de células T CD4+ [Kuhlmann y cols., 2002].

Existe, además, activación de células B, demostrada por la presencia de anticuerpos monoclonales que pueden ser identificados, en el SNC, como bandas oligoclonales (BO), pero que, en la EM, solamente representan síntesis local de inmunoglobulinas cuando no aparecen en el suero simultáneamente, o, si lo hacen, es en menor cantidad que en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Para la producción de estos anticuerpos es necesaria la participación de células Th2 [Berger y cols., 2003; Lindert y cols., 1999]. Las BO están dirigidas principalmente frente a los componentes mayores de la mielina, y frente a agentes infecciosos, aunque de forma inespecífica. Estos datos también justificarían que algunos tratamientos aplicados en la EM, en los que se pretendía un desvío de la respuesta Th1 a Th2, hayan provocado, sin

embargo, empeoramiento de la enfermedad [Coles y cols., 1999a; Coles y cols., 1999b].

Los mecanismos patogénicos que se suceden en el proceso inflamatorio en la EM son:

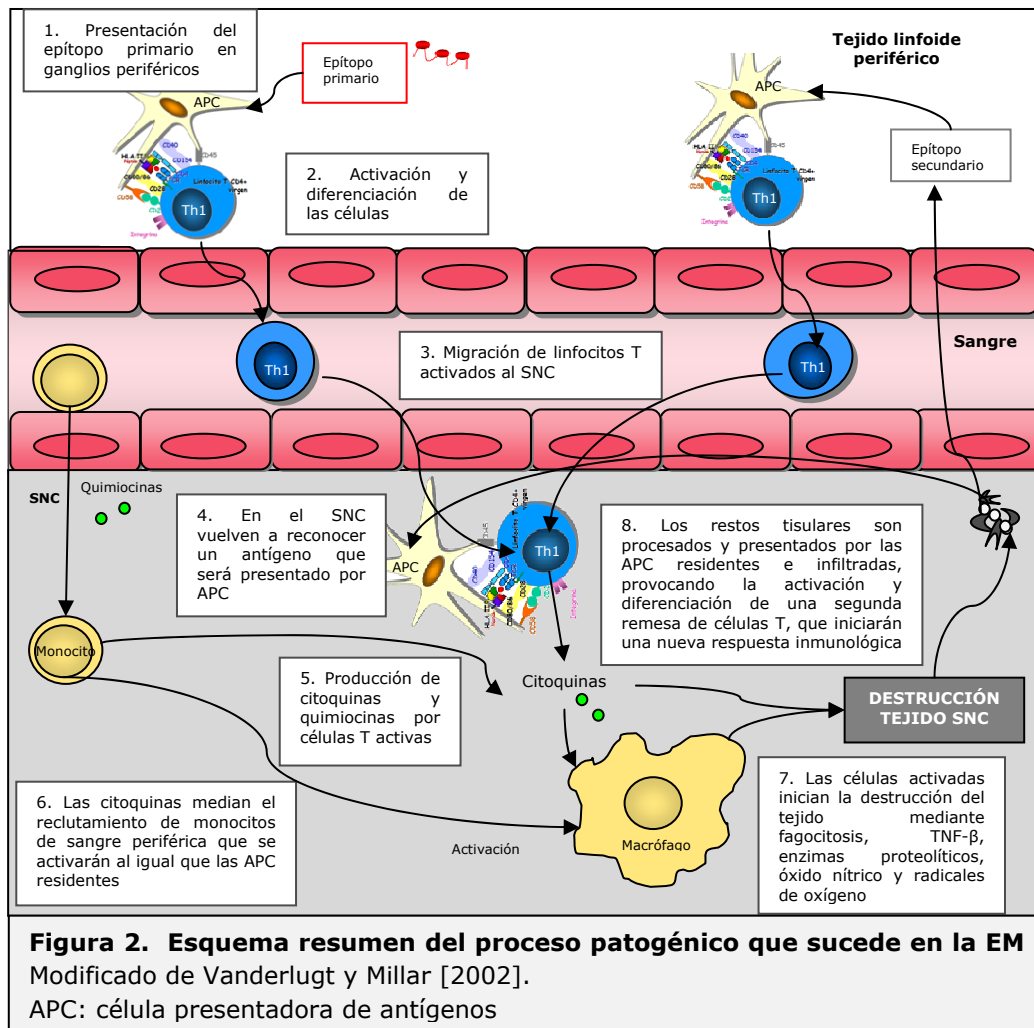
- Activación de las células T frente a componentes de la mielina
- Infiltración focal de células T y macrófagos en la sustancia blanca del SNC
- Participación de células B y respuesta humoral
- Respuesta inmune inespecífica
- Desmielinización y remielinización

1.1.1.2. Activación de células T específicas frente a antígenos de la mielina

No se conoce muy bien el origen de este proceso autorreactivo de las células T, pero se baraja la posibilidad de que intervengan varios factores, como una predisposición genética o la exposición a determinados factores ambientales, y, entre estos últimos, agentes infecciosos, que podrían inducir o mantener células T autorreactivas y que, tras un periodo de latencia de 10 a 20 años, serían activadas sistémica o localmente (figura 2). Aunque no se conoce bien cómo se produce esta activación, una posibilidad podría ser la respuesta frente a epítomos compartidos por la mielina y posibles antígenos infecciosos, es decir, por un proceso de mimetismo molecular entre ambos [Albert e Inman, 1999; Bray y cols., 1992a; Fujinami y Oldstone, 1985; Gran y cols., 1999; Liblau y Fontaine, 1998; Lünemann y cols., 2008].

Las células T, una vez activadas, producen citoquinas como Interferón gamma (IFN- γ), Factor de Necrosis Tumoral alfa o beta (TNF- α/β) o Interleuquina-1 (IL-1), que provocan en las células endoteliales, a su vez, la expresión de Moléculas de Adhesión Endotelial como E-selectina, Moléculas de Adhesión Intracelular (ICAM-1) o Moléculas de Adhesión Vascular (VCAM-1) [Dore-Duffy y cols., 1993], que mediarían la extravasación de las células inflamatorias al SNC a través de la BHE. En este sentido, se ha descrito un

aumento de la concentración de moléculas ICAM-1 durante los brotes de la enfermedad, asociado a un aumento del número de lesiones detectadas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [Giovannoni y cols., 1997; Hartung y cols., 1995; Rieckmann y cols., 1997; Rieckmann y cols., 1998].



1.1.1.3. Penetración de los linfocitos en el SNC y reclutamiento de células del sistema inmune

El proceso no se conoce exactamente, aunque está ampliamente estudiado [Archelos y cols., 1998; Gordon y cols., 1995; Kanwar y cols., 2000a; Kent y cols., 1995; Yednock y cols., 1992]. La adhesión de linfocitos y monocitos al endotelio tiene lugar en las vénulas, donde el flujo sanguíneo es menor. La adherencia y migración están mediadas, como hemos visto, por

moléculas de adhesión expresadas tanto en la superficie de los linfocitos, como de las células endoteliales.

Las selectinas endoteliales establecen enlaces débiles con ligandos leucocitarios, haciendo que los linfocitos “rueden” sobre la pared vascular. Este deslizamiento favorece el cambio conformacional del linfocito y la activación de las integrinas leucocitarias, como LFA-1 y VLA-4, que se unirán a ICAM-1 y VCAM-1 mediante enlaces estables [Archelos y cols., 1999; Kanwar y cols., 2000b]. El proceso también demanda la actuación de otras moléculas de adhesión y la producción de proteasas que degraden la matriz extracelular, como las metaloproteasas de la matriz o MMPs (gelatinasa A o MMP-2 y gelatinasa B o MMP-9) [Trojano y cols., 1999; Waubant y cols., 1999]. Todo ello permite que se produzca la extravasación de las células inmunitarias a través del endotelio.

Una vez pasada la BHE, y en el interior del SNC, los linfocitos son expuestos de nuevo a su auto-antígeno e inician una reacción inflamatoria mediada por células Th1 [Merril, 1992] que comienzan a producir citoquinas pro-inflamatorias como el IFN γ , el TNF α , IL-1, IL-2 e IL-12 y quimiocinas que inducen la proliferación clonal de las células T, y que permiten un segundo reclutamiento de células inflamatorias como macrófagos y células de la microglía, facilitado por un aumento de la permeabilidad de la BHE.

Después de la intervención de las células T, como precursoras del proceso inflamatorio, y debido al mal funcionamiento de la BHE, las células B, los anticuerpos y los factores del complemento pueden pasar al SNC participando también en la respuesta inmunológica.

1.1.1.4. Papel de la inmunidad humoral en la esclerosis múltiple

El papel de las células B en la EM no está muy claro, aunque existen evidencias científicas que indican su participación, como la existencia de síntesis intratecal de IgG, presencia de células B en las lesiones activas de EM en las que existe desmielinización, e inducción de mecanismos efectores mediados por anticuerpos en estas lesiones. Todo esto hace pensar que estas

células productoras de anticuerpos deben tener alguna influencia en el desarrollo de la enfermedad.

Los antígenos, propios y extraños, pueden activar las células B, ya sea inducidos por citoquinas inflamatorias o por super-antígenos. La presencia característica de BO en el LCR de pacientes con EM indica que estas células B son clonales [Qin y cols., 1998; Sharief y Thompson, 1991; Walsh y Tourtellotte, 1986; Zipoli y cols., 2009].

1.1.1.5. Respuesta inmune inespecífica

El sistema inmune innato también contribuye dañando los oligodendrocitos por mecanismos moleculares independientes de receptor como el estrés oxidativo producido por proteínas cinasas, la presencia de radicales libres, de óxido nítrico y TNF α [Rejdak y cols., 2008] y mediante mecanismos dependientes de receptor, mediados por receptores de muerte celular (miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral), que provocan apoptosis de oligodendrocitos y fenómenos de desmielinización [Fernández y cols., 2005].

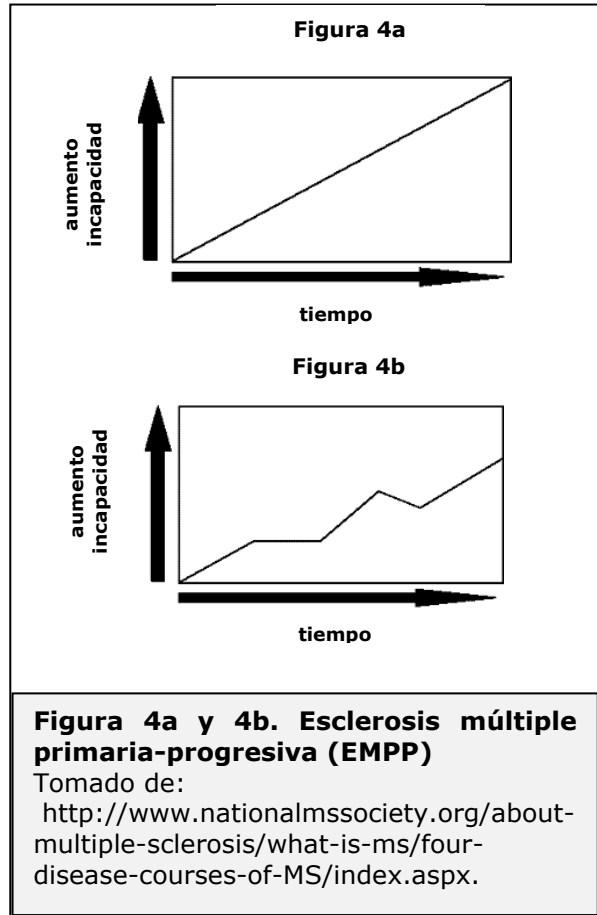
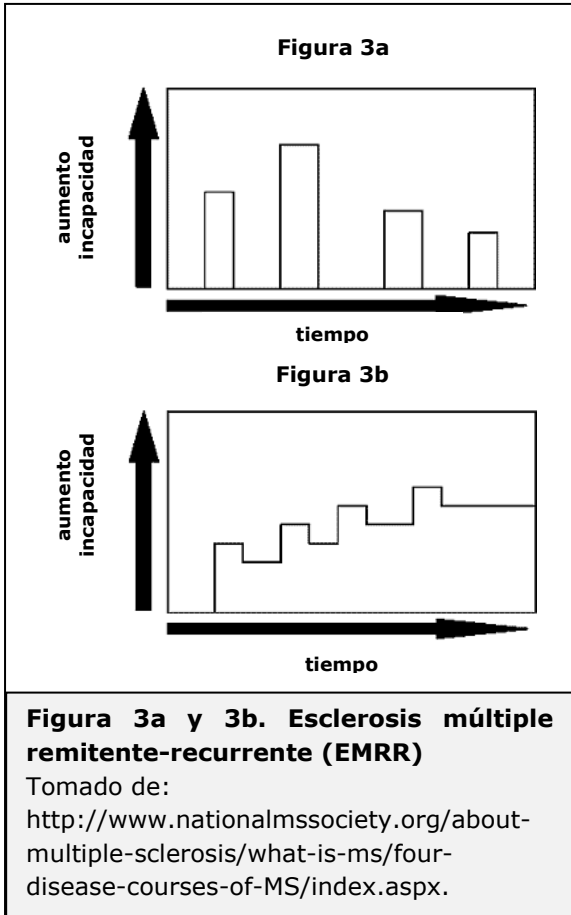
1.1.1.6. Desmielinización y remielinización

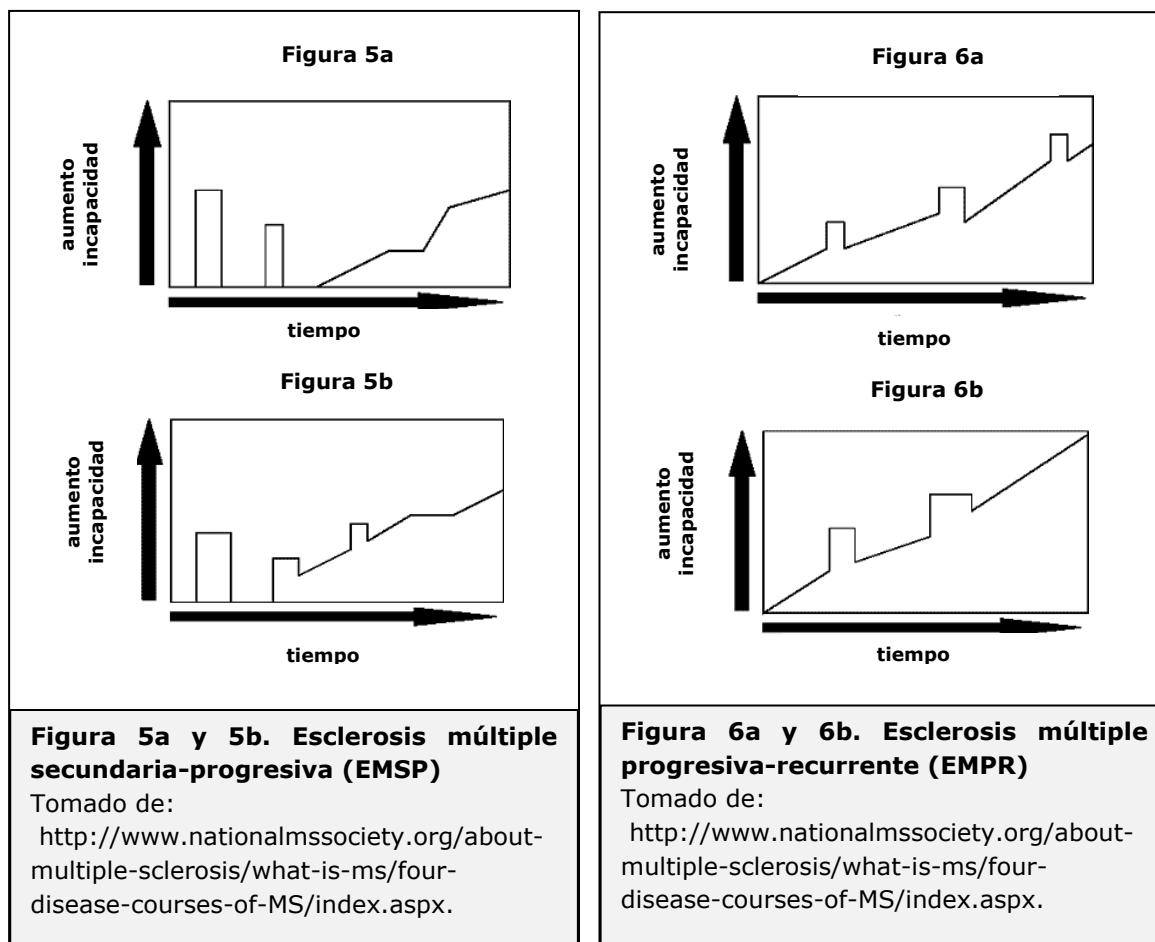
Henderson y cols. [2009], encontraron que la pérdida temprana de oligodendrocitos es una característica en los tejidos con lesiones de rápida expansión de EM. La actividad de los macrófagos en éstos es, en gran medida, una respuesta innata de depuración de los restos de muerte y degeneración de la mielina. Sin embargo, a pesar de todos los datos que indican que el proceso inflamatorio es necesario para la desmielinización en la EM, también existen datos que indican que ésta puede producirse con independencia de este proceso. La respuesta inmune adaptativa se observa principalmente en el tejido recientemente mielinizado, que pueden mostrar signos de regeneración de oligodendrocitos. Esto sugiere que la formación de placas debe tener otro origen diferente a la destrucción mediada por la respuesta inmune de células dirigido frente a un antígeno de la mielina.

1.1.2. Heterogeneidad clínica de la esclerosis múltiple

Esta patología es imprevisible y varía enormemente. El paciente puede presentar periodos agudos, de exacerbación o brotes (aparecen nuevos síntomas o los ya existentes se agravan), fases estables o periodos de remisión (los síntomas mejoran o desaparecen) [Lublin y Reingold, 1996]. Normalmente, la EM sigue uno de los cuatro cursos siguientes:

- **Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente (EMRR):** Está definida por la presencia de exacerbaciones claras (brotes) con posterior recuperación completa (figura 3a) o parcial (figura 3b). Los períodos entre los brotes se caracterizan por la ausencia de progresión de la enfermedad. A medida que se repiten estos brotes van dejando secuelas funcionales neurológicas. Es la forma de presentación en el 90% de los pacientes.
- **Esclerosis Múltiple Primaria-Progresiva (EMPP):** Se trata de una enfermedad progresiva desde su inicio (figura 4a), con posibilidad, en ocasiones, de estacionarse, e incluso presentar mejoría (figura 4b). Aparece en el 10% de los sujetos enfermos.
- **Esclerosis Múltiple Secundaria-Progresiva (EMSP):** Inicialmente se presenta como una forma RR seguida de una forma progresiva (figura 5a) que, ocasionalmente, puede presentar recaídas, remisiones o estabilizaciones (figura 5b). Se ha estimado que la proporción de pacientes con EMRR que evolucionan a EMSP es del 50% al cabo de 10 años, desde el inicio de la enfermedad.
- **Esclerosis Múltiple Progresiva-Recurrente (EMPR):** Es una enfermedad progresiva desde su inicio, con claras recaídas, tras las cuales, a veces, se consigue recuperación completa (figura 6a) y otras veces no (figura 6b). Los períodos entre brote y brote se caracterizan por una continua progresión de la enfermedad. Su frecuencia aproximada es del 5%.





Los síntomas dependen de las áreas del SNC que estén afectadas, variando entre diferentes personas, pero también en una misma persona y según el momento. Además, pueden variar en gravedad y duración. No existen manifestaciones clínicas típicas de EM. Un paciente puede experimentar más de un síntoma, pero no todas las personas van a experimentar todos los síntomas existentes.

Los síntomas más frecuentes son: debilidad, parestesias, falta de coordinación motora, fatiga, problemas de equilibrio, ataxia, alteraciones visuales, temblor, espasticidad, trastornos del habla, alteraciones del sistema nervioso autónomo, problemas en la función sexual, problemas de memoria y trastornos cognitivos, entre otros [Betts y cols., 1993; Iriarte y cols., 2000; Rao y cols., 1991].

1.1.3. Anatomía Patológica de las lesiones

Existe una clasificación de los patrones anatomo-patológicos característicos de las lesiones en la EM [Bruck y Stadelmann, 2005; Kornek y Lassmann, 2003; Lucchinetti y cols., 2000; Lucchinetti y cols., 1996; Storch y Lassmann, 1997]:

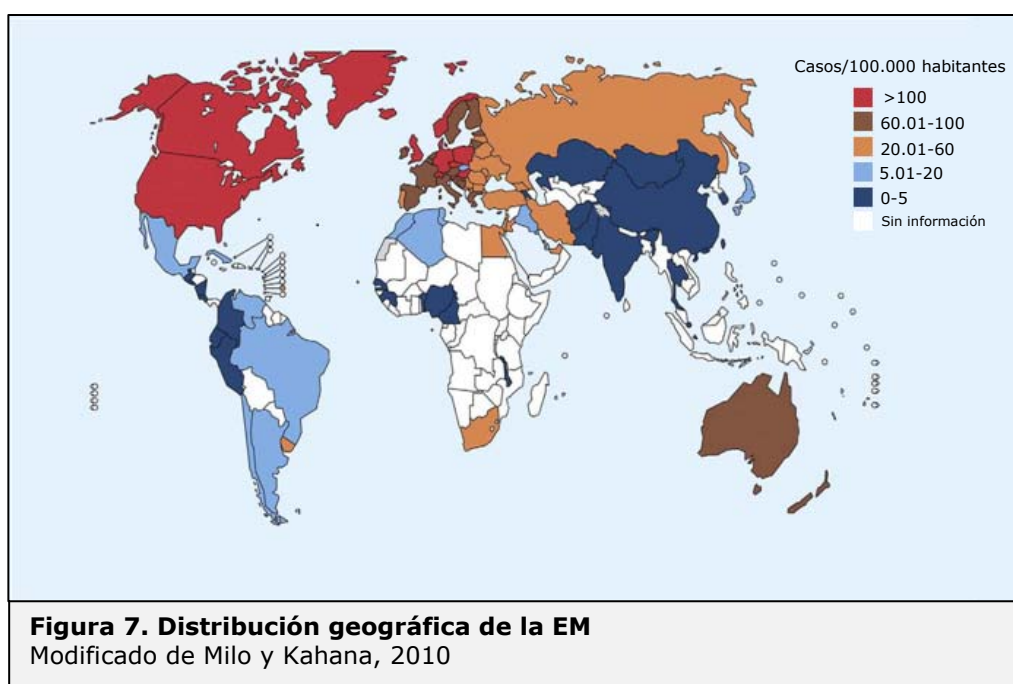
- **Patrón I y II:** Está definido por la presencia de lesiones que asemejan una encefalomiелitis autoinmunitaria. Muestran desmielinización activa periventricular, con infiltrados inflamatorios de células T y macrófagos, con relativa preservación de los oligodendrocitos y remielinización concomitante. El patrón II, el más frecuente, presenta depósitos de inmunoglobulinas, principalmente IgG, y de factores del complemento. Ambos patrones están presentes en todos los grupos clínicos.
- **Patrón III:** Se caracteriza por desmielinización e infiltrados de células T y macrófagos, pero lo más característico es la muerte por apoptosis de los oligodendrocitos en el borde activo de la lesión. También presenta una pérdida importante de la glucoproteína asociada a mielina. Aparece en las formas agudas de la enfermedad.
- **Patrón IV:** Se caracteriza por un infiltrado de linfocitos T, macrófagos y muerte de oligodendrocitos sin signos de apoptosis. No existe remielinización y es típico de la EMPP.

1.1.4. Epidemiología

A través de los datos recopilados por la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple (MSIF, *Multiple Sclerosis International Federation*), actualizados hasta el año 2008, se observa que ésta es la enfermedad neurológica crónica más frecuente en adultos jóvenes en Europa y Norteamérica. Medida en tasa de prevalencia (número de casos vivos por cada 100.000 habitantes), la distribución de la EM a lo largo del mundo es irregular, pues se detectan prevalencias mayores entre los 40 y 60 grados de latitud norte, con un fenómeno similar en el hemisferio sur.

Las diferentes zonas geográficas se pueden clasificar, según Kurtzke [1995], en zonas de alto riesgo (más de 100 casos/100.000 habitantes), medio (50-100 casos/100.000 habitantes) y bajo (menos de 50 casos/100.000 habitantes) (figura 7). El número de individuos afectados a nivel mundial es de, aproximadamente, 1.600.000. Según los datos de MSIF, en Europa, las prevalencias más altas se encuentran en Hungría, con 176 casos/100.000 habitantes, Eslovenia, con 151 casos/100.000 habitantes, Alemania, con 149 casos/100.000 habitantes, República Checa, con 130 casos/100.000 habitantes, Noruega, con 125 casos/100.000 habitantes, Dinamarca, 122 casos/100.000 habitantes y Reino Unido e Islandia, con 110 casos/100.000 habitantes. En Estados Unidos y Canadá la prevalencia es de 135 casos/100.000 habitantes y 132 casos/100.000 habitantes, respectivamente.

España es una zona de riesgo medio, con una prevalencia de 59 casos/100.000 habitantes, con un total de 40.000 afectados y una incidencia de 3,8 casos nuevos/100.000 habitantes/año.



1.1.4.1. Factores genéticos relacionados con la esclerosis múltiple

Diversos estudios epidemiológicos y demográficos han encontrado relación entre determinados factores genéticos y la iniciación y/o perpetuación de la EM [Chataway y cols., 2001; Ebers y cols., 1995; Sadovnick y cols., 1997; Weinschecker y Rodriguez, 1994].

En estudios familiares se ha comprobado que el riesgo absoluto de que un familiar de primer grado padezca la enfermedad es entre 20 y 40 veces superior al de la población general. Además, aproximadamente en el 5% de los gemelos dicigóticos y en torno al 25% de los monocigóticos, ambos individuos presentan la enfermedad [Ebers y cols., 1995; Risch, 1992; Sadovnick y cols., 1996; Sadovnick y cols., 1993].

La edad materna o paterna avanzada se asocia con la aparición de diversas enfermedades en la descendencia, incluyendo anomalías cromosómicas y trastornos que se manifiestan en la edad adulta; sin embargo, estudios en este sentido no han encontrado ninguna asociación entre la edad de los padres y el riesgo de EM [Ramagopalan y cols., 2009].

En estudios genéticos sobre población caucásica, realizados mediante barridos genómicos, se ha demostrado que determinados alelos del HLA de clase II, principalmente DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102, DQB1*0602 confieren susceptibilidad para desarrollar EM [Baranzini y cols., 2009; Ebers y cols., 1996; Epplen et al., 1997; Haines y cols., 1996; Kuokkanen y cols., 1996; Okuda y cols., 2009]. Aparte de esta región, algunos estudios han identificado otros genes implicados en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, entre los que destacan la región de la cadena β del receptor de la célula T (TCR) en el cromosoma 7 [Hockertz y cols., 1998, Martínez-Naves y cols., 1993, Wood y cols., 1995].

También estudios étnicos han permitido establecer la existencia de una susceptibilidad racial, siendo la raza blanca o caucásica la más predispuesta a padecer esta enfermedad. Se ha comprobado que existen poblaciones aparentemente resistentes al desarrollo de EM como los lapones, maoríes de Nueva Zelanda, indios de Norteamérica, huteritas de Saskatchewan (Canadá), gitanos húngaros, etc. [Weinshenker, 1996].

1.1.4.2. Factores ambientales relacionados con la esclerosis múltiple

Existe una clara diferencia en la prevalencia de la enfermedad según la latitud. Las cifras de mayor prevalencia aparecen entre los 40 y 60 grados de latitud norte, y ocurre algo similar en el hemisferio sur [Kurtzke, 1995; Weinshenker, 1996; Wingerchuk y Weinshenker, 2000]. Aunque esta variación geográfica no está muy clara, podría explicarse, pero sólo en parte, por la dotación genética característica de los habitantes de cada área geográfica. Los factores geo-climáticos que parecen relacionarse con la EM son los climas fríos, y en relación con éstos la humedad, la lluvia, el suelo de turba y las coníferas.

Se ha encontrado relación con la ingestión de grasa animal, carne, productos de granja, presencia de fábricas de papel y de disolventes orgánicos. También en varios estudios se ha relacionado con el contacto con perros o el consumo de tabaco [Fernández y cols., 2005].

Se han descrito focos y epidemias, lo que apoya la existencia de un factor ambiental que sería imprescindible para explicar dichos cambios epidemiológicos [Kurtzke, 1995; Kurtzke y cols., 1982; Kurtzke y cols., 1986].

La susceptibilidad a la EM también puede verse afectada por la emigración, cuando ésta se realiza en edades críticas, sobretudo durante la pubertad. Se ha demostrado que la susceptibilidad que poseen los descendientes de emigrantes varía respecto a sus progenitores [Weinshenker, 1996].

Un factor ambiental que se ha considerado clásicamente muy importante es la exposición a agentes infecciosos durante la infancia-adolescencia. Durante las últimas décadas, se ha postulado que diferentes agentes patógenos como retrovirus, herpesvirus, coronavirus y bacterias como *Chlamydomphila pneumoniae*, podrían ser un factor etiológico importante en la patogenia de la EM [Alvarez-Lafuente y cols., 2009, Atkins y cols., 2000; Ascherio y cols., 2001; Cermelli y Jacobson, 2000; Krone y cols., 2008; Levin y cols., 2003; Monteyne y cols., 1998; Munger y cols., 2003; Oger, 2007; Rasmussen y cols., 1993; Sunström y cols., 2004; Villoslada y cols., 2003;

Yeh y cols., 2004]. Entre las hipótesis que implican a los microorganismos en la patogenia de la EM, nos encontramos:

- **Hipótesis higiénica:** Según ésta el contacto o infección durante la infancia con el agente infeccioso causante de la EM, protegería frente a la misma, pero el contagio tardío con el mismo agente, debido a un exceso en las costumbres higiénicas en la sociedad, sería responsable de la enfermedad. La idea inicial que asoció la EM con un exceso de higiene apareció en 1966 en Israel [Leibowitz y cols., 1966]. Otros autores, por el contrario, opinan que esta hipótesis no explica aquellos casos de enfermos que no han tenido contacto con el virus [Ascherio, 2008].
- **Hipótesis de Kurtzke** o hipótesis de prevalencia: Ésta se basa en un estudio epidemiológico realizado en las Islas Feroe en el que se postula que la EM está causada por un patógeno que es más común en regiones de alta frecuencia de EM. Según este autor el patógeno estaría generalizado, y en la mayoría de los individuos causaría enfermedad asintomática [Kurtzke, 1993].

En ambos supuestos se ha implicado a más de 14 agentes infecciosos [Ascherio y Munger, 2007, Giovanni y Ebers, 2007], siendo la familia *Herpesviridae* la más estudiada (tabla 1). En este sentido, han sido muchas las evidencias que han relacionado la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB) y la EM.

Tabla 1. Seroprevalencia de la familia *Herpesviridae* en la esclerosis múltiple

| Virus | <i>α-Herpesvirus</i> | | | <i>β-Herpesvirus</i> | | | <i>γ-Herpesvirus</i> | |
|--|----------------------|-------|------|----------------------|-------|-------|----------------------|-------|
| | VHS-1 | VHS-2 | VVZ | CMV | HVH-6 | HVH-7 | VEB | HVH-8 |
| Asociación con EM | Sí | - | Sí | No | Sí | No | Sí | No |
| Seroprevalencia en EM | 70% | - | >99% | 50% | >90% | - | >90% | - |
| Seroprevalencia en población adulta | 70% | 50% | >99% | 50% | >85% | >85% | >90% | <5% |

Los datos de seroprevalencia están referidos a población adulta del oeste de Europa y EEUU. VHS: virus del herpes simple; VVZ: virus de la varicela-zoster; CMV: citomegalovirus; HVH: herpesvirus humano; VEB: virus de Epstein-Barr
Modificado de Christense, 2007

1.1.4.3. Otros factores moduladores

La EM afecta a todas las edades, pero la mayoría de los pacientes desarrollan los síntomas entre los 18 y 50 años, siendo rara su aparición antes de los 10 y después de los 60, aunque, cuando se diagnostica en niños, se da con mayor frecuencia entre los 10 y 18 años. Sólo entre el 0,2% y el 0,7% de enfermos son diagnosticados antes de los 10 años [Ruggieri y cols., 1999; Sluder y cols., 2002]. La prevalencia de EM en edades infantiles es de aproximadamente 1-4% de todos los casos de EM [Yeh y cols., 2009]. Según la MSIF, en España la media de edad al diagnóstico es de 30 años, mientras que en Estados Unidos está en torno a los 32, en Canadá sobre los 24 y en Italia a los 25.

Afecta con mayor frecuencia a mujeres que a varones. El ratio en España entre hombres y mujeres es de 1:2,25, mientras que en Australia es 1:3 ó en Estados Unidos 1:2,60. Este hecho también ha sido descrito en otras enfermedades autoinmunes [Vyse y Todd, 1996; Whitacre, 2001] y se ha relacionado con diferencias en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipofisario-glándula adrenal entre ambos sexos [Dowdell y cols., 1999; Morale y cols., 2001; Voskuhl, 2002; Voskuhl y Palaszynski, 2001]. Se ha observado que, durante el embarazo, el número de brotes clínicos de la enfermedad está significativamente reducido, mientras que poco después del parto aumenta el riesgo de presentar un brote clínico [Vukusic y cols., 2004]. Este hecho explicaría también una influencia importante de las hormonas en la patogenia de esta enfermedad.

En un estudio reciente, realizado en un grupo de mujeres en Estados Unidos, también se observó que la obesidad en las mujeres durante la adolescencia está asociada con un mayor riesgo de desarrollar EM [Munger y cols., 2009].

El estrés también se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad [Mason, 1991; Morale y cols., 2001].

Desde hace tiempo, se ha sugerido que el déficit de vitamina D podría tener un papel importante en la patogenia de la EM [Baas y cols., 2000; Brown y cols., 2003; Pierrot-Deseilligny, 2009; Stumpf y cols., 1982].

Característicamente, los enfermos con EM presentan niveles bajos de vitamina D [Hiremath y cols., 2009], y algunos autores han asociado este defecto a una baja exposición al sol durante la infancia [Dickinson y cols., 2009; Tremlett y cols., 2008]. Un estudio reciente [Correale y cols., 2009] comparó los niveles de vitamina D entre pacientes con EM y controles y su efecto *in vitro* sobre las células T. Los autores hallaron niveles más bajos de vitamina D en pacientes que estaban padeciendo un brote y dedujeron que la vitamina D parecía influir en la proliferación de células T reguladoras, de efecto beneficioso. En mujeres también se han relacionado los niveles elevados de 25-hidroxi-vitamina D con menor incidencia de EM y con una enfermedad menos grave [Kragt y cols., 2008]. Sin embargo, en el trabajo de Holmoy y cols. [2009] no se encontró significación a esta relación, sugiriendo que la vitamina D no tiene un impacto tan importante en la actividad de la enfermedad.

En definitiva, los agentes ambientales podrían actuar en diferentes estadios, de forma competitiva o complementaria: podrían influir en la adquisición de la enfermedad, podrían determinar la edad de inicio de los síntomas, podrían afectar a la severidad de la enfermedad o determinar el curso general de ésta. Está claro que la vulnerabilidad genética está influenciada por el ambiente y lo contrario también es cierto [Poser y cols., 2007]. Por lo tanto, podríamos decir que la EM es una enfermedad que se manifestaría en sujetos genéticamente predispuestos, sobre los que, por azar, incidiría un factor ambiental desconocido, que pondría en marcha un proceso inmunitario anormal, que podría desencadenar el desarrollo de la esclerosis múltiple.

1.2. VIRUS DE EPSTEIN-BARR

Este virus fue descrito por primera vez en África en 1958 por el cirujano Dennis Burkitt, durante el estudio del Linfoma de Burkitt (LB), aunque no consiguió su aislamiento [Burkitt, 1983]. Posteriormente, Anthony Epstein, Yvonne Barr y Bert Achong lo aislaron en un cultivo de células de dicho linfoma [Epstein y Barr, 1964]. Mediante estudios epidemiológicos posteriores se aclaró que el LB era una rara neoplasia de células B, relacionada con la infección por el VEB. Quedaba claro que era un virus con capacidad oncogénica, aunque todavía no se conocía su transmisión ni su patogenicidad.

Por aquel entonces, a este virus también se le relacionó con otras enfermedades como la Mononucleosis Infecciosa (MI) [Epstein y Achong, 1973; Epstein y cols., 1967] y, más tarde, se encontró ADN en otros procesos como el Carcinoma Nasofaríngeo (CNF) [Wolf y cols., 1973], el Linfoma de Hodking (LH) [Ziegler y cols., 1982], y el Linfoma no Hodking (LNH) [Kutok y Wang, 2006]. El virus también se ha asociado a linfomas de células B en pacientes con inmunodeficiencias adquiridas o congénitas.

Estudios seroepidemiológicos han demostrado que el VEB está ampliamente distribuido en la población humana, con más del 90% de la población adulta mundial seropositiva, y el 70% de la misma lo es antes de los 30 años, persistiendo luego en el hospedador durante toda su vida [Kieff y Rickinson, 2001].

El VEB pertenece a la familia *Herpesviridae*, un grupo de virus ADN con características compartidas. Dentro de esta familia se han descrito tres subfamilias con varias especies agrupadas, teniendo en cuenta las diferencias en las características de los virus (tabla 2): subfamilia α -*Herpesvirinae*, que incluye los virus del herpes simple tipos 1 y 2 (VHS-1 y 2) y virus de la varicela-zóster (VVZ); subfamilia β -*Herpesvirinae*, con los herpesvirus humanos 6 y 7 (VHH-6 y 7) y el virus citomegálico humano o citomegalovirus (CMV) y, por último, la subfamilia γ -*Herpesvirinae*, constituida por el herpesvirus humano 8 (VHH-8) y el virus de Epstein-Barr (VEB) o herpesvirus humano 4 (VHH-4).

Tabla 2. Características de la familia *Herpesviridae*

| | | Infección primaria | Otras enfermedades | Latencia |
|--|--|---------------------------|--|----------------------|
| α-Herpesvirinae | <i>Simplexvirus-1 (VHS-1)</i> | Gingivostomatitis | Fiebre, ampollas, encefalitis, retinitis | Neuronas |
| | <i>Simplexvirus-2 (VHS-2)</i> | Herpes genital | Encefalitis | Neuronas |
| | <i>Varicellovirus (VVZ)</i> | Varicela | Herpes-zoster, encefalitis | Neuronas |
| β-Herpesvirinae | <i>Cytomegalovirus (CMV)</i> | Mononucleosis | Retinitis, neumonía | Monocitos, epitelio |
| | <i>Roseolovirus 6A y 6B (VHH-6A y 6B)</i> | Exantema súbito | Hepatitis, encefalitis | Monocitos, células T |
| | <i>Roseolovirus 7 (VHH-7)</i> | Exantema súbito | - | Monocitos, células T |
| γ-Herpesvirinae | <i>Lymphocryptovirus (VEB)</i> | Mononucleosis infecciosa | Algunos tumores | Células B |
| | <i>Rhadinovirus (VHH-8)</i> | - | Sarcoma de Kaposi, algunos tumores | Desconocido |

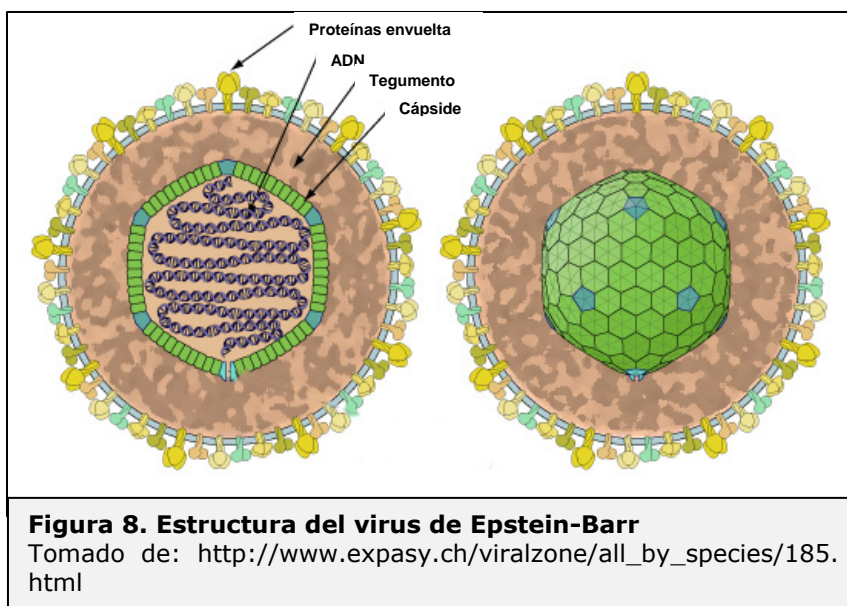
VHS: virus del herpes simple; VVZ: virus de la varicela-zoster; CMV: citomegalovirus; VHH: herpesvirus humano; VEB: virus de Epstein-Barr
Modificado de Christensen, 2007.

Las infecciones por virus herpes son frecuentes. Son virus ubicuos y, tras la infección primaria, sintomática o no, persisten a lo largo de la vida del sujeto llegando a formar parte de la microbiota de éste, con reactivaciones más o menos frecuentes [Christensen, 2007].

1.2.1. Biología general del virus

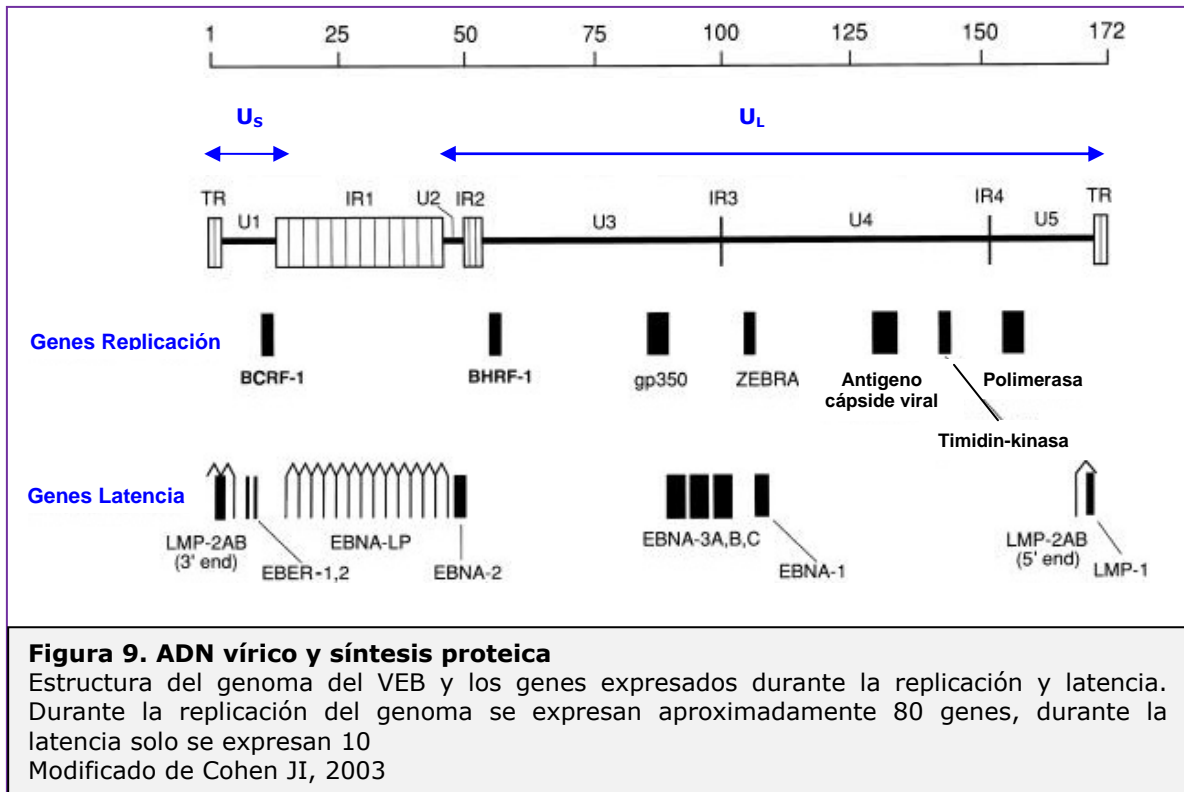
El VEB, como todos los herpesvirus, es un virus encapsulado de gran tamaño. Posee una envuelta lipoproteica, con glucoproteínas en su interior, que se proyectan hacia el exterior (figura 8). La glucoproteína más abundante de la envuelta, la gp350/220, no es homóloga a la de la envuelta de otros virus herpes, sino específica de éste. El resto de glucoproteínas de la cubierta, como gp85, gp25, gp110, gp84/113 y gp15, sin embargo, sí son homólogas a

glucoproteínas de otros herpesvirus como gH, gL, gB, gM y gN, respectivamente [Kieff y Rickinson, 2001]. Seguidamente hay una zona de proteínas con apariencia fibrosa denominada tegumento. Por último, envolviendo al ADN, se encuentra la cápside, que es icosaédrica, constituida por 162 capsómeros [Kieff y Rickinson, 2001].



El genoma del VEB, de 184 kpb, codifica, aproximadamente, unas 100 proteínas. Está compuesto, en un 60%, por guanina y citosina [Baer y cols., 1984] y está organizado en dos secuencias únicas y no repetidas, una secuencia larga (U_L) y otra corta (U_S), flanqueadas por repeticiones terminales (TR) que permiten la organización del genoma.

Las regiones U_L y U_S poseen la mayor parte de la capacidad codificante. Incluyen repeticiones de ADN en tándem, la mayoría de las cuales están dentro de marcos de lecturas abiertos (ORFs). Se pueden ver de 6 a 12 zonas de repetición interna (IR) de 3 kpb [Cheung y Kieff, 1982; Given y Kieff, 1979; Hayward y cols., 1982], flanqueadas cada una de ellas por una región terminal repetitiva denominada TR (figura 9).



El número de TRs presentes en el genoma lineal, propio de la partícula vírica, es muy variable. Cuando el virus infecta a una célula, el genoma lineal se circulariza y forma un episoma (figura 10). Las regiones duplicadas U₃ y U₅ de la sección U_L del genoma permiten al virus realizar su replicación en la infección lítica. En cambio, la latencia, el mantenimiento del episoma y la replicación en la infección latente se debe a la región oriP de la zona denominada U₁ de U_S [Dambaugh y Kieff, 1982; Laux y Freese, 1985].

Se han descrito diferentes subtipos del virus dependiendo del polimorfismo de sus genes. La diversidad se encuentra principalmente en los genes que codificarían para EBNA3, EBNA4, LMP1, LMP2A, EBNA-LP, EBNA2 y EBER (tabla 3) [Abdel-Hamid y cols., 1992; Puchhammer-Stöckl y Görzer, 2006].

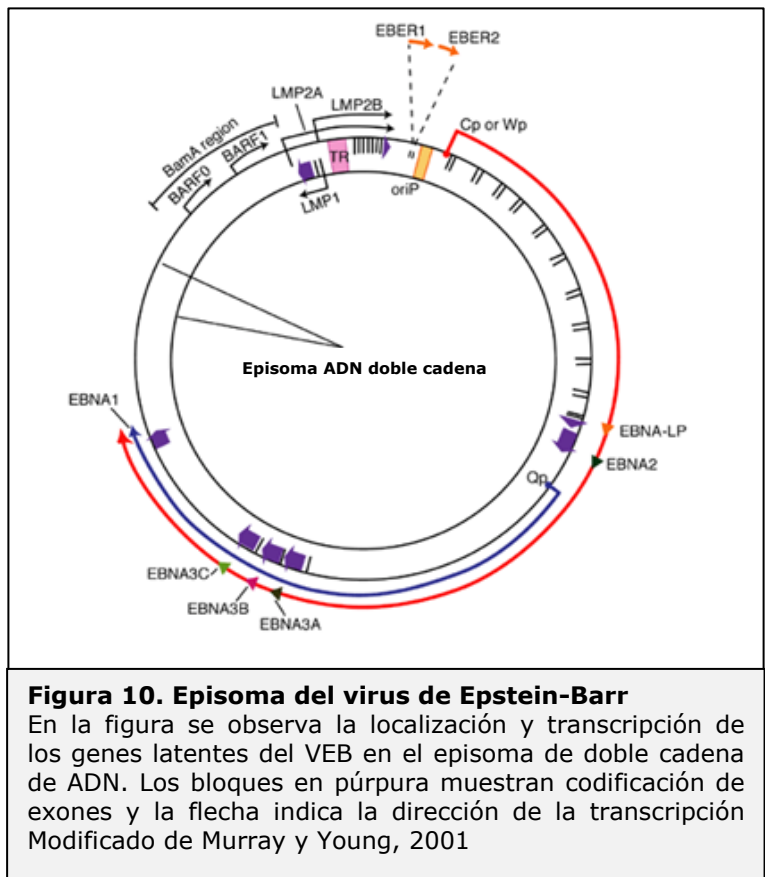


Tabla 3. Caracterización genética del VEB

| Locus | Región polimórfica | Tipos/Subtipos/Variantes |
|--------------------------|---|---|
| EBNA2, 3A, 3B, 3C | Locus EBNA2 y EBNA3 | VEB tipos I y II |
| EBNA1 | Región C-terminal Región N-terminal y C-terminal | Cinco subtipos (dos prototipos, tres variantes) Diferentes subtipos |
| EBNA2 | Gen EBNA2 | Tres grupos del VEB tipo I |
| EBNA3A, 3B, 3C | Locus EBNA3 | Cinco variantes de VEB tipo I |
| LMP1 | Promotor y gen LMP1 | Cuatro grupos (A a D) |
| LMP1 | Gen LMP1 | Siete cepas (cinco sin delección, dos con delección de 30 pb) |
| LMP2A | Gen LMP2A | Seis subtipos (Ia, Ib, Ic, IIa, IIb y IIc) |
| BZLF1 | Gen BZLF1 | Dos variantes |
| BZLF1 | Primer intrón del gen BZLF1 | Dos genotipos (difieren en repeticiones) |
| Zp | Elementos regulatorios esenciales | Un prototipo similar o idéntico a VEB tipo I prototipo B95.8, dos variantes |

EBNA: antígeno nuclear del VEB; LMP: proteína latente de membrana
 Modificado de Puchhammer-Stöckl y Görzer, 2006

1.2.2. Infección

1.2.2.1. Entrada del virus

La entrada del VEB está restringida a la expresión de la glucoproteína de superficie CD21 por parte de las células B [Martin y cols., 1991; Moore y cols., 1991]. Se ha observado que los anticuerpos monoclonales frente a CD21 bloquean la infección del virus [Fingerroth y cols., 1984], así como el uso de la molécula CD21 purificada [Nemerow y cols., 1990]. Por su parte, la glucoproteína de la envuelta más abundante del VEB es gp350/220, que es el ligando de CD21, y es el único que es capaz de unirse a esta glucoproteína [Nemerow y cols., 1987; Tanner y cols., 1987]. La gp350/220 soluble puede saturar el receptor de células B y bloquear también la infección por el VEB [Tanner y cols., 1988]. Por último, el factor del complemento C3d, que presenta una secuencia peptídica muy similar a gp350/220, también puede bloquear la infección [Nemerow y cols., 1987].

El receptor del VEB para las células epiteliales, que no expresan CD21, no se conoce. Está demostrado que los virus defectivos para la molécula gp350/220, pueden infectar células B y células epiteliales, aunque con menor eficiencia, por lo tanto, ambas moléculas parecen no ser imprescindibles para la infección [Busse y cols., 2010; Janz y cols., 2000].

La segunda proteína de la envuelta más abundante es gp85 [Heineman y cols., 1988], que forma parte de un complejo heterodimérico junto a la gp25, homólogo al complejo gH-gL del VHS. Dos moléculas más, gp42 y gp110, forman también parte del complejo anterior [Backovic y cols., 2009; Edson y Thorley-Lawson, 1983; Sorem y cols., 2009; Sorem y Longnecker, 2009]. La gp85 es particularmente importante para la fusión de la envoltura con las membranas celulares [Haddad y Hutt-Fletcher, 1989; Miller y Hutt-Fletcher, 1988; Urquiza y cols., 2004]. Y el complejo gp85-25-42-110 actúa como correceptor de la interacción en la infección de células B [Chesnokova y cols., 2009; Haan y cols., 2000; Haan y Longnecker, 2000; Li y cols., 1997; Spriggs y cols., 1996].

1.2.2.2. Replicación lítica del virus

La expresión de genes durante la replicación viral sigue un orden temporal y secuencial, diferenciando tres fases diferentes, en las que la transcripción del genoma depende de la lectura de los genes de la fase anterior [Bornkamm y Hammerschmidt, 2001; Hutt-Fletcher y Lake, 2001; Tsurumi y cols., 2005].

Fase primera o fase Inmediata a la Precoz "*Immediate-Early*"

Comienza tras la penetración del virus, y durante ella se produce la síntesis de proteínas primarias o reguladoras, que son necesarias para la síntesis posterior de ácidos nucleicos y proteínas estructurales. Estas proteínas son antigénicas y estarán presentes en todo el ciclo vírico [Gutiérrez y cols., 2006]. En la tabla 4 se resumen los aspectos más importantes de las funciones propuestas para las mismas y los genes que codifican su expresión.

Fase segunda o fase Precoz "*Early*"

Durante esta fase se transcriben genes precoces y precoces-tardíos que dan lugar a proteínas importantes para la replicación del ADN vírico (tabla 4). Las proteínas sintetizadas durante esta fase son reguladoras de la fase posterior [Gutiérrez y cols., 2006].

Fase tercera o fase Tardía "*Late*"

Los genes tardíos del virus y las proteínas estructurales se transcriben durante esta fase (tabla 5). Todas estas proteínas son muy importantes en la respuesta inmune humoral [Johannsen y cols., 2004].

Tabla 4. Función propuesta para los genes de las fases inmediata-precoz y precoz

| Genes | Función propuesta |
|----------------------------------|--|
| BZLF1 | Actúa en la activación transcripcional de otros genes líticos, junto con BRLF1 [Holley-Guthrie y cols., 1990; Nuebling y Mueller-Lantzsch, 1989; Quinlivan y cols., 1993] Inhibe la apoptosis [Katz y cols., 1992] Disminuye la función del promotor Cp de EBNA Interfiere en la sobreexpresión de HLA clase II inducido por IFN γ , contribuyendo al escape inmune [Li y cols., 2009, Morrison y cols., 2001] |
| BRLF1 | Regula, junto con BZLF1, la transcripción de otros genes líticos [Holley-Guthrie y cols., 1990; Nuebling y Mueller-Lantzsch, 1989; Quinlivan y cols., 1993] |
| BSMLF1 | Activa la transcripción de otros genes precoces junto con BZLF1 y BRLF1 [Kenney y cols., 1989; Oguro y cols., 1987; Zhang y cols., 1996] |
| BMRF1 | Factor de procesividad y replicación Codifica el antígeno temprano difuso (EA/D) [Neuhierl y Delecluse, 2006; Takaki y cols., 1984] |
| BHRF1 | Codifica una proteína homóloga a la bcl-2 linfocitaria, que estabiliza el potencial de membrana mitocondrial, previniendo la muerte celular por apoptosis durante la infección lítica. Puede conducir a una división continua de las líneas de células mutadas y, eventualmente, al cáncer [Desbien y cols., 2009; Henderson y cols., 1993; Li y cols., 2006] Codifica el antígeno temprano restringido (EA/R) |
| BALF1 | Codifica una proteína también homóloga a bcl-2, por tanto, con efectos anti-apoptosis similares a BHRF1 [Bellows y cols., 2002; Marshall y cols., 1999] |
| BALF5 | Codifica la ADN polimerasa [Kallin y cols., 1985; Tsurumi y cols., 1993] |
| BALF2 | Es un gen co-activador de BZLF1 [Nakayama y cols., 2009] Codifica una proteína de unión al ADN |
| BORF2/BARF1 | Codifican una ribonucleótido reductasa [Tarbouriech y cols., 2006] |
| BXLF1 | Codifica una timidin kinasa [Littler y cols., 1988; Holton y Gentry, 1996] |
| BGLF5 | Codifica una exonucleasa alcalina |
| BSLF1 BBLF2/3/4 | Codifican el complejo primasa-helicasa [Fujii y cols., 2000; Liao y cols., 2005; Yokoyama y cols., 1999] |
| BKRF3 | Codifica una uracil-ADN glucosilasa [Géoui y cols., 2007; Lu y cols., 2007] |

Tabla 5. Función propuesta para los genes de la fase tardía

| Genes | Función propuesta |
|--------------|---|
| BcLF1 | Codifica la proteína mayor de la nucleocápside (VCA) [McGeoch y cols., 1988] |
| BORF1 | Codifica una proteína de la nucleocápside |
| BDLF1 | Codifica una proteína de la nucleocápside |
| BdRF1 | Codifica la proteína base de la nucleocápside |
| BFRF3 | Codifica la proteína pequeña de la nucleocápside |
| BBRF1 | Codifica una proteína de la nucleocápside |
| BVRF2 | Codifica una proteasa |
| BNRF1 | Codifica una proteína del tegumento [Feederle y cols., 2006] |
| BILF2 | Codifica la gp55/80 [Mackett y cols., 1990] |
| BDLF3 | Codifica la gp150 [Borza y Hutt-Fletcher, 1998] |
| BALF4 | Codifica la gp110 [Gong y cols., 1987; Gong y Kieff, 1990]. |
| BXLF2 | Codifica la gp85 [Heineman y cols., 1988; Oba y Hutt-Fletcher, 1988] |
| BKRF2 | Codifica la gp25 [Yaswen y cols., 1993] |
| BZLF2 | Codifica la gp42 [Li y cols, 1995; Rensing y cols., 2005; Sorem y cols., 2009] |
| BLLF1 | Codifica la gp350/220 [Beisel y cols., 1985; Gong y cols., 1987; Young y cols., 2008] |
| BLRF1 | Codifica la gp15 |
| BBRF3 | Codifica la gp84/113 |
| BILF1 | Codifica la gp64 |
| BCRF1 | Codifica una proteína homóloga a la IL-10 [Hsu y cols., 1990] |

1.2.3. Latencia y persistencia

1.2.3.1. Infección latente

Después de la infección primaria, en la mayoría de células B infectadas, el VEB permanece en fase latente y tiene la capacidad de inducir inmortalización de la célula. El genoma no se integra en el núcleo de la célula, sino que se mantiene como episoma circular, y se detiene la replicación vírica [Alfieri y cols., 1991], aunque no del todo, ya que durante la latencia se transcriben, al menos, 9 ARNm poliadenilados y dos pequeños ARN no poliadenilados (EBER1 y EBER2). Seis de los nueve ARNm codifican para los antígenos nucleares EBNA1, EBNA2, EBNA3 (EBNA3A), EBNA4 (EBNA3B), EBNA 5 (EBNA-LP) y EBNA6 (EBNA3C) y los otros tres se traducen en las proteínas latentes de membrana LMP1, LMP2A y LMP2B [Kutok y Wang, 2006; Thorley-Lawson, 2001].

Cuando el VEB infecta las células B y se mantiene latente, *in vivo*, nos encontramos varios patrones de expresión de proteínas denominados patrones

de latencia [Kerr y cols., 1992; Ohga y cols., 2002; Thorley-Lawson, 2001; Thorley-Dawson y Gross, 2004]:

- **Latencia tipo 0:** Permite la persistencia del virus en células B memoria circulantes inactivas, sin ser detectadas por el sistema inmune.
- **Latencia tipo I:** Se observa en biopsias y líneas celulares de LB y linfocitos circulantes infectados de individuos sanos. Se expresan, selectivamente, EBNA1, EBERs y ARNs de la región *BamHI* del virus. La función propuesta es permitir a la célula B memoria dividir el ADN.
- **Latencia tipo II:** Se observa en el CNF, aunque también se ha reproducido en híbridos de fibroblastos, en líneas epiteliales que expresan el receptor CD21 y en el LH. Expresa selectivamente EBNA1, LMP1 y LMP2A de forma irregular. También se expresan EBERs y los ARNs de la región *BamHI*. La función propuesta es la activación de las células B inactivas para producir un linfoblasto proliferante.
- **Latencia tipo III:** Se observa en líneas celulares linfoblastoides, en los procesos linfoproliferativos postrasplante y líneas de LB. Se caracteriza por la expresión de los EBNA1 a 6, LMP1, LMP2A, LMP2B, EBERs y los ARNs de la región *BamHI*. La función propuesta para esta fase es proporcionar las señales necesarias para la diferenciación de linfoblastos infectados hacia células memoria, y el mantenimiento y la persistencia de éstas.

EBNA1

EBNA1 es una de las primeras proteínas expresadas después de la infección, durante la fase de latencia. Su expresión puede derivar de cuatro promotores diferentes. En la fase de infección primaria, durante la formación del episoma, la transcripción se inicia en el promotor Wp (*BamHI* W). Durante la transformación de la célula hospedadora se usa el promotor Cp (*BamHI* C). Durante las latencias tipos I y II la transcripción se inicia en el promotor Qp (*BamHI* Q). El cuarto promotor es Fp (*BamHI* F), y se activa al entrar en el ciclo lítico [Middeldorp y cols., 2003; Nonkwelo y Henson, 1995; Sugden y Warren, 1989].

Entre sus funciones, se cree que tiene un rol importante en la replicación y, fundamentalmente, en el mantenimiento del episoma. Esta función la puede realizar mediante la interacción con proteínas como la del grupo de alta movilidad (HMG-1) y la histona H1 [Humme y cols., 2003; Lee y cols., 1999; Yates y cols., 1984]. Dentro de su relación con el episoma, EBNA1 actúa como mediador en la unión de éste con la cromatina celular durante la distribución del ADN viral a células hijas en la división celular [Aiyar y cols., 2009; Do y cols., 2008; Middeldorp y cols., 2003].

Sin EBNA1 el episoma puede ser degradado después de la infección en la mayoría de las células B. Las repeticiones Gly-Ala inhiben el procesamiento de EBNA1 por los proteosomas, e imposibilita la presentación de péptidos antigénicos asociados con HLA de clase I en la superficie de la célula, evitando así la detección por las células T CD8+ [Levitskaya y cols., 1997]. A pesar de que EBNA1 no es reconocida por CD8+ o CD4+, se detectan anticuerpos en los portadores sanos [Ossevoort y cols., 2007].

EBNA1 no es esencial, pero ayuda en la transformación de las células B [Do y cols., 2008; Ossevoort y cols., 2007]. Es la única proteína expresada en todas las células infectadas en latencia, y en todos los tumores asociados al virus. Se sugiere que EBNA1 puede actuar en la oncogénesis a través de genes celulares [Ian y cols., 2008; O'Neil y cols., 2008]. Además, EBNA1 es la única proteína de su grupo que se sigue transcribiendo cuando las células son activadas en la infección lítica [Weigel y cols., 1985].

EBNA2

Es una de las primeras proteínas expresadas, siendo imprescindible para la inmortalización, proliferación y diferenciación de las células B [Boccellato y cols., 2007; Skare y cols., 1985], actuando como un activador transcripcional de genes víricos y celulares [Middeldorp y cols., 2003].

EBNA3A, 3B, 3C

Los genes codificantes de EBNA3 dan lugar a tres proteínas: EBNA3A, 3B y 3C. El ARNm que codifica estas proteínas es el menos abundante de todos los ARNm de EBNA [Baer y cols., 1984; Hennessy y Wang, 1986]. Se trata de proteínas hidrofóbicas asociadas a la matriz nuclear.

EBNA3A y 3C son esenciales para la inmortalización mediada por el VEB, aunque no parecen ser necesarias para la proliferación y supervivencia [Kempkes y cols., 1995; Middeldorp y cols., 2003]. Ninguna de las proteínas parecen unirse directamente al ADN, pero todas se unen a una gran variedad de proteínas celulares, algunas de las cuales son reguladoras transcripcionales, proteínas importantes para el transporte nuclear, apoptosis y estabilidad de las proteínas [Jiménez-Ramírez y cols., 2006; Maruo y cols., 2006].

EBNA3B no es necesaria para la infección latente de células B, ni para la proliferación de líneas celulares linfoblastoides, ni para la supervivencia e inmortalización de linfocitos B *in vitro*, pero está codificada por un gen altamente conservado, lo que sugiere que es un gen importante para la infección del hospedador. Parece que media la regulación de CXCR4, lo que puede ser una importante estrategia para la alteración del "homing" de las células B en el hospedador infectado [Chen y cols., 2006; Tomkinson y Kieff, 1992].

EBNA-LP

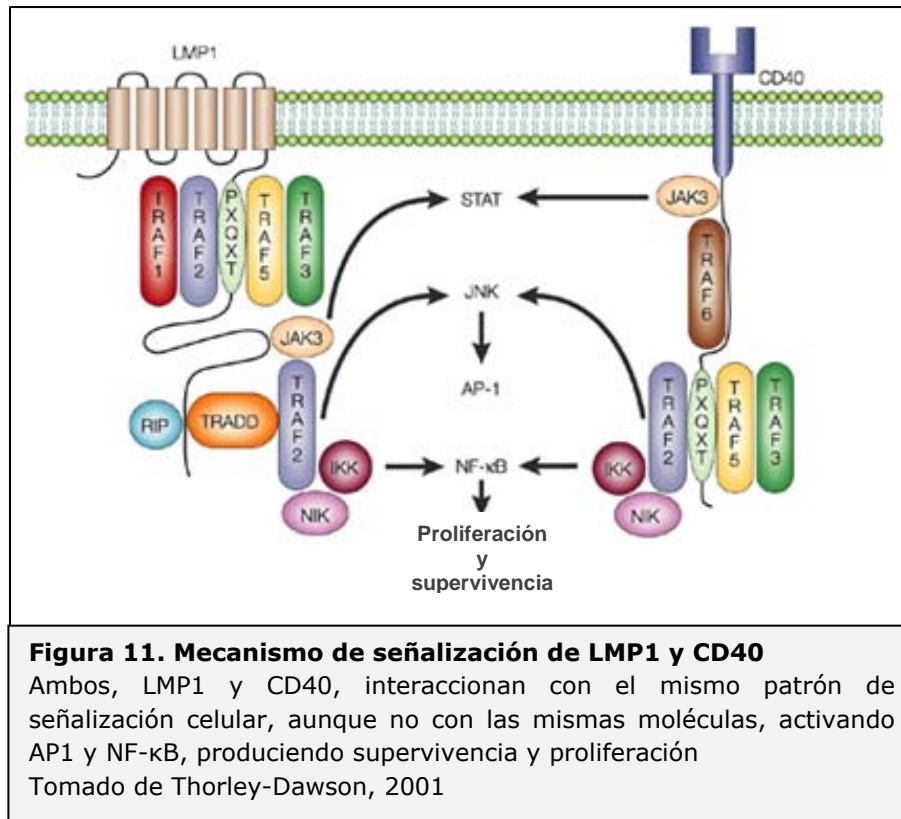
Esta proteína está implicada en la expresión de genes celulares esenciales para la formación de linfoblastos B, y aumenta la habilidad de EBNA2 para activar la transcripción de LMP1 [Mannick y cols., 1991]. Podría coactivar la transcripción a través de la interacción con las histonas diacetilasas (HDAC4 y HDAC5) [Middeldorp y cols., 2003; Portal y cols., 2006].

LMP1

LMP1 es una proteína integrada en la membrana plasmática. Sus ARNm codificantes son muy abundantes en la mayoría de las células B latentes infectadas, aunque su vida media es corta comparada con los EBNA1. El gen que codifica LMP1, junto con el que codifica a EBNA1, son los únicos genes latentes asociados a la infección y que son transcritos en la infección lítica [Liebowitz y Wang, 1986].

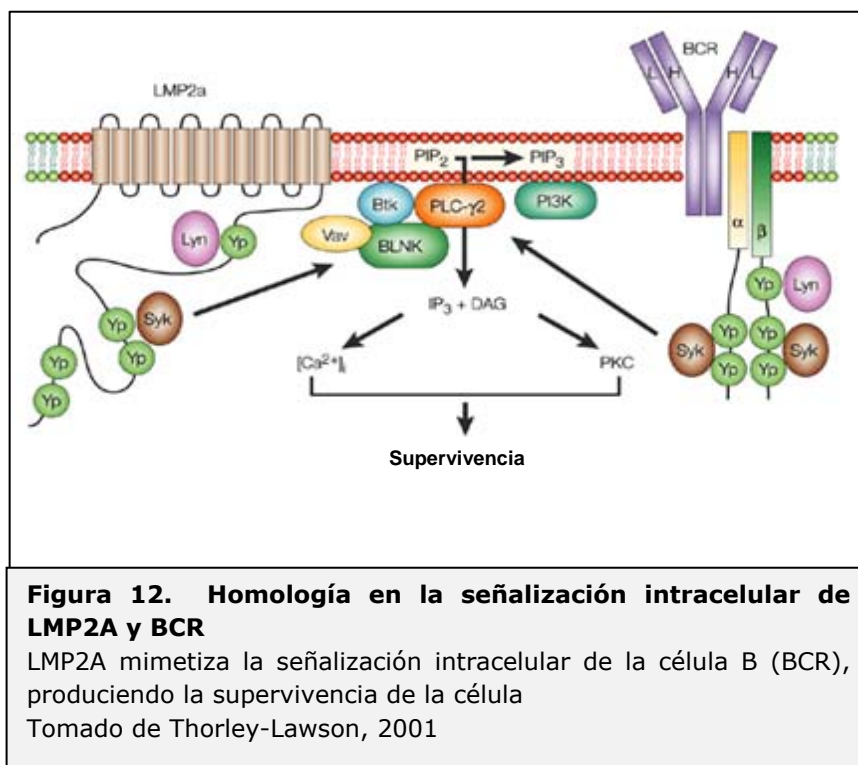
Se trata de una proteína con capacidad oncógena. La presencia de LMP1 transforma las células B y las células epiteliales, reduciendo la respuesta a las señales de diferenciación normal e incrementando su capacidad invasiva en la matriz colágena [Dantuma y Masucci, 2003; Middeldorp y cols., 2003; Nanbo y Takada, 2002; Toda y Sugimoto, 2003]. Produce la mayoría de los cambios celulares asociados a la infección por VEB, como el incremento de la expresión en superficie de CD23, CD39, CD40, CD44 y HLA de clase II, y aumenta la expresión de IL-10 [Nakagomi y cols., 1994], disminuye la expresión de CD10 y aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular LFA-1, ICAM-1 y LFA-3 [Hsu y cols., 1990].

Además, LMP1 mimetiza a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (p80TNFR, CD40, CD30), utilizando sus mismos factores de señalización intracelular (TRAF, TRAD) [Mosialos y cols., 1995]. A través de la interacción con estos factores, LMP1 desencadena dos vías de fosforilación que llevan a la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP1. Esto ocurre porque el dominio carboxilo-terminal de LMP1 tiene funciones homólogas con el receptor CD40 (figura 11) [Eliopoulos y cols., 1999; Eliopoulos y Young, 1998; Hatzivassiliou y cols., 1998]. El resultado es que LMP1 y CD40 rescatan las células B de la señalización para apoptosis y las conducen hacia la proliferación [Henderson y cols., 1991; Matusali y cols., 2007].



LMP2A, 2B

LMP2A es una proteína expresada durante la fase de latencia en células B infectadas. Posee doce secuencias transmembrana sin dominios extracelulares pero con un dominio C-terminal y uno N-terminal citoplasmático [Longnecker y Kieff, 1990]. El dominio N-terminal contiene un inmunoreceptor activador de tirosina similar al encontrado en el receptor de células B (BCR) que permite la supervivencia de éstas pero no su proliferación (figura 12) [Buhl y Cambier, 1997; Burkhardt y cols., 1992; Hasler y Zouali, 2003; Miller y cols., 1995; Thorley-Lawson, 2001]. En linfoblastos del LB la expresión de LMP2A bloquea la señal de transducción que se produce después de la interferencia con IgM de superficie, CD19 o HLA clase II [Miller y cols., 1993]. LMP2B regula negativamente a LMP2A [Rechsteiner y cols., 2008; Rovedo y Longnecker, 2007].



EBERs

Los pequeños ARNs no poliadenilados codificados por el VEB son los ARNs más abundantes del virus en células infectadas latentes (10^4 - 10^5 copias/célula) [Howe y Steitz, 1986]. Se localizan en el núcleo de la célula, donde forman complejos con la proteína celular La y proteínas asociadas a EBERs [Lerner y cols., 1981; Toczyski y Steitz, 1993].

1.2.3.2. Persistencia y reactivación

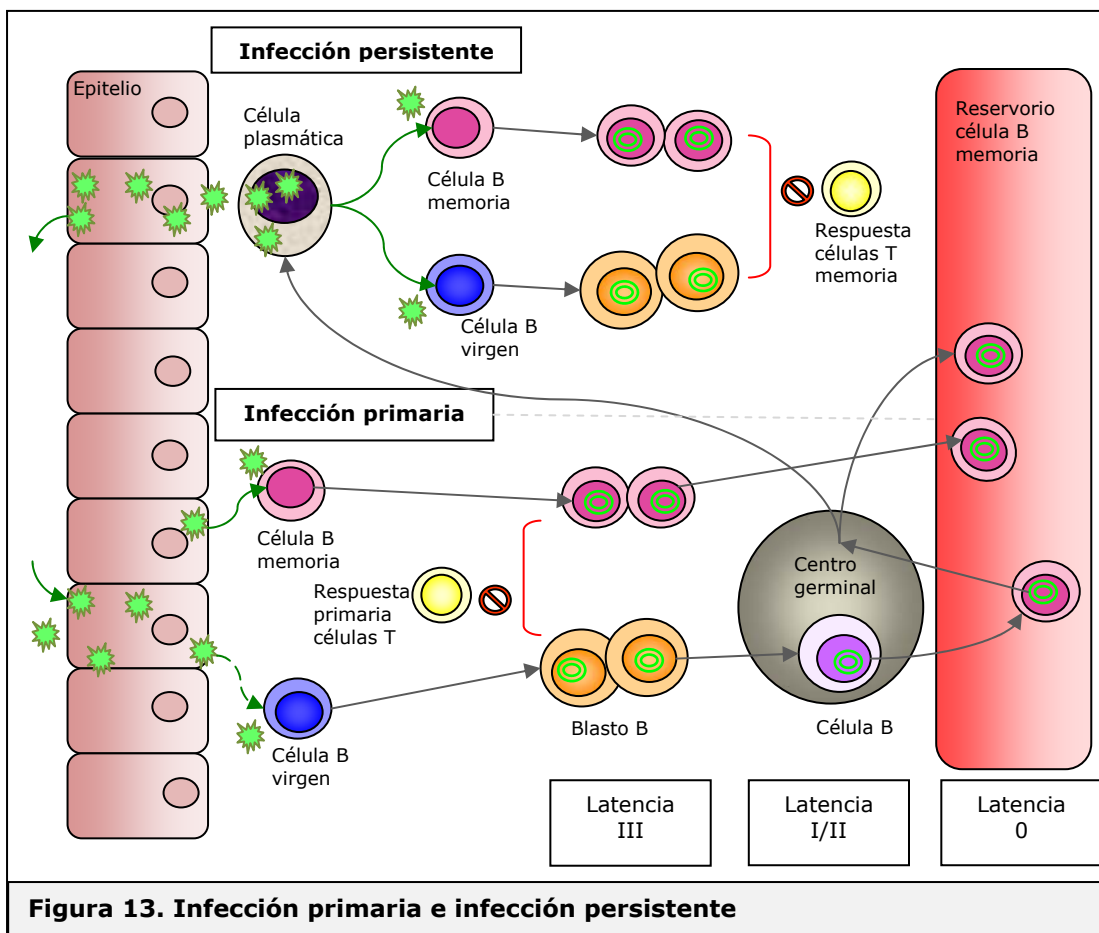
El VEB, después de la infección primaria, se mantiene y persiste en las células B memoria que circulan en sangre periférica durante largo tiempo. En estas células, el virus escapa al control inmune, ya que no se expresan proteínas virales. Para entender cómo el virus tiene acceso a estas células se han propuesto varios modelos. Según Pender [2003], el virus infecta directamente las células B memoria, persistiendo en ellas durante largo

tiempo; mientras que para Thorley-Lawson [2001] el virus participa en el ciclo de activación de las células B (figura 13).

En condiciones normales, la activación de la célula B madura no estimulada, que no ha contactado con ningún antígeno, ocurre en los ganglios linfáticos, donde son activadas en presencia de un agente extraño y con la ayuda de los linfocitos T CD4+, produciéndose una expansión clonal. Posteriormente, estas células se diferencian a células B memoria o células plasmáticas productoras de anticuerpos.

En el modelo de persistencia del VEB, propuesto por Thorley-Lawson [2001], el paso a linfoblasto, célula plasmática y célula B memoria ocurre sin la necesidad de estimulación mediada por un antígeno ni por células T CD4+. De esta forma, en una primera fase, el estado de latencia III de la célula infectada por el VEB, sería el causante de la activación de las células B maduras, que pasan a linfoblastos proliferantes. En una segunda fase, este linfoblasto infectado por el virus pasa del patrón de latencia III al II, produciendo la señal necesaria para pasar a célula B memoria y célula plasmática. Estas células memoria infectadas salen del ciclo de diferenciación y pasan a la circulación, donde sobreviven, ya que dejan de expresar proteínas debido a un cambio en el patrón de latencia, escapando al control inmune. Solamente cuando se dividen expresan EBNA1. Finalmente, el virus latente en las células B memoria se reactiva y se replica permitiendo la diseminación hacia nuevos hospedadores.

El ADN del virus persiste en estas células infectadas como un episoma, aunque también podemos encontrarnos el genoma del VEB integrado en el cromosoma, y ambos ADN, integrado y episoma, coexisten en algunas células [Delecluse y cols., 1993; Gulley y cols., 1992; Hurley y cols., 1991].



1.2.4. Respuesta inmune frente al virus

1.2.4.1. Respuesta inmune humoral

Los principales antígenos del VEB frente a los que se produce una respuesta inmunológica de tipo humoral son [Gu y cols., 2008; Sener y cols., 2009; Zeytinoglu y cols., 2008]:

- Antígenos nucleares del VEB (EBNAs) expresados en células infectadas latentes.
- Antígenos tempranos (EAs) expresados en el ciclo lítico precoz.
- Antígeno de la cápside del virus (VCA) expresado en el ciclo lítico tardío.
- Antígeno de membrana (MA) expresado durante el ciclo lítico tardío.

En la tabla 6 se muestran los marcadores serológicos de infección por el VEB en diferentes procesos.

Tabla 6. Marcadores serológicos en la infección por el VEB

| | Anticuerpos heterófilos | Anti-VCA | | | Anti-EA | | Anti-EBNA |
|-------------------------------------|-------------------------|----------|------|------|---------|----|-----------|
| | | IgG | IgM | IgA | D | R | |
| Mononucleosis infecciosa | + | +++ | ++++ | ++ | + | ± | - |
| Infección pasada | ± | ++ | - | - | - | - | + |
| Infección crónica activada | - | ++++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ± |
| Procesos linfoproliferativos | - | + | + | - | - | - | - |
| Linfoma de Burkitt | - | +++ | - | - | ± | ++ | + |
| Carcinoma nasofaríngeo | - | ++++ | - | ++++ | ++++ | ++ | ++++ |

El patrón de anticuerpos es diferente dependiendo de la enfermedad asociada al VEB.
 +++++: muy detectable; ++++: detectable; ++: poco detectable; +: muy poco detectable; -: no es detectable
 Tomado de Gutiérrez y cols., 2006.

En la figura 14 se observa la evolución de los diferentes anticuerpos en la MI.

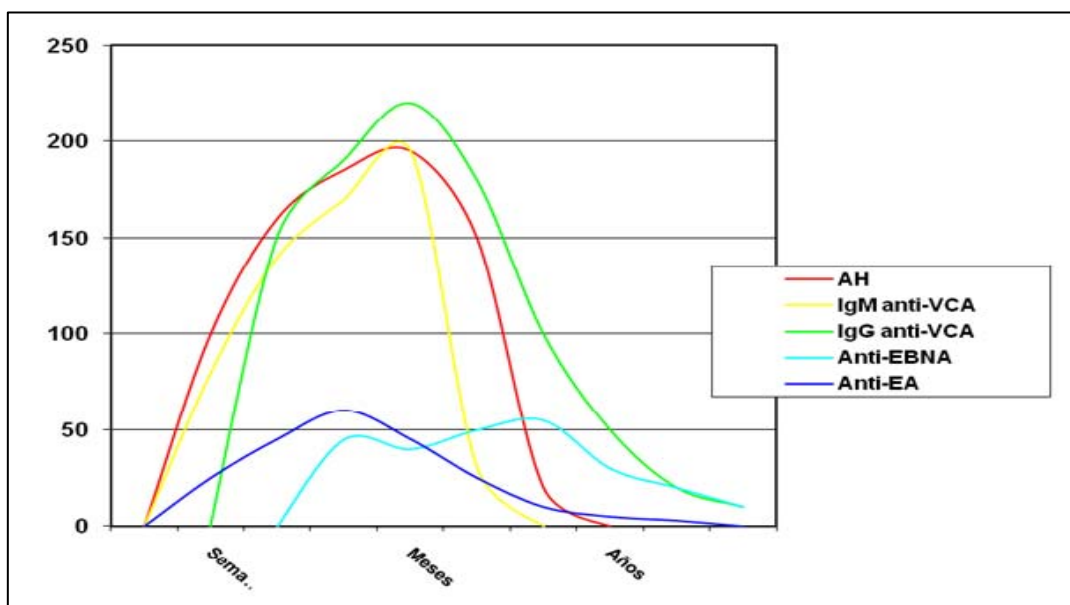


Figura 14. Evolución de los anticuerpos durante la mononucleosis infecciosa

1.2.4.2. Respuesta inmune celular

En la infección primaria por el VEB, una de las claves diagnósticas de MI, es la presencia en sangre de células mononucleares atípicas, que son fundamentalmente linfoblastos T CD8+, también algunos CD4+ y células NK activadas.

La respuesta citotóxica de las células T se encarga de destruir las células infectadas que expresan proteínas virales. En la MI más del 50% de todas las células T CD8+ presentan una respuesta directa frente a las células en las que el virus se está replicando, principalmente células memoria [Thorley-Dawson y Gross, 2004]. La expresión de antígenos durante el ciclo lítico induce una mayor respuesta celular que durante las fases de latencia. La respuesta de las células T CD8+ en la MI es específica frente a epítomos inmunodominantes expresados durante la fase lítica (BZLF1, BRLF1, BMLF1, BMRF1, BALF2) y durante el ciclo latente del virus (EBNA3A, -3B, -3C) [Steven y cols., 1996; Steven y cols., 1997]. Por el contrario, las células CD4+ no presentan una respuesta masiva como las células T CD8+ [White y cols., 1996].

El componente NK podría ser la primera defensa en la respuesta inmune innata frente a infección viral [Tomkinson y cols., 1989], aunque parece que tiene un valor limitado en el control de la infección latente, como se ha visto en pacientes trasplantados de médula ósea [Babcock y cols., 1999; Lucas y cols., 1996].

Las respuestas inmunes humoral y celular, al final de la enfermedad aguda, son incapaces de eliminar el virus completamente, y como consecuencia, éste persiste en las células infectadas. Durante la fase de persistencia se detecta la existencia de linfocitos T memoria CD8+ específicos frente a antígenos latentes, principalmente frente a EBNA3A, -3B y -3C, LMP2, siendo más rara la respuesta frente a EBNA2, EBNA-LP, LMP1 y EBNA1 [Khanna y cols., 1992; Murray y cols., 1992].

1.2.4.3. Evasión de la respuesta inmune

El VEB puede alterar y evadir la respuesta inmune del hospedador mediante la evasión de la presentación de antígenos, la apoptosis, la producción de citoquinas y la variabilidad genética.

Evasión de la presentación de antígenos

El VEB codifica algunas proteínas que son capaces de alterar la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8+. EBNA1 es resistente a la respuesta inmune mediada por estas células gracias al dominio de repetición Gly-Ala, que evita la degradación proteosómica [Dantuma y cols., 2000; Levitskaya y cols., 1995; Levitskaya y cols., 1997].

La gp42 bloquea la presentación de antígenos a células T CD4+ mediante la unión a la cadena β de la molécula HLA de clase II [Li y cols., 1997; Ohga y cols., 2002].

Apoptosis

La expresión de BHRF1 puede proteger a las células del LB o a las células epiteliales de la apoptosis. En las células B también la presencia de LMP1 aumenta la expresión de CD23, CD40, moléculas de adhesión (CD54, LFA1) y proteínas anti-apoptóticas como A20 y bcl-2, que protegen a la célula de la muerte [Ohga y cols., 2002].

Citoquinas

Algunos virus codifican proteínas homólogas a citoquinas, como ocurre con el producto del gen tardío BCRF1, que tiene una homología del 78% con la IL-10 humana. Además, BCRF1 tiene varias funciones relacionadas con la regulación de citoquinas: regula negativamente a la IL-12, inhibe la producción de IFN γ y suprime la producción de IL-1. De esta forma impide la función de las células T de inhibir el crecimiento de células B infectadas [Liu y cols., 1997; Stuart y cols., 1995; Zeidler y cols., 1997].

Por otro lado, BARF1 ejerce como un receptor soluble para el factor estimulador de colonias. Éste actúa mejorando la producción de INF α en los monocitos, y, junto con el INF γ , se inhibe la proliferación de las células infectadas por el virus. Entonces, BARF1 bloquea la producción de INF favoreciendo la proliferación de las células infectadas [Ohga y cols., 2002].

Variación genética

Los distintos subtipos del VEB pueden influir en el reconocimiento de los antígenos del virus por parte de las células T citotóxicas, como ocurre con las mutaciones del epítipo de la proteína EBNA4, que impide el reconocimiento por las células T citotóxicas. Esto indica una posible evasión del sistema inmune, debido a una variación genética de las proteínas [Ohga y cols., 2002].

1.2.5. Epidemiología de la infección por el virus de Epstein-Barr

Más del 90% de los adultos en todo el mundo están infectados por el VEB y son portadores durante toda su vida. En los países desarrollados la infección primaria ocurre, frecuentemente, en dos periodos de la vida: durante la infancia y en la adolescencia o principio de la edad adulta [Pariente y cols., 2007]. Durante la infancia la infección es debida a la transmisión a través de la saliva entre los mismos miembros de la familia o contactos cercanos, y su presentación habitualmente es subclínica. En adolescentes y adultos, sin embargo, es más frecuente la aparición de síntomas propios de MI.

Se ha observado una mayor seroprevalencia en mujeres que en hombres [Higgings y cols., 2007]. Aunque se piensa que la actividad sexual puede ser un factor de riesgo, no queda claro si la transmisión en este caso es a través de fluidos genitales o de la saliva.

Su distribución es universal, aunque hay una mayor seroprevalencia en los trópicos [Higgings y cols., 2007]. El VEB tipo 1 es más frecuente en África Central, Norteamérica, Papúa-Nueva Guinea y Asia. El VEB tipo 2 es más frecuente en África Central [Macswen y Crawford, 2003].

La presencia del virus latente en células B de sangre periférica en individuos sanos, arroja otra potencial ruta de transmisión. Así, se han

documentado infecciones post-trasfusionales y post-trasplante [Gratama y cols., 1992; Macsween y Crawford, 2003]. También se transmite a través de fómites, compartiendo objetos como cepillos de dientes y vasos, por ejemplo [Gratama y cols., 1990].

1.2.6. Procesos clínicos relacionados con la infección por el virus de Epstein-Barr

Aparecen reflejados en la tabla 7.

1.2.6.1. Enfermedades no neoplásicas

Mononucleosis infecciosa

La mayoría de las infecciones primarias por VEB son difíciles de enmarcar, con síntomas que son indistinguibles de otros síndromes virales agudos. Cuando la infección primaria ocurre durante la infancia, normalmente cursa de forma asintomática, pero, en la adolescencia y en la edad adulta, en el 90% de los casos, aparecen síntomas de MI.

El período de incubación suele oscilar entre una y tres semanas. Los síntomas más frecuentes son fiebre, faringitis exudativa o amigdalitis y adenopatías firmes y dolorosas, pero no induradas. También hay edema palpebral, eritema, petequias en la parte media del paladar, astenia y hepatoesplenomegalia. El hemograma muestra linfocitosis e hiperbasofilia nuclear, debido a la proliferación de células T CD8+. Las complicaciones más importantes son la ruptura del bazo y la trombocitopenia. Las complicaciones neurológicas, pulmonares y cardíacas son menos frecuentes [Gutiérrez y cols., 2006].

Después de la infección primaria, los enfermos pueden seguir distintas vías. En algunos individuos la infección primaria no se resuelve y queda activa de forma crónica, durante meses o años. En otros casos, durante la latencia que sigue a la infección primaria, se producen recurrencias clínicas debido a la reactivación de un virus endógeno o reinfecciones. En enfermos con algún tipo

de inmunosupresión es frecuente que se produzca enfermedad grave con lesión de cualquier órgano [Gutiérrez y cols.,2006].

Leucoplasia oral vellosa

Es una lesión de las células escamosas del epitelio mucoso, que aparece en pacientes inmunocomprometidos. Se manifiesta con bandas verticales en las caras laterales de la lengua, blanquecinas, de aspecto aterciopelado, que no se desprenden al rasparlas [Kutok y Wang, 2006].

1.2.6.2. Enfermedades neoplásicas

Se trata de una serie de enfermedades relacionadas, casi exclusivamente, con la proliferación de células B, debido a la incapacidad de respuesta de células T citotóxicas en pacientes inmunodeprimidos, aunque también pueden aparecer en individuos inmunocompetentes.

Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (ELPT)

La ELPT está asociada con infección por el VEB, apareciendo sus manifestaciones tiempo después del trasplante, generalmente a partir de los 6 meses. Engloba a un grupo heterogéneo de trastornos linfoproliferativos que oscilan desde la aparición de un síndrome mononucleósico con hiperplasia polimorfa de células B, hasta el desarrollo de verdaderas proliferaciones monoclonales de células B con extensa infiltración nodal o extranodal, que pueden ser indistinguibles de formas graves de linfoma. El riesgo de desarrollar ELPT varía considerablemente de unos individuos a otros, y depende de factores como el tipo de trasplante, la edad de los pacientes y el estado de inmunosupresión del sujeto [Kutok y Wang, 2006, Rezk y Weiss, 2007].

Linfomas asociados al virus de Epstein-Barr en pacientes con SIDA

Son un grupo heterogéneo que incluyen linfomas del SNC, linfomas de células B difusos, LH y LB. La frecuencia de infección por el VEB en linfomas relacionados con SIDA es muy variable y depende del subtipo de tumor implicado [Kutok y Wang, 2006].

Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

Es una forma rara de MI fulminante, que afecta a hombres jóvenes y que se produce debido a la proliferación incontrolada de células B como consecuencia de un defecto en la activación de células T. La muerte es debida a necrosis hepática secundaria a una infiltración masiva de células T citotóxicas y liberación de citoquinas, anemia aplásica y pancitopenia [Macswen y Crawford, 2003].

Linfoma de Burkitt

Aparece varios años después de una infección primaria. Es un tumor sólido de células B caracterizado histológicamente por un fenotipo de células maduras, pequeñas, no hendidas, de apariencia uniforme. Se clasifica como un Linfoma no Hodgkin de alto grado, y es uno de los de mayor velocidad de crecimiento. Las células poseen un defecto genético consistente en la expresión inapropiada del gen *c-myc*, implicado en la proliferación celular [Onciu y cols., 2006; Thorley-Dawson y Allday, 2008].

Linfoma de Hodgkin

Se diferencia de la mayoría de las neoplasias malignas por su especial composición celular, ya que en la masa tumoral las células neoplásicas son minoritarias, estando el componente mayoritario constiuido por células inflamatorias. Las células de Hodgkin y de Reed-Sternberg, y sus variantes, constituyen menos del 1% de la celularidad total. Desde el punto de vista clínico, el LH se manifiesta por el aumento del tamaño de un ganglio linfático o

grupo de ellos. La historia natural de la enfermedad lleva a la diseminación a grupos ganglionares vecinos, con afectación de hígado, bazo y médula ósea [Bellas, 2004].

1.2.6.3. Enfermedades neoplásicas asociadas a otros patrones celulares

Carcinoma nasofaríngeo

Se divide clásicamente en dos subtipos: queratinizante y no queratinizante. El no queratinizante es el más frecuente, y casi el 100% presenta evidencias de infección por el VEB. La presencia del VEB en el subtipo queratinizante, sin embargo, es más rara [Kutok y Wang, 2006].

Tabla 7. Enfermedades asociadas al VEB

| | |
|--|---|
| Enfermedades no malignas | Mononucleosis infecciosa Infección activa crónica Leucoplasia oral vellosa |
| Enfermedades malignas de células B en sujetos inmunocomprometidos | Linfoma de células B asociado a SIDA Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante Granulomatosis linfomatoide Linfoma de células B asociado a inmunodeficiencia severa combinada Linfoma de células B asociado al síndrome de Wiskott-Aldrich Linfoma de células B asociado a desorden linfoproliferativo ligado al cromosoma X |
| Enfermedades malignas de células B en sujetos inmunocompetentes | Linfoma de Burkitt Linfoma de Hodgkin |
| Enfermedades malignas de células T | Linfoma de linfocitos NK/T extranodal de tipo nasal Linfoma de linfocitos T con síndrome hemofagocítico asociado al VEB Linfoma de linfocitos T angio-inmunoblástico Linfoma de linfocitos T hepato-esplénico Linfoma de linfocitos T no hepato-esplénico Linfoma de linfocitos T enteropático |
| Enfermedades malignas de células epiteliales | Carcinoma nasofaríngeo no glandular Carcinoma hepatocelular |
| Otras enfermedades malignas | Carcinoma de células dendríticas foliculares |

Modificado de Kutok y Wang, 2006; Rezk y Weiss, 2007.

1.2.6.4. Enfermedades autoinmunes

En los últimos años, el VEB también se ha relacionado con algunos procesos autoinmunes, debido al elevado número de anticuerpos encontrados frente al virus en las sangre de pacientes con enfermedades como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR) y la esclerosis múltiple. También se ha discutido el papel que podría tener en el síndrome de Sjögren, en la tiroiditis autoinmune, en la hepatitis autoinmune y en la alveolitis fibrosa [Niller y cols., 2008].

1.3. ASOCIACIÓN ENTRE ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y VIRUS DE EPSTEIN-BARR

1.3.1. Semejanzas epidemiológicas entre la mononucleosis infecciosa y la esclerosis múltiple

En 1981 se estableció la primera asociación entre la epidemiología de la EM y la infección por el VEB [Warner y Carp, 1981]. A partir de entonces, esta relación ha sido ampliamente estudiada. Según algunos autores, el interés viene determinado por el paralelismo que existe entre la epidemiología de la EM y de la MI, como se puede observar en la tabla 8 [Alonso y cols., 2006; Haahr y Höllsberg, 2006].

Tabla 8. Semejanzas entre la epidemiología de la mononucleosis infecciosa y la esclerosis múltiple

| | Esclerosis múltiple | Monucleosis infecciosa |
|---|----------------------------|-------------------------------|
| Edad de máxima incidencia | 25-34 | 15-24 |
| Geografía | | |
| Extremadamente raro en los trópicos | +++ | +++ |
| Gradiente norte-sur en las regiones templadas | +++ | +++ |
| Raro en Japón | +++ | +++ |
| Raro en esquimales | ++ | +++ |
| Asociación positiva con SE | + | ++ |
| Incidencia en raza negra menor que en caucásica | + | ++ |
| Incidencia en asiáticos menor que en caucásicos | ++ | ++ |
| Migración antes de la pubertad | +++ | ++ |
| Focos y epidemias | ++ | ++ |
| Asociación a niveles bajos de vitamina D | ++ | + |

M:mujeres; H:hombres; SE: estatus socioeconómico. Las cruces (+) indican el grado en el que esa característica esta presente en la enfermedad correspondiente (desde +++, extremadamente característico, a +, algo característico).

Modificado de Alonso y cols., 2006 y Haahr y Höllsberg, 2006.

Está descrito que, en el norte de Europa, en países como Dinamarca, un tercio de los individuos infectados por el VEB adquieren el contagio durante la pubertad o en edades adultas, en contraste con países del sur de Europa, donde la infección ocurre, principalmente, en los primeros años de vida, en etapas, por tanto, más precoces. La MI que aparece en la edad infantil,

generalmente subclínica, se relaciona con sociedades con un estatus socio-económico bajo, debido, según algunos autores, al bajo nivel higiénico-sanitario, que favorece el contacto con el virus más precozmente. Sin embargo, las infecciones que aparecen en edades más tardías, en este caso, generalmente con clínica más florida, son más típicas de sociedades con alto estatus socio-económico, en las que el contacto con los patógenos, debido a las mejores condiciones higiénico-sanitarias, está retrasado. Es evidente, también, que las tasas de mayor prevalencia de EM aparecen en zonas geográficas con un alto estatus socio-económico [Haahr y Höllsberg, 2006].

En un estudio realizado en población noruega se observó la existencia de un acúmulo de pacientes con EM entre sujetos con fechas de nacimiento cercanas, entre los 13 y 20 años, que habían vivido en zonas próximas entre sí y compartiendo los mismos factores de riesgo, entre ellos la infección por el VEB, que se determinó como el principal factor que explicaría este acúmulo de casos [Riise y cols., 1991].

En otro estudio realizado en las Islas Feroe [Munch y cols., 1998a], se observó que todos los sujetos de estudio con EM, en contraposición con los controles sanos, estaban infectados con el mismo subtipo de VEB. En este sentido, las Islas Feroe se caracterizan porque en ellas se produjo la mayor epidemia conocida de EM [Kurtzke, 1993], debido, supuestamente, a la entrada de militares procedentes de áreas donde era común la infección por el VEB durante la edad adulta.

Otros factores que se han relacionado con la EM, y también con la infección por el VEB, son el déficit de vitamina D y la exposición al sol. En un estudio reciente [Grant, 2008] se ha constatado que el metabolito 1,25-dihidroxi-vitamina D induce la producción de la proteína catelicidin (LL-37), que se caracteriza por ser un péptido con actividad antimicrobiana, que previene frente a infecciones por virus y bacterias. Esto podría explicar, en parte, que la mayoría de las infecciones son más frecuentes durante las estaciones frías, con humedad relativa baja y durante las cuales la producción de vitamina D, que depende de las radiaciones ultravioletas B, es más baja.

En el caso del VEB, está comprobado que en invierno, enfermedades como la MI tienen picos de incidencia [Douglass y cols., 1996].

En base a éstas y otras coincidencias epidemiológicas entre las dos enfermedades, numerosos trabajos han estudiado el riesgo relativo de desarrollar EM en individuos que han padecido MI [Ascherio y Munger, 2007; Goldacre y cols., 2004, Haahr y cols, 2004; Haahr y cols, 1995; Hernán y cols, 2001; Lindberg y cols., 1991; Nielsen y cols, 2007; Operskalski y cols., 1989; Thacker y cols., 2006]. A partir de algunos de estos estudios se ha pensado que la infección tardía por el VEB es un factor etiológico para el desarrollo de EM. El retraso en la edad de adquisición de la infección por el VEB se asocia, como hemos visto, a unas características epidemiológicas concretas, que coinciden, en gran medida, con las características epidemiológicas de la EM.

1.3.2. Posibles mecanismos patogénicos que explican la relación entre la infección por el virus de Epstein-Barr y la esclerosis múltiple

Basándose en el hecho de que parece que existe una relación entre la infección por el VEB y el padecimiento de EM, se han propuesto varias posibles hipótesis patogénicas que tratan de explicar la contribución del virus en la enfermedad.

1.3.2.1. Hipótesis de mimetismo molecular

Es la teoría más aceptada hasta el momento. Se basa en la homología entre las proteínas del virus y las proteínas de la mielina [Bray y cols., 1992b; Holmoy y cols., 2004; Lang y cols., 2002; Lünemann y cols., 2008; Vaughan y cols., 1996; Wucherpfenning y Strominger, 1995]. Según esta hipótesis, las células T y B, que pueden activarse frente a antígenos propios, podrían también hacerlo frente a epítopos de agentes infecciosos, atravesar la BHE y producir una reacción inflamatoria en el SNC [Alonso y cols., 2006].

La respuesta de las células T podría iniciar y sostener la autoinmunidad en la EM, ya que existen ciertas células T CD4+ específicas frente a la proteína básica de la mielina que, además, reconocen epítopos del VEB

[Wucherpfenning y Strominger, 1995]. Estas células están aumentadas en los enfermos con EM y son específicas frente a la proteína nuclear del virus, EBNA1, por lo que podría ocurrir un reconocimiento cruzado con auto-antígenos específicos de la mielina [Lünemann y cols., 2006; Lünemann y cols., 2007; Lünemann y cols., 2008]. En este sentido, Lang y cols. [2002], demostraron que uno de los clones de células T CD4+ que presenta reacción cruzada en los enfermos con EM reconoce al péptido de la proteína básica de la mielina a través de la molécula HLA DRB1*1501 y al virus a través de HLA DRB5*0101, casualmente las dos moléculas HLA con mayor asociación con la EM.

En cuanto a las células T citotóxicas CD8+, que reconocen la presentación de epítomos mediante la molécula HLA-B7, también se ha encontrado un aumento de éstas en la EM, sobre todo en las formas clínicas EMRR [Höllsberg y cols., 2003], aunque un estudio determinó que las dianas epitópicas del VEB para las células CD8+ no difieren entre pacientes con EM y controles sanos [Lünemann y cols., 2006].

De esta forma, según la hipótesis del mimetismo molecular en la EM, se combinan una predisposición genética y un factor infeccioso que podrían mantener las células T auto-reactivas que darían lugar a la enfermedad [Gran y cols., 1999; Lünemann y cols., 2008].

1.3.2.2. Hipótesis de células B autoinmunes infectadas por el VEB

Pender [2003] propuso también una hipótesis para explicar el papel del VEB en el desarrollo de la enfermedad, donde la EM podría producirse por la acumulación de células B auto-reactivas infectadas en el SNC. Esta hipótesis implica la capacidad de inmortalización del VEB y su capacidad para el mimetismo molecular, además de la actuación de células T CD4+ capaces de reconocer auto-antígenos. El mecanismo patogénico sería el siguiente:

1. Durante la infección primaria, las células B y células B auto-reactivas son infectadas por el VEB en las amígdalas de individuos con predisposición genética, resultando en un gran número de células infectadas.

2. Estas células B proliferan de forma independiente a la señal de activación de las células T, ya que la infección por el VEB le da esta capacidad a través de la proteína LMP1, homóloga a la molécula CD40, y rescata de la apoptosis a las células B, las transforma morfológicamente, reduce la respuesta a las señales de diferenciación normal y les ayuda a la proliferación [Kilger y cols., 1998; Mosialos y cols., 1995; Thorley-Lawson y cols., 2001]. Mediante LMP2A, con homología funcional con BCR, estas células se pueden mantener en ausencia de una BCR competente que traduzca señales y un antígeno que las active [Thorley-Lawson, 2001]. Además, en esta proliferación, transformación e inmortalización de las células B influirían otros genes del VEB [Middeldorp y cols., 2003].
3. De esta forma, gracias a la infección por el VEB, se mantienen como células B memoria infectadas latentes, circulando en sangre.
4. Estas células B infectadas normalmente son eliminadas por células T CD8+ específicas frente al VEB, pero si hay un defecto genético en este mecanismo, no sería posible esta eliminación.
5. En la EM estas células B autoinmunes activadas antígeno-específicas pueden atravesar la BHE y alojarse en el SNC, donde persisten escapando de la apoptosis mediante la expresión de ciertos genes, como BHRF1 [Desbien y cols., 2009; Henderson y cols., 1993], LMP1 [Uchida y cols., 1999] y EBNA1 [Levitskava y cols., 1995].
6. En el SNC, la célula B infectada también puede actuar como célula presentadora de antígenos para las células T. En el caso de la EM, cuando las células CD4+ que reconocen antígenos del SNC son activadas en los órganos linfoides mediante reacción-cruzada con antígenos del VEB, migran al SNC, y se alojan en el órgano diana que presenta el auto-antígeno con el que reaccionan. Normalmente estas células deberían eliminarse en el órgano diana mediante apoptosis inducida, pero si interaccionan con las células B auto-reactivas infectadas acumuladas en el órgano, reciben la señal de supervivencia que inhibe su apoptosis.

7. Las células T CD4+ que sobreviven activarían a otras células B maduras para producir anticuerpos, que reaccionan con el órgano diana produciendo daño en el SNC. Estas células T autoinmunes proliferan y producen citoquinas que reclutan otras células inflamatorias. En definitiva, como resultado, se produce el daño en la mielina. Esta respuesta puede producir una liberación de los auto-antígenos y promover la activación de otras células T y células B y producir la respuesta inmune frente a otros antígenos.
8. Además, de forma independiente a todo este proceso se podrían estar produciendo nuevas partículas víricas con capacidad infectiva, ya que la diferenciación de las células B memoria infectadas latentes a células plasmáticas podría provocar la entrada del virus en el ciclo lítico [Throley-Lawson, 2001]. De esta forma el proceso autoinmune produce un círculo vicioso donde las células B infectadas por el VEB promueven la autoinmunidad, y la infección del VEB en el SNC [Pender, 2003].

Analizando los resultados encontrados en la bibliografía referente a la asociación entre EM y el VEB, podemos observar hallazgos que hacen pensar que esta hipótesis podría ser contrastada. Está claro que la síntesis intratecal de anticuerpos es característica de la EM, y las células B clonalmente expandidas contribuyen a la IgG elevada en el LCR [Qin y cols., 1998], por lo tanto, esta intensa respuesta humoral frente al VEB puede influir en la patogenia de la EM [Cepok y cols., 2005]. Esta respuesta es de larga duración y puede verse varios años después de la infección [Reiber y Peter, 2001; Sindic y cols., 1994]. La IgG monoclonal se presenta en la EM como BO en el LCR [Colombo y cols., 2003; Walsh y cols., 1986] y la mayoría están dirigidas frente a agentes infecciosos.

También se ha observado que existe infiltración de células B y células plasmáticas infectadas en las lesiones activas, con formación de folículos de células B ectópicos en las meninges, siendo éste el principal lugar de persistencia del virus [Serafini y cols., 2007]. Estos folículos de células B presentan características de centro germinal, donde estas células pueden proliferar, diferenciarse y madurar, expresando EBERs, EBNA2 y LMP1

[Serafini y cols., 2007]. La presencia de estas células B en el cerebro contribuye a la patogenia de la EM, ya que además de actuar como células presentadoras de antígenos, pueden producir anticuerpos específicos frente a antígenos de la mielina [Cepok y cols., 2005; Vaughan y cols., 1996; Wucherpfennig y cols., 1997]. Sin embargo, otros autores no han conseguido reproducir estos resultados [Torkildsen y cols., 2009; Willis y cols., 2009].

En cuanto a las evidencias bibliográficas sobre el papel de los linfocitos T CD4+ auto-reactivos en la EM, como ya hemos mencionado anteriormente, existen evidencias de mimetismo molecular. Wucherpfennig y Strominger [1995] caracterizaron epítomos derivados de la ADN polimerasa del VEB con reacción cruzada con la proteína básica de la mielina, mientras que Bray y cols. [1992b] también encontraron homología entre epítomos de EBNA1 y la proteína básica de la mielina.

1.3.2.3. Hipótesis de superantígenos

La transformación espontánea *in vitro* de las células B da lugar, además de a nuevas partículas del VEB, a partículas de retrovirus denominados endógenos, en pacientes con EM activa [Haahr y cols., 1992]. Estos retrovirus pueden transcribir un gen que codifica una proteína de envuelta con actividad potencial de super-antígeno [Haahr y Höllsberg, 2006; Sutkowski y cols., 1996]. Los retrovirus como HERV, son citotóxicos para los oligodendrocitos. Concretamente, el VEB activa la transcripción de HERV-K18 en las células B, pudiendo contribuir a la muerte de oligodendrocitos y a la patogénesis de la EM. En este mecanismo patogénico la actuación del VEB sería indirecta [Haahr y Höllsberg, 2006].

Otra teoría donde el VEB tiene un papel indirecto, se basa en la capacidad del virus de inducir, en la superficie de células B, la expresión de la proteína α - β -cristalina, que está ausente en el tejido linfoide humano, por lo que el sistema inmune no es tolerante a ella, lo que provocaría la presentación a las células T CD4+ y la respuesta frente a la misma. Esta proteína es identificada como el mayor auto-antígeno anormalmente expresado en los oligodendrocitos en el cerebro de pacientes con EM, y está muy expresada en

lesiones tempranas de la enfermedad. Se ha sugerido que constituye un antígeno de mielina inmunodominante para las células T en el SNC de individuos con EM [Angius y cols., 1999; Ousman y cols., 2007; van Noort y cols., 1995; van Sechel y cols., 1999].

1.3.2.4. Hipótesis higiénica

Por último, otra hipótesis postulada es la denominada "higiénica" [Fleming y Fabry, 2007], que podría explicar el aumento de la incidencia de EM en el mundo desarrollado. Se basa en la observación del incremento en la prevalencia de enfermedades autoinmunes en los países con notable disminución de infecciones por patógenos clásicos o prevalentes. Explica que la interacción del hombre con patógenos "amigos" previene de la aparición de respuestas autoinmunes [Bach, 2002].

De esta forma, la protección frente a enfermedades autoinmunes como la EM, es conferida por efectos persistentes en la respuesta inmune durante una infección microbiana o parasitaria durante la infancia, lo que favorece un correcto desarrollo del sistema inmune. El sistema inmune cuenta con un gran entramado regulatorio que está determinado genéticamente, pero que se va madurando según la naturaleza, el calendario de infecciones y por otros cambios experimentados durante la infancia [Krone y cols., 2009]. Las infecciones en edades pediátricas estimulan la producción de células reguladoras, como los linfocitos T, que regulan tanto las respuestas Th1 como la Th2, y sus efectos se prolongan en el tiempo, evitando el daño tisular colateral asociado a una respuesta inflamatoria prolongada [Sundstedt y cols., 2003]. De modo que, si no hay infecciones en la infancia, se podría alterar el proceso y aumentar las enfermedades autoinmunes, debido a una mala actuación de las células T reguladoras [Bach, 2002].

Se ha demostrado que las células T reguladoras, en pacientes con EM, presentan un defecto en su capacidad supresora [Viglietta y cols., 2004], siendo éste un elemento clave en la patogenia de la EM. También se han descrito diferencias en la capacidad supresora de la producción de citoquinas de las células T reguladoras. Estos resultados indican diferencias en la función

de estas células moduladoras, que podrían contribuir a la patogenia de la enfermedad. Sin embargo, todavía no hay nada claro, y por lo tanto son necesarios más estudios que permitan comprender el papel que juegan estas células.

A su vez, una variante de esta hipótesis es la "hipótesis biográfica" postulada por Krone y cols. [2009], que afirma que la EM depende de la infección por el VEB, que, debido a factores asociados a la higiene, ocurre más tarde de lo normal. En estas circunstancias, la infección tardía por el VEB se puede encontrar con patrones de respuesta inmune generados por anteriores infecciones con otros microorganismos (biografía del sistema), lo que resulta en una desregulación inmune para el control de la infección por el VEB, favoreciendo los primeros síntomas de la EM.

2. OBJETIVOS

En los últimos 50 años, en diversos estudios, se ha propuesto a algunos agentes infecciosos como posibles candidatos para el desarrollo de esclerosis múltiple, aunque en la mayoría de los trabajos no se han podido obtener resultados concluyentes. Entre los numerosos candidatos, muchas publicaciones han relacionado el virus de Epstein-Barr con esta enfermedad, siendo necesario, en la actualidad, realizar un análisis estadístico o meta-análisis que aglutine los resultados de todas las publicaciones científicas disponibles, con el propósito de integrarlos, y establecer si existen o no evidencias de asociación entre la infección y la enfermedad, definiendo un posible marco teórico del conocimiento científico sobre este tema, que pueda, posteriormente, ser útil en la práctica clínica y asistencial.

Por otra parte, la detección de bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con esclerosis múltiple es el signo más característico de inflamación del sistema nervioso central. De hecho, más del 95% de los pacientes con esta enfermedad presentan bandas oligoclonales, lo que indica síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Éstas, presentes en el líquido cefalorraquídeo y sintetizadas intratecalmente, podrían ser producidas como consecuencia de una respuesta inmunológica específica del sistema nervioso central. Cabría esperar, por tanto, que de ser cierta la posible asociación entre la infección por el virus de Epstein-Barr y la esclerosis múltiple, deberíamos encontrar un patrón caracterizado por la síntesis intratecal de inmunoglobulinas frente a antígenos de este virus, así como la detección de ADN vírico.

Por todo lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Evaluar, mediante una revisión exhaustiva de la literatura científica, y a través de un meta-análisis, los trabajos que han estudiado una posible relación entre la infección por el virus de Epstein-Barr y la esclerosis múltiple, para poder ofrecer evidencias definitivas sobre si existe, o no, asociación significativa entre ambos procesos.
- Determinar el índice de anticuerpos específicos frente al virus de Epstein-Barr en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos, y comparar la síntesis intratecal de inmunoglobulinas entre ambos grupos de sujetos.
- Desarrollar una técnica de nested-PCR suficientemente sensible para detectar la presencia de ADN del virus de Epstein-Barr en muestras de suero, líquido cefalorraquídeo y células mononucleares de sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos, y comparar ambos grupos de sujetos respecto de estas variables.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1.1. Selección de los estudios

Para la localización de los estudios se utilizó una base de datos bibliográfica de acceso web, MEDLINE, donde se estableció una búsqueda abierta con las palabras clave "Epstein-Barr virus" o "EBV" o "human herpesvirus 4" o "HHV-4" o "infectious mononucleosis" y "multiple sclerosis".

La búsqueda se limitó a trabajos publicados en inglés y español hasta 31 de enero de 2009.

3.1.1.1. Criterios de inclusión de los estudios

Se aceptaron los estudios de casos y controles, los de casos y controles anidados en una cohorte y los estudios de cohortes prospectivas. Los requisitos valorados fueron la inclusión de pacientes con EM en cualquier momento del estudio, y que el objetivo de éste fuera la búsqueda directa o indirecta de marcadores de infección por VEB, tratando de establecer una posible asociación de la infección con la enfermedad.

3.1.1.2. Criterios de exclusión de los estudios

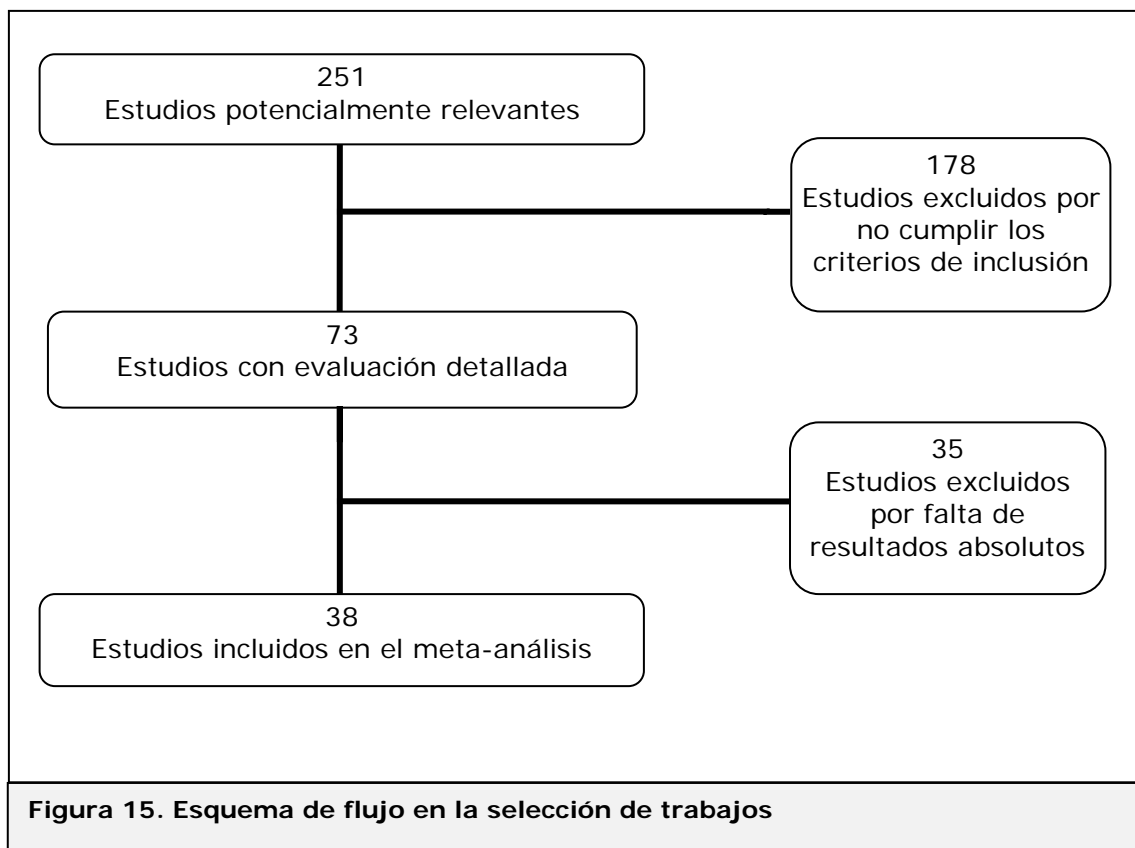
Se excluyeron las revisiones, los artículos no originales, los estudios realizados en animales, y los que no evaluaron la infección por VEB como factor de riesgo de la enfermedad. Tampoco pudieron ser incluidos aquéllos a los que no se tuvo acceso a través de la web ni se pudieron conseguir por otros procedimientos, por no estar disponibles en las bibliotecas.

3.1.1.3. Estudios encontrados y seleccionados

Tras la búsqueda inicial en MEDLINE se obtuvieron 251 publicaciones que, una vez valoradas según los criterios de inclusión y exclusión citados, quedaron en 73 artículos seleccionados. Tras leer los 73 artículos disponibles detenidamente, se descartaron 35 trabajos que no ofrecían un resultado absoluto, sino un porcentaje o una medida de riesgo, datos que no podían ser

utilizadas para realizar el meta-análisis, por carecer de los valores reales y absolutos en cuanto a resultados positivos y negativos. Por último, tras rastrear la bibliografía en todos ellos, no se encontraron artículos adicionales. Por tanto, el número total de artículos seleccionados a partir de esta revisión sistemática de la bibliografía fue de 38.

En la figura 15 se muestra el esquema de flujo en la selección de trabajos.



En la tabla 9 se muestran los datos más relevantes extraídos de los 38 trabajos incluidos en el meta-análisis.

Tabla 9. Descripción de los artículos incluidos en el meta-análisis

| Estudio | Muestra/Prueba | Casos | | | Controles | | |
|--------------------------------|------------------------------|--|--------------------------------------|---------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| | | Tipo | Edad media (±DE o ratio) | M/H | Tipo | Edad media (±DE o ratio) | M/H |
| Ablashi y cols., 1998 | LCR/IF | 33 EM-(EA, ENA, CP) | - | - | 27 OEN | - | - |
| Alotaibi y cols., 2004 | SR/ELISA | 30 EM | 13,4 (±3,63) | 1,31:1 | 90 OENN 53 donante MO | 13,37(±3,62) 10,30 (±3,78) | 1,57:1 0,66:1 |
| Álvarez y cols., 2000 | CM/PCR y n-PCR | 102 EMRR-NAE | M: 34,75 (21-57) H: 36,34 (22-63) | 70/32 | 102 hemoterapia | M: 34,75 (21-57) H: 36,34 (22-63) | 70/32 |
| Álvarez-Lafuente y cols., 2008 | LCR/RT-PCR | 48 EMRR | 32,6 | 34/14 | 23 OENI 21 OENNI | 43,7 39,4 | 15/8 14/7 |
| Ascherio y cols., 2001 | SR/IFI y ACIF | 144 EM | - | 144/0 | 288 sanos | - | 288/0 |
| Banwell y cols., 2007 | SR/ELISA | 131 EMRR 5 EMSP 1 variante Marburg | 14,1 (2,2-19,6) | 1,54:1 | 47 sanos 49 OENND | - | - |
| Bray y cols., 1992 | LCR/EIA, ACIF y Western blot | 266 EM | - | - | 260 OEN | - | - |
| Bray y cols., 1983 | SR/IF | 313 EM | 16->45 | - | 406 sanos y OENND | - | - |
| Buljevac y cols., 2005 | PS/ELISA | 54 EMRR | 39,3 | - | 52 sanos | - | - |
| Denne y cols., 2007 | LCR/PCR | 6 EM | 13,3 (±2,6) (10-17) | 5/1 | 57 OEN | 9,2 (±5,1) | 30/27 |
| Ferrante y cols., 2000 | CM/n-PCR | 26 EMRR-EA | 31 (20-46) | 17/9 | 18 sanos | 29 (19-36) | 12/6 |
| Gutiérrez y cols., 2002 | SR/ELISA | 32 EMRR 5 EMSP 4 EMPP | 39,2±12,7 | 23/18 | 31 OEN | 48,2±16,2 | 18/13 |
| Haahr y cols., 1995 | SR/AH | 41 EM | - | - | 19698 sanos y MI | - | - |
| Haahr y cols., 2004 | SR/ELISA | 53 EM 100 nuevo diagnóstico EM | 28,3 (21-32) 27,7 (20-34) | 49/4 73/27 | 53 sanos pareados 1001 sanos | 28,1 (22-32) 6-16 | 49/4 - |
| Hay y Tenser, 2000 | MC/PCR | 17 EMRR 12 EMSP | - | - | 7 sanos | - | - |
| Hernán y cols., 2001 | SR/AH | 301 EM | - | 301/0 | 1416 sanos y MI | 37,5 (35-50) | 1416/0 |

Tabla 9. Descripción de los artículos incluidos en el meta-análisis (continuación)

| Estudio | Muestra/Prueba | Casos | | | Controles | | |
|-----------------------------|----------------|--|--------------------------------|---------------|---|-----------------------------|---------------|
| | | Tipo | Edad media (±DE o ratio) | M/H | Tipo | Edad media (±DE o ratio) | M/H |
| Hollenberg y cols., 2005 | PS/RT-PCR | 33 EM (16 TT. Valaciclovir) | 33,7-38,83 | 22/11 | 18 sanos | - | - |
| Larsen y cols., 1985 | SR/IF y ACIF | 100 EM | 32 (17-62) | 50/50 | 100 sanos | - | - |
| Lindberg y cols., 1991 | SR/AH | 3 EM | 17 (±4,9) (10-21) | - | 702 MI o SMI | 18 (1-40) | - |
| Mancuso y cols., 2007 | LCR/n-PCR | 23 EMRR 15 EMCP | 34 (±10) 43 (±12) | 16/7 8/7 | 28 OEN 19 ENN | 43 (±16) 70 (±10) | 16/12 2/17 |
| Martin y cols., 1997 | LCR/n-PCR | 6 EMRR-EA 8 EMRR-ENA 6 EMSP 6 EMRR (TT. Aciclovir) 19 NO | 36 (16-59) 31 (20-46) | 17/19 15/4 | 20 OEN | 52 (19-83) | 13/7 |
| Myhr y cols., 1998 | SR/ELISA y IF | 144 EM 10 EM post mórtem | 39,2 (17-66) 53 (34-81) | 83/61 10/0 | 170 ENN 10 ENN post mórtem | 40 (18-77) 84 (64-97) | 93/77 6/4 |
| Morre y cols., 2001 | LCR y TC/PCR | 9 EM post mórtem 18 EM | - 38 (24-56) | - 14/4 | 6 sanos (post mórtem) 30 OEN | - 39 (19-63) | - 19/11 |
| Munch y cols., 1998 | SR/ELISA | 138 EM | 43 (22-72) | 81/57 | 138 sanos | - | - |
| Nikoskelainen y cols., 1995 | LCR/IFI | 20 EM y NO | - | - | 58 OEN | - | - |
| Nielsen y cols., 2007 | SR/AH | 172 EM | 37,7 (±9,09) | 98/74 | 1267756 sanos y MI | 36,06 (±11,51) | 658634/609122 |
| Pohl y cols., 2006 | SR/ELISA | 144 EMRR 2 EMPP 1 EMSP | 12,31 (±13,13) (4,04-15,99) | 98/49 | 47 Adrenolecodistrofia o neuroblastoma 100 OEND | - | - |
| Ponsonby y cols., 2005 | SR/ELISA | 89 EMRR 35 EMSP 10 EMPP | 43,5 (±9,3) | 92/44 | 272 sanos | 43,6 (±9,2) | 184/88 |

Tabla 9. Descripción de los artículos incluidos en el meta-análisis (continuación)

| Estudio | Muestra/Prueba | Casos | | | Controles | | |
|--------------------------|----------------|---|-----------------------------|----------------|--------------------------|-----------------------------|----------------|
| | | Tipo | Edad media (±DE o ratio) | M/H | Tipo | Edad media (±DE o ratio) | M/H |
| Riverol y cols., 2007 | SR/ELISA | 22 SDA 92 EMRR 32 EMSP 17 EMPP 9 EMPR | 39 | 106/66 | 85 sanos | - | - |
| Sanders y cols., 1996 | TC/PCR | 37 EM (post mórten) | 51,01 (±11,73) (31-70) | 19/18 | 24 OEN 13 ENN | 74,28 (±8,07) (48-84) | 9/28 |
| Shirodaria y cols., 1987 | SR/IFI y ACIF | 26 EM | 51,9 (28-74) | 17/9 | 26 sanos | 52 (27-74) | 17/9 |
| Sotelo y cols., 2007 | CM/PCR | 131 EMRR-ENA 40 EMRR-EA | 33 (±2) 32 (±2) | 82/49 30/10 | 60 sanos 70 OEN y ENN | 36 (±8) 37 (±9) | 14/46 46/24 |
| Sundström y cols., 2004 | SR/IF y ELISA | 197 EMRR/SP 24 EMPP 8 EMPR 5 NC | 17-68 | 192/42 | 702 sanos | - | - |
| Sumaya y cols., 1980 | SR/IFI | 157 EM | 41,42 (±12,46) (11->60) | 92/65 | 81 sanos | 40,68 (±13,97) (11->60) | 45/36 |
| Sumaya y cols., 1976 | SR/IF | 142 EM | - | - | 74 sanos | - | - |
| Wagner y cols., 2004 | SR/PCR | 31 EM | - | 31/0 | 62 sanos | - | - |
| Wandinger y cols., 2000 | SR/ELISA | 58 EMRR-EA 50 EMRR-ENA | 37,9 (±10,3) (20-57) | 67/41 | 163 ENN | 36,2 (±11,8) (19-56) | 89/74 |
| Zivadinov y cols., 2006 | SR/ELISA | 140 EMRR | 42,1 (±10,09) | 90/50 | 131 sanos | - | - |

3.1.2. Breve resumen del contenido de los estudios seleccionados

Ablashi y cols. [1998]: Se determinó, mediante inmunofluorescencia, la presencia de anticuerpos IgG anti-VEB en LCR de enfermos con EM en fases aguda, no aguda y progresiva, y en controles (sujetos con otras enfermedades neurológicas). También se investigó la infección por VHH-6 y CMV.

Alotaibi y cols. [2004]: Se utilizaron sueros de 30 niños con EM sin tratamiento para determinar la posible infección por virus como VEB, CMV, Parvovirus B19, VVZ y VHS. Los autores aportaron los resultados de los anticuerpos frente a VEB según la fase de la infección en la que se encontraban, es decir, si mostraban infección previa (IgG anti-VCA positivo, IgG anti-EBNA positivo e IgG anti-EA negativo), aguda reciente (IgG anti-VCA positivo, IgG anti-EBNA negativo e IgG anti-EA positivo) o no infectados (IgG anti-VCA negativo, IgG anti-EBNA negativo e IgG anti-EA negativo). A partir de estos datos se extrajeron los resultados de forma individualizada para cada uno de los anticuerpos (IgG anti-VCA, anti-EBNA y anti-EA). Los controles fueron 143 niños (90 que habían sido atendidos en urgencias sanitarias por distintas patologías no neurológicas y 53 donantes de médula ósea).

Álvarez y cols. [2000]: Se determinó la presencia de ADN (mediante PCR y nested-PCR) de varios herpesvirus (VHS, VVZ, VEB, CMV, VHH-6, VHH-7, VHH-8) en CMSP de 102 enfermos con EM en fase RR no aguda y 102 controles procedentes de hemoterapia.

Álvarez-Lafuente y cols. [2008]: Se determinó la carga viral de VHS, VEB, VVZ, CMV, VHH-6, HERV-H y HERV-W en LCR de 48 pacientes con EMRR y 44 controles con otras enfermedades neurológicas, inflamatorias y no inflamatorias.

Ascherio y cols. [2001]: Se utilizó suero de 144 enfermos con EM (definida y probable clínicamente) para el estudio cualitativo de los anticuerpos IgG anti-VCA e IgG anti-EBNA. También se realizó un estudio cuantitativo de los anticuerpos IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA, IgG anti EBNA1, IgG anti-EBNA2 e IgG anti-EA/D en 18 de los casos, de los que se dispuso sangre antes del comienzo de los síntomas neurológicos. Además de VEB se

determinaron anticuerpos frente a CMV. Los controles fueron 288 individuos sanos pareados (x2) con los casos.

Banwell y cols. [2007]: Los autores utilizaron para su estudio suero de 136 niños-adolescentes con EM en fases RR o SP y uno con variante de Marburg. Además de VEB, también estudiaron otros virus como CMV, Parvovirus B19, VVZ o VHS. El grupo control estuvo compuesto por 47 niños sanos y 49 con epilepsia, daños cognitivos o migraña. Sólo 96 casos estuvieron pareados con controles. Para la determinación de anticuerpos frente al VEB los autores no especificaron los individuos que eran seropositivos para cada uno de los anticuerpos, sino que dieron los resultados según la fase de la infección en la que se encontraban, es decir, dependiendo de que tuviesen infección pasada (IgG anti-VCA positivo, IgG anti-EBNA1 positivo e IgG anti-EAs negativo), infección reciente (IgG anti-VCA positivo, IgG anti-EBNA1 negativo e IgG anti-EAs positivo) o no tuviese infección (IgG anti-VCA negativo, IgG anti-EBNA1 negativo e IgG anti-EAs negativo). De estos resultados se obtuvieron los datos individuales para los anticuerpos IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA1 e IgG anti-EAs. También se determinó la IgG anti-EBNA1 de forma cuantitativa.

Bray y cols. [1992]: Se realizó el estudio en LCR de 266 enfermos con EM y 260 controles con enfermedades neurológicas. Los autores utilizaron distintas pruebas (enzimoinmunoanálisis, inmunofluorescencia y western blot) para determinar los mismos anticuerpos. Los resultados fueron expresados uniendo los valores obtenidos por algunas de las pruebas para la IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA1 e IgG anti-EA/D.

Bray y cols. [1983]: Detectaron la presencia de anticuerpos frente a varios virus (VEB, CMV, VHS, VVZ, virus de la parotiditis y virus del sarampión) en suero de 313 enfermos con EM y dos grupos de controles (sujetos sanos y pacientes con otras enfermedades neurológicas no desmielinizantes) pareados con los casos. Para VEB se determinó la IgG anti-VCA de forma cualitativa y cuantitativa.

Buljevac y cols. [2005]: Los autores estudiaron los niveles en sangre de anticuerpos IgG anti-VCA, IgM anti-VCA, IgG anti-EBNA e IgG anti-EA

frente a VEB en 54 enfermos con EM en fase RR. También estudiaron la infección por CMV. En los 52 controles sanos sólo se determinó la IgG anti-EA. Los resultados se aportaron de forma cuantitativa.

Denne y cols. [2007]: El estudio se realizó en un grupo de 63 niños con distintas enfermedades neurológicas. Para poder utilizar estos datos se diferenciaron los que estaban enfermos con EM (6 niños), que se consideraron como casos, y el resto de niños con otras enfermedades neurológicas (57), usados como controles.

Ferrante y cols. [2000]: Se determinó el ADN de varios herpesvirus (VEB, VHH-6, CMV y VHS-1/2) en CMSP de 26 enfermos con EM en fase RR durante exacerbación aguda, en un periodo de tres semanas consecutivas. Se comparó con 18 controles sin enfermedades neurológicas ni desórdenes inmunológicos. Para poder usar los datos tomamos una media de los resultados dados según las semanas que duró el estudio.

Gutiérrez y cols. [2002]: Se determinó en suero la presencia de anticuerpos frente a varios herpesvirus (VHH-6, CMV y VEB) de 41 enfermos con EM, en fase RR, SP y PP, y 31 controles con otras enfermedades neurológicas. Incluyó un estudio cuantitativo de los anticuerpos.

Haahr y cols. [1995]: Los autores realizaron el trabajo buscando en historias clínicas sujetos que tuviesen una determinación de anticuerpos heterófilos (AH) previa, por sospecha clínica de mononucleosis infecciosa (19739 sujetos), y de éstos seleccionaron los que desarrollaron EM (41 sujetos). Nosotros tomamos como casos los sujetos con EM y el resto como controles.

Haahr y cols. [2004]: Se trata de un estudio serológico realizado en adultos jóvenes. Se determinaron los anticuerpos frente a VEB. El grupo de los casos estuvo formado por 53 enfermos con EM de larga evolución y otros 100 con EM recientemente diagnosticada. Los resultados de los controles (1001 individuos sanos, de los cuales sólo 53 estuvieron pareados con los 53 casos) se obtuvieron de una gráfica, por extrapolación de datos.

Hay y Tenser [2000]: Analizaron la presencia de ADN de VEB y VHH-6 en CMSP de 29 enfermos con EM en fases RR y SP. Los controles fueron 7 individuos sanos.

Hernán y cols. [2001]: Partiendo de un grupo de 301 enfermos de EM (casos) y 1416 controles sanos, se buscó, consultando sus historias clínicas, diagnósticos previos de infección por diferente virus, entre ellos VEB.

Höllsberg y cols. [2005]: Se determinó la presencia de ADN de VEB y VHH-6 en saliva y suero de 33 enfermos con EMRR durante la fase de exacerbación aguda, de los cuales 16 estaban en tratamiento con valaciclovir y el resto con placebo. En los 18 controles sanos no se realizó determinación de ADN en saliva, por lo que sólo se usaron los datos de la detección en suero.

Larsen y cols. [1985]: Se estudió la presencia de VEB mediante la determinación de anticuerpos en suero de 100 enfermos con EM y 100 controles sanos pareados. Los autores dieron los resultados de los anticuerpos anti-VCA y anti-EBNA juntos, nosotros los separamos para poder usarlos.

Lindberg y cols. [1991]: Se realizó el trabajo a partir de sujetos con sospecha clínica de MI, en los que se determinaron AH (705 individuos) y de éstos se seleccionaron los que desarrollaron EM (3 sujetos). Nosotros tomamos como casos los sujetos con EM y como controles el resto.

Mancuso y cols. [2007]: Analizaron ADN de varios herpes virus (VHS-1 y 2, VEB, CMV, VHH-6 y VVZ) y virus JC en LCR de 38 enfermos con EM en fases RR y CP, y 47 controles.

Martin y cols. [1997]: En este trabajo los autores determinaron en LCR el ADN de VHS-1 y 2, VEB, VVZ y VHH-6 y 7 en un grupo de enfermos con EM (en fases no aguda, aguda, RR y SP) o neuritis óptica (considerados como casos) y enfermos con otras enfermedades neurológicas (considerados como controles).

Myhr y cols. [1998]: En el artículo se utilizó suero de 144 enfermos con EM, diagnosticados como EM definida, probable y posible, EMRR y EMPP, y 170 controles (cirugía plástica, ginecología y traumatología). Además de VEB se estudiaron otros herpesvirus (CMV, VHS y VVZ). Se determinaron

cualitativamente los anticuerpos IgG e IgM anti-VCA, IgG anti-EBNA e IgG anti-EA.

Morré y cols. [2001]: Realizaron detección de ADN de VEB en tejido cerebral y LCR de 35 sujetos post mórtem, 19 con EM (casos) y 16 sin EM (controles). Además se determinó el ADN del virus en LCR de 18 enfermos y 30 controles con otras enfermedades neurológicas.

Munch y cols. [1998]: Los autores realizaron detección de anticuerpos IgG anti-EA, IgM anti-EA e IgG anti-EBNA1 en suero de 138 enfermos con EM. El grupo control estuvo formado por un grupo de 138 sujetos pareados con los enfermos. Aunque otro grupo control estuvo constituido por pacientes con infección VIH, estos últimos hacían que el estudio no fuese homogéneo y no se consideraron para nuestro meta-análisis.

Nikoskelainen y cols. [1975]: Los autores realizaron el estudio en LCR y suero de varios grupos de enfermos con EM y neuritis óptica. El grupo control estuvo formado por 58 enfermos con otras enfermedades neurológicas, descartando la EM. Estudiaron VEB, virus del sarampión, virus de la rubéola, parainfluenza-1, influenza A, influenza B, grupo adenovirus, VHS, VVZ, CMV, virus de la parotiditis, Coxsackie A9, Coxsackie B5, Polio-3, Echo-6 y *Mycoplasma pneumoniae*. El estudio en suero sólo se realizó en los casos y controles que dieron positivo en LCR.

Nielsen y cols. [2007]: Se realizó el estudio buscando sujetos que tuviesen una determinación de anticuerpos heterófilos (AH) previa, por sospecha clínica de MI (1267928 sujetos), y de éstos seleccionaron los que desarrollaron EM (172 sujetos). Nosotros tomamos como casos los sujetos con EM y el resto como controles.

Pohl y cols. [2006]: Se realizó el estudio en suero de 147 niños con EM, la mayoría en fase RR, durante los primeros síntomas de la enfermedad. En este estudio no se especificó el número de individuos que eran positivos para cada uno de los anticuerpos que determinaron y dieron los resultados según la fase de la infección de los enfermos, es decir, si mostraban infección pasada (IgG anti-VCA positivo, IgG anti-EBNA1 positivo e IgG anti-EA negativo), infección reciente (IgG anti-VCA positivo, IgG anti-EBNA1 negativo)

e IgG anti-EA positivo) o sin infección (IgG anti-VCA negativo, IgG anti-EBNA1 negativo e IgG anti-EA negativo). A partir de estos datos se obtuvieron los datos individuales para cada anticuerpo. Los autores también realizaron un estudio cuantitativo de las muestras, concretamente, en 94 casos y 94 controles para la IgG anti VCA y en 71 casos y 71 controles para anti-EBNA1.

Ponsonby y cols. [2005]: Estudio en suero de 134 enfermos con EM en fases RR, SP y PP y 272 controles sanos. Los autores dieron los resultados en valores cuantitativos y cualitativos, de forma que aportaron el número de individuos seropositivos para la suma de dos anticuerpos (IgG anti-EBNA e IgG anti-VCA). Como no pudimos conocer el valor a partir del cual los autores consideraron los resultados positivos, el único dato cualitativo que se pudo extraer fielmente, fue la IgG anti-VCA.

Riverol y cols. [2007]: Se estudió la asociación entre la detección de anticuerpos frente VEB (IgG anti-EBNA) y frente VHH-6, en distintas fases de EM (RR, SP, PP, PR), en 172 enfermos y 85 controles sanos.

Sanders y cols. [1996]: Se detectó ADN de VEB, VHS-1 y 2, VVZ, CMV y VHH-6 en 37 biopsias de tejido cerebral post mórtem de sujetos con EM (sobre placas activas e inactivas) y 37 controles enfermos de Alzheimer, Parkinson y otras enfermedades no neurológicas.

Shirodaria y cols. [1987]: Los investigadores utilizaron el suero de 26 enfermos con EM y 26 controles sanos pareados para investigar anticuerpos frente varios virus como VEB, virus del sarampión y virus de la rubéola. Ofrecieron resultados cualitativos para los anticuerpos IgG anti-VCA e IgG anti-EBNA, de forma conjunta. Separamos los resultados por anticuerpos individuales para poder usarlos en el análisis. También aportaron resultados cuantitativos.

Sotelo y cols. [2007]: Se detectó ADN de VEB, VHS-1 y 2, VVZ y VHH-6 en CMSP de 171 enfermos con EM en fase RR y 130 controles sanos o con enfermedades no neurológicas. Usamos de forma conjunta los resultados de la PCR realizada para dos genes (LMP y BXL2).

Sundström y cols. [2004]: En este artículo los autores realizaron un estudio prospectivo y otro retrospectivo en suero de 234 enfermos con EM en

fases RR, PP y PR. Se determinaron los anticuerpos frente a varios virus (VEB, VHH-6, VHS, VVZ y sarampión). Los controles fueron 702 individuos sanos y estaban pareados (x3) con los casos. En nuestro estudio se unieron los resultados de los estudios prospectivos y retrospectivos para los casos y controles.

Sumaya y cols. [1980]: Estudiaron el anticuerpo IgG anti-VCA en suero de 157 enfermos con EM y 81 controles sanos. Los autores reflejaron los resultados de forma cualitativa y cuantitativa.

Sumaya y cols. [1976]: Estudio cualitativo y cuantitativo de la IgG anti-VCA en suero de 142 enfermos con EM y 74 controles sanos.

Wagner y cols. [2004]: Se determinó la presencia de ADN de VEB en suero de 31 enfermos con EM (18 mujeres con sangre extraída antes de los primeros síntomas de la enfermedad, y 13 después de los primeros síntomas pero antes del diagnóstico de EM). Los controles fueron pareados (x2) y estaban sanos.

Wandinger y cols. [2000]: Se realizó determinación de anticuerpos frente al VEB, VHS-1, VHS-2 y CMV en suero de 108 enfermos con EM (en fases aguda y no aguda, y en fases RR, SP, PP y PR) y 163 controles libres de enfermedades neurológicas. Los autores no especificaron los individuos que eran positivos para cada anticuerpo y dieron los resultados según la fase de la infección, es decir, si mostraban infección pasada o latente (IgG anti-EA negativo, IgM anti-EA negativo e IgG anti-EBNA1 positivo), infección primaria (IgG anti-EA positivo, IgM anti-EA positivo e IgG anti-EBNA1 negativo) o reactivación de la latencia (IgG anti-EA positivo, IgM anti-EA positivo e IgG anti-EBNA1 positivo). A partir de estos datos se obtuvieron los valores individuales de IgG anti-EA, IgM anti-EA e IgG anti-EBNA1. Los autores también realizaron un seguimiento mensual de 19 enfermos durante un año para comprobar la relación entre la reactivación del virus y la EM.

Zivadinov y cols. [2006]: Estudio realizado en suero de 140 enfermos con EMRR y 131 controles sanos. Se determinaron los anticuerpos frente a VEB, VHS-1 y 2, VVZ, CMV, virus del sarampión y virus de la rubéola. Para VEB se determinó IgG anti-VCA de forma cualitativa y cuantitativa.

3.2. META-ANÁLISIS

La evidencia científica no es fruto del resultado de un único esfuerzo investigador, sino de la integración y la replicación de los resultados de distintos estudios, de ahí la necesidad de realizar revisiones críticas integradoras de la literatura científica. Para ello surgió el meta-análisis, introducido por primera vez en 1976 [Glass, 1976], y en el que se realiza una revisión sistemática, es decir, se sistematiza el proceso de examen de la literatura en cuestión, con el objetivo de obtener revisiones exhaustivas y reduciendo la posibilidad de sesgos en los resultados y la interpretación. Además, se incluye la combinación estadística de los resultados de los estudios, con el objetivo de identificar patrones consistentes y las fuentes de variación entre los trabajos. Así, éste resulta ser el método adecuado, cuando su aplicación es posible, para combinar o integrar los resultados de diferentes ensayos clínicos independientes que son considerados "combinables". Aunque puede aplicarse en estudios observacionales y de evaluación de variables pronósticas y pruebas diagnósticas, su empleo más generalizado es la evaluación combinada de ensayos clínicos aleatorios.

El meta-análisis consta, básicamente, de dos componentes: uno cualitativo, donde se realiza una revisión bibliográfica exhaustiva, como hemos visto en el apartado 3.1. de esta sección, con una descripción epidemiológica de los artículos, actuando los estudios individuales como los sujetos de la investigación; y un componente cuantitativo, que es el meta-análisis propiamente dicho y que se refiere a la agrupación estadística de los resultados, obteniéndose un estimador de efecto único, que combina los efectos observados en los diferentes estudios individuales, en cada publicación y en conjunto con las demás, la significación estadística del análisis, el intervalo de confianza (IC) del 95% de la *odds ratio* (OR) y el peso de la publicación. Sin duda este último componente, que se refiere puramente a la técnica estadística, es el que tiene más impacto en el colectivo médico y el que refleja, de una manera más directa, el efecto de una determinada intervención.

Los modelos que se pueden utilizar en un meta-análisis son los llamados de efectos fijos y aleatorios. Los modelos de efectos fijos consideran que la variabilidad entre los estudios es exclusivamente debida al azar. Los estudios individuales son simplemente ponderados por su precisión, considerando que si todos ellos fueran lo suficientemente grandes, darían idénticos resultados.

Los modelos de efectos aleatorios asumen diferentes efectos en cada estudio y tienen en cuenta este hecho como fuente de variabilidad adicional. En comparación con los modelos de efectos fijos, tienden a dar un peso relativamente mayor a los estudios pequeños y sus intervalos de confianza son más amplios, por tanto, más conservadores.

Una diferencia sustancial en el efecto combinado calculado por métodos de efectos fijos y aleatorios sólo tiene lugar cuando hay una marcada heterogeneidad entre los estudios incluidos en el meta-análisis. Aunque no hay acuerdo generalizado respecto al método a utilizar, se sugiere emplear los métodos de efectos aleatorios cuando existe heterogeneidad significativa.

3.2.1. Recopilación de datos y obtención de la variable de resumen

Una vez seleccionados los 38 trabajos objeto de nuestro estudio, los datos se extrajeron con un procedimiento sistemático, rellenando un formulario creado previamente y que incluía:

- Datos bibliográficos del trabajo.
- Ciudad y país de realización del estudio.
- Número de casos y de controles (posibilidad de que estuviesen pareados).
- Valoración del diagnóstico de esclerosis múltiple según criterios de diagnóstico validados.
- Momento de inclusión de los casos, situación de la enfermedad del paciente.
- Edad de los casos y de los controles, y para los primeros, los años de evolución de la enfermedad.
- Características clínicas de los controles (sanos u otras enfermedades, descartando esclerosis múltiple)

- Microorganismo, marcador de infección analizado, muestra clínica, prueba de laboratorio empleada.
- Número de resultados positivos y negativos entre los casos y entre los controles.

Se empleó como variable de resumen de la asociación entre VEB y EM la *OR* de la tabla 2x2 construida con los casos, los controles, el número de casos positivos y el número de casos negativos. Cuando algunas de las casillas era cero se aplicó la corrección por continuidad, consistente en añadir a todas las casillas de la tabla 0,5, quedando incrementado el número de casos y el número de controles en una unidad. Con esta corrección por continuidad se podía aplicar la metodología posterior a todos los estudios.

3.2.2. Evaluación de la heterogeneidad de los estudios

Existen varios métodos estadísticos que permiten evaluar el grado de heterogeneidad, es decir, la valoración de hasta qué punto los resultados que provienen de diferentes estudios pueden ser resumidos en una única medida. La mayoría de las pruebas estadísticas que determinan la heterogeneidad se basan en la hipótesis de que la variabilidad entre estudios es nula. La evaluación de la heterogeneidad entre los estudios, en nuestro meta-análisis, se llevó a cabo empleando el estadístico *Q* de *Cochran* que sigue una distribución chi-cuadrado con el número de estudios involucrados menos 1 grado de libertad. No obstante, esta prueba tiene un comportamiento errático y, mientras que para un número pequeño de estudios suele ser muy conservador, cuando el número de estudios es grande es excesivamente liberal, por lo que se empleó una medida de la variabilidad de la *OR* conjunta que es debida a la heterogeneidad de los estudios, la *I²* de *Higgins*, que responde a la expresión:

$$I^2 = (Q - df) / Q$$

Valores muy altos de la medida, por encima de 0,75, hablan de una fuerte heterogeneidad y sugieren una evaluación más detallada de los subgrupos de estudios que puede haber en el meta-análisis. Así, una medida

elevada nos llevó a separar estudios tras el comentario oportuno y a reestimar la *OR* conjunta. También se utilizó la estimación de la varianza entre estudios, *tau*, para caracterizar la variabilidad entre éstos.

3.2.3. Combinación de los resultados de los diferentes estudios

Considerados los estudios del subgrupo elegido se llevó a cabo la estimación conjunta de las *OR* empleando el método de Der Simonian y Laird [1986]. Este método, que es un modelo de efectos aleatorios, es el que se deja afectar menos por la heterogeneidad de los estudios. La ponderación de los estudios bajo este tipo de modelo considera no sólo su propia varianza (variabilidad intra-estudio), sino también la que pueda existir entre los estudios (variabilidad inter-estudios).

El modelo de efectos aleatorios consiste en la combinación de la *OR* de los distintos artículos según las expresiones que figuran a continuación.

Supóngase que se disponen de *k* artículos en los que ha sido imposible estimar sus *OR* individuales, y que cada uno de ellos tiene un error estándar asociado. La primera forma de ponderar los resultados sería empleando la inversa de la varianza de la *OR*, así tendríamos una expresión como la siguiente:

$$w_i = 1/e\epsilon^2_i$$

Sin embargo, estas ponderaciones no consideran los estudios como procedentes de un modelo de efectos aleatorios sino de efectos fijos, por lo que para considerarlo como de efectos aleatorios tendríamos que calcular esta otra expresión:

$$w'_i = 1/e\epsilon^2_i + \tau$$

en la que aparece un término que describiremos a continuación, en toda su complejidad:

$$\tau = Q - (k - 1)/\Sigma w_i - (\Sigma_i w_i^2 / \Sigma_i w_i)$$

$$Q = \Sigma_i [w_i [In\hat{O}_i - In\hat{O}_{MH}]^2]$$

donde $\ln\hat{O}_{MH}$ es el logaritmo de las *OR* supuesto un modelo de efectos fijos.

Con estas ponderaciones, el estimador conjunto de la *OR* de Der Simonian y Laird y su error estándar serían:

$$\hat{O}_{DL} = \exp\left[\frac{\sum_i w_i' \ln \hat{O}_i'}{\sum_i w_i'}\right]$$

$$ee(\hat{O}_{DL}) = 1/\sum_i w_i'$$

Con esta expresión corregimos los efectos aleatorios y obtenemos un estimador no afectado por la posible heterogeneidad entre estudios.

3.2.4. Evaluación de la calidad de los estudios

Finalmente, se extrajeron los datos correspondientes para la evaluación de la calidad. Se utilizó la escala de puntuación de calidad de casos y controles de Newcastle-Otawa (NOS) [Weels y cols., 2004]. Este análisis estuvo compuesto de tres partes:

- En el primero, denominado selección (S), se evaluó si la elección de los casos y controles fue la adecuada, es decir, si los grupos de casos y controles estaban bien definidos y si eran representativos. En este apartado se pudo adjudicar un máximo de cuatro puntos.
- La segunda parte consistió en la comparabilidad (C) entre casos y controles, es decir, si estaban pareados. En este apartado se podían adjudicar como máximo dos puntos.
- Y en el último apartado, la exposición (E), se evaluó si se utilizó un método fiable para asegurar la presencia del virus, si se utilizó el mismo en los casos y controles, y si era de calidad. En este apartado el máximo adjudicado fue de cuatro puntos.

Por lo tanto, el artículo de mayor calidad podía tener hasta diez puntos.

Escala de Casos y Controles de Newcastle-Otawa (NOS)

SELECCIÓN

1. ¿Es la definición de caso adecuada?
 - a. Sí, con una validación independiente. Criterios internacionales. *
 - b. Sí, con criterios propios.
 - c. No hay descripción.
2. Representatividad de los casos
 - a. Todos los casos definidos durante un periodo definido, en un distrito, hospital, o centro definidos, o una muestra randomizada de estos casos. *
 - b. No cumple los requisitos de a).
3. Selección de los controles
 - a. Comunidad de controles (la misma comunidad que los casos y serían casos si desarrollaran el efecto)*
 - b. Controles hospitalarios
 - c. No describe los controles
4. Definición de los controles
 - a. No antecedentes de enfermedad (si en los casos se valora la aparición de un nuevo episodio, entonces los controles pueden haber sufrido previamente algún episodio)*
 - b. No describen la fuente

COMPARABILIDAD

5. Los casos y los controles están asociados por factores que aseguran su comparabilidad. 1 factor*, 2 factores **. (Afirmaciones de no diferencias entre grupos o que las diferencias no son estadísticamente significativas no es suficiente)

EXPOSICIÓN

6. Comprobación de la exposición
 - a. Registro seguro *
 - b. Técnica estructurada ciega para el estado caso/control *
 - c. Técnica no ciega para el estado caso/control
 - d. Técnica propia o registro médico
 - e. Sin descripción
 7. Mismo método de comprobación para casos y controles
 - f. Sí *
 - g. No
 8. Porcentaje de pérdidas
 - h. Igual para ambos grupos *
 - i. No se describen
 - j. Diferentes
-

Además, en aquellas situaciones en las que el número de estudios, cuya calidad fuese superior a la media de la de los trabajos evaluados, fuese mayor o igual a 3, se llevó a cabo una meta-regresión empleando el método REML (*Restricted Maximum Likelihood*) para determinar si existía relación entre la calidad del artículo y la estimación de la *OR* del mismo.

3.2.5. Software estadístico

Para realizar el meta-análisis, los datos extraídos de los diferentes estudios fueron analizados empleando el paquete estadístico STATA release 10.1.

3.3. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES PARA DETERMINAR LA POSIBLE RELACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR VEB Y EM

3.3.1. Pacientes y muestras

Se realizó un estudio de casos y controles cuyas características se definen en las tablas 10 y 11, respectivamente. Todos los sujetos fueron reclutados entre enero de 2002 y abril de 2005. Tras ser informados, se realizó extracción de sangre (de la que se obtuvieron suero y células mononucleares) y LCR.

El grupo de casos estuvo formado por 76 enfermos con EM que habían sido diagnosticados de la enfermedad según los criterios diagnósticos de Poser y cols., [1983], en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada desde junio de 1973 hasta enero de 2005. Fueron 62 mujeres y 14 hombres. De los 76 pacientes, 55 estaban en fase RR y 21 en fase PS.

La edad media (\pm desviación estándar) de todos los sujetos fue 34,9 (\pm 9,7) años y un rango entre 18 y 59 años ($34,3 \pm 9,8$, rango 18-59 para las mujeres y $37,5 \pm 9,6$, rango 28-58 para los hombres). Los pacientes en fase RR tuvieron una media de edad de 32,0 (\pm 8,0) años y un rango de 18-52, mientras que los pacientes en fase PS tuvieron una media de 42,6 (\pm 9,9) años y un rango de 25-59. El tiempo medio de evolución de la enfermedad, desde el diagnóstico hasta el momento de la inclusión en el estudio, fue de 8 (\pm 8,1) años y un rango entre 15 días y 29,5 años ($8,2 \pm 8,3$ para las mujeres, $7,2 \pm 7,5$ para los hombres, $5,2 \pm 5,9$ para los pacientes en fase RR y $15,3 \pm 8,6$ para los pacientes en fase PS).

El grupo control estuvo constituido por 75 sujetos, 49 mujeres y 26 hombres. Todos ellos fueron reclutados en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada a partir de pacientes en los que se realizó raquianestesia para cirugía menor. Se descartó en ellos los antecedentes de cualquier enfermedad neurológica y autoinmune, mediante un protocolo clínico. Al igual que en los casos, a todos ellos se les extrajeron muestras de sangre y LCR en el momento de su inclusión en el estudio. La edad media del grupo fue de 45,55 (\pm 12,88) años y un rango entre 20 y 73 años ($43,9 \pm 12,6$, rango 20-73 para las mujeres y $48,6 \pm 13,1$, rango 25-72 para los hombres).

Tras la extracción de sangre y LCR a cada sujeto de estudio, caso o control, se obtuvieron un total de 453 muestras (151 muestras de LCR, 151 muestras de suero y 151 muestras de CMSP). Todas las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su posterior utilización en los diferentes procedimientos que serán descritos en los apartados siguientes.

Tabla 10. Características de los casos

| Código del paciente | Sexo | Fecha inclusión | Edad | Fecha diagnóstico EM | Forma clínica | Tiempo evolución (años) |
|---------------------|------|-----------------|------|----------------------|---------------|-------------------------|
| P001 | M | 28/01/2002 | 29 | 06/07/2001 | RR | 0,56 |
| P003 | M | 08/02/2002 | 24 | 18/10/1997 | RR | 4,31 |
| P007 | M | 12/03/2002 | 25 | 15/09/1990 | PS | 11,49 |
| P016 | M | 12/04/2002 | 40 | 15/01/1998 | RR | 4,43 |
| P021 | M | 06/05/2002 | 33 | 15/06/1987 | PS | 14,89 |
| P023 | M | 07/05/2002 | 33 | 15/06/1994 | PS | 7,89 |
| P027 | M | 15/05/2002 | 29 | 15/04/1999 | RR | 3,08 |
| P028 | M | 21/05/2002 | 29 | 15/03/1990 | PS | 12,18 |
| P029 | H | 21/05/2002 | 37 | 15/03/2001 | RR | 1,18 |
| P030 | M | 13/06/2002 | 34 | 15/08/1998 | RR | 3,83 |
| P031 | M | 13/06/2002 | 26 | 15/06/1991 | RR | 10,99 |
| P032 | M | 21/06/2002 | 36 | 15/06/1994 | RR | 8,02 |
| P033 | M | 21/06/2002 | 25 | 15/01/1999 | RR | 3,43 |
| P035 | H | 04/07/2002 | 28 | 15/07/2001 | RR | 0,97 |
| P037 | H | 24/07/2002 | 31 | 21/05/2002 | RR | 0,18 |
| P038 | H | 24/07/2002 | 43 | 15/06/1986 | PS | 16,11 |
| P040 | M | 20/08/2002 | 38 | 15/02/2002 | RR | 0,51 |
| P042 | M | 01/10/2002 | 42 | 15/06/1981 | PS | 21,29 |
| P043 | M | 07/10/2002 | 33 | 15/06/1986 | RR | 16,31 |
| P045 | H | 10/10/2002 | 52 | 15/06/1992 | RR | 10,32 |
| P047 | M | 11/10/2002 | 41 | 15/04/1996 | PS | 6,49 |
| P048 | M | 15/10/2002 | 27 | 15/06/1991 | RR | 11,33 |
| P049 | M | 16/10/2002 | 31 | 15/05/1992 | RR | 10,42 |
| P051 | M | 17/10/2002 | 41 | 15/12/2001 | RR | 0,84 |
| P052 | M | 30/10/2002 | 21 | 28/08/2002 | RR | 0,17 |
| P055 | M | 12/11/2002 | 44 | 15/06/1974 | RR | 28,41 |
| P058 | M | 26/11/2002 | 45 | 15/06/2001 | RR | 1,45 |
| P060 | M | 27/11/2002 | 59 | 15/06/1973 | PS | 29,45 |
| P064 | M | 10/12/2002 | 37 | 15/06/1998 | RR | 4,49 |
| P079 | M | 10/03/2003 | 32 | 15/06/1993 | RR | 9,74 |
| P080 | M | 11/03/2003 | 40 | 15/10/2001 | RR | 1,41 |
| P081 | M | 12/03/2003 | 24 | 15/10/1999 | RR | 3,41 |

Tabla 10. Características de los casos (continuación)

| Código del paciente | Sexo | Fecha inclusión | Edad | Fecha diagnóstico EM | Forma clínica | Tiempo evolución (años) |
|---------------------|------|-----------------|------|----------------------|---------------|-------------------------|
| P083 | M | 20/03/2003 | 42 | 15/06/1985 | RR | 17,76 |
| P084 | M | 03/04/2003 | 26 | 15/03/2002 | RR | 1,05 |
| P088 | M | 16/04/2003 | 52 | 15/06/1975 | PS | 27,84 |
| P097 | H | 09/05/2003 | 35 | 15/06/1995 | RR | 7,90 |
| P098 | M | 13/05/2003 | 21 | 15/06/2000 | RR | 2,91 |
| P099 | M | 14/05/2003 | 25 | 15/06/2000 | RR | 2,91 |
| P100 | M | 22/05/2003 | 25 | 01/06/1997 | RR | 5,98 |
| P103 | M | 03/06/2003 | 55 | 15/06/1988 | PS | 14,97 |
| P106 | M | 09/06/2003 | 38 | 15/11/2002 | RR | 0,57 |
| P120 | M | 28/08/2003 | 36 | 15/06/1997 | PS | 6,20 |
| P121 | M | 04/09/2003 | 51 | 15/06/1979 | RR | 24,22 |
| P122 | M | 04/09/2003 | 26 | 15/06/2002 | RR | 1,22 |
| P123 | M | 05/09/2003 | 18 | 15/01/2003. | RR | 0,64 |
| P127 | M | 24/09/2003 | 37 | 15/06/1993 | PS | 10,28 |
| P131 | M | 30/09/2003 | 31 | 15/06/1993 | RR | 10,29 |
| P133 | H | 15/10/2003 | 36 | 15/06/2000 | PS | 3,33 |
| P138 | H | 23/10/2003 | 37 | 15/03/2001 | RR | 2,61 |
| P142 | M | 29/10/2003 | 38 | 15/06/1999 | PS | 4,37 |
| P145 | M | 03/12/2003 | 18 | 15/01/2001 | RR | 2,88 |
| P147 | M | 12/12/2003 | 56 | 15/06/1988 | PS | 15,49 |
| P149 | M | 17/12/2003 | 26 | 15/10/1994 | RR | 9,17 |
| P152 | M | 27/01/2004 | 31 | 15/09/1997 | RR | 6,37 |
| P155 | M | 28/01/2004 | 40 | 10/01/2004 | RR | 0,05 |
| P159 | M | 25/02/2004 | 42 | 15/06/1976 | PS | 27,69 |
| P161 | M | 11/03/2004 | 38 | 15/11/2002 | RR | 1,32 |
| P162 | M | 11/03/2004 | 22 | 15/01/2004 | RR | 0,16 |
| P165 | M | 15/04/2004 | 24 | 15/09/2002 | RR | 1,58 |
| P166 | H | 15/04/2004 | 28 | 15/08/2003 | RR | 0,67 |
| P168 | H | 20/04/2004 | 49 | 15/06/1984 | PS | 19,85 |
| P169 | M | 04/05/2004 | 36 | 15/11/2001 | RR | 2,47 |
| P175 | H | 02/06/2004 | 34 | 15/06/2000 | PS | 3,96 |
| P177 | M | 21/06/2004 | 38 | 15/06/1998 | RR | 6,02 |
| P181 | M | 05/07/2004 | 28 | 15/06/1996 | RR | 8,06 |
| P183 | M | 06/07/2004 | 25 | 13/06/2003 | RR | 1,06 |
| P186 | H | 21/07/2004 | 28 | 15/06/2003 | RR | 1,10 |
| P188 | H | 27/07/2004 | 58 | 15/06/1982 | PS | 22,12 |
| P190 | M | 17/11/2004 | 52 | 15/06/1975 | PS | 29,42 |
| P197 | H | 14/12/2004 | 29 | 15/12/1994 | RR | 10,00 |
| P202 | M | 01/02/2005 | 26 | 18/10/1997 | RR | 7,29 |
| P204 | M | 10/02/2005 | 44 | 15/06/1988 | PS | 16,65 |
| P207 | M | 16/02/2005 | 22 | 15/01/2005 | RR | 0,09 |
| P208 | M | 15/03/2005 | 45 | 15/06/2004 | RR | 0,75 |
| P209 | M | 15/03/2005 | 39 | 15/06/1998 | RR | 6,75 |
| P210 | M | 30/03/2005 | 37 | 15/06/2002 | RR | 2,79 |

Tabla 11. Características de los controles

| Código del paciente | Sexo | Fecha inclusión | Edad | Código del paciente | Sexo | Fecha inclusión | Edad | Código del paciente | Sexo | Fecha inclusión | Edad |
|---------------------|------|-----------------|------|---------------------|------|-----------------|------|---------------------|------|-----------------|------|
| P002 | M | 28/01/2002 | 73 | P109 | H | 13/06/2003 | 40 | P163 | M | 15/03/2004 | 25 |
| P004 | M | 08/02/2002 | 46 | P117 | M | 26/08/2003 | 43 | P164 | M | 25/03/2004 | 51 |
| P006 | H | 06/03/2002 | 38 | P124 | H | 05/09/2003 | 70 | P167 | H | 16/04/2004 | 32 |
| P008 | M | 12/03/2002 | 30 | P125 | M | 16/09/2003 | 41 | P170 | M | 06/05/2004 | 66 |
| P017 | H | 24/04/2002 | 60 | P126 | H | 24/09/2003 | 32 | P171 | H | 10/05/2004 | 70 |
| P019 | M | 29/04/2002 | 52 | P128 | M | 29/09/2003 | 41 | P172 | M | 12/05/2004 | 32 |
| P024 | M | 09/05/2002 | 40 | P129 | M | 29/09/2003 | 61 | P174 | M | 19/05/2004 | 45 |
| P036 | H | 04/07/2002 | 25 | P130 | M | 30/09/2003 | 67 | P176 | H | 08/06/2004 | 45 |
| P041 | M | 30/09/2002 | 32 | P134 | M | 20/10/2003 | 63 | P180 | M | 01/07/2004 | 58 |
| P050 | M | 17/10/2002 | 41 | P135 | M | 20/10/2003 | 32 | P182 | M | 06/07/2004 | 41 |
| P053 | M | 30/10/2002 | 48 | P136 | M | 22/10/2003 | 40 | P187 | M | 22/07/2004 | 44 |
| P059 | H | 27/11/2002 | 47 | P139 | M | 27/10/2003 | 47 | P191 | M | 17/11/2004 | 54 |
| P063 | M | 04/12/2002 | 37 | P140 | M | 28/10/2003 | 33 | P192 | M | 24/11/2004 | 61 |
| P065 | M | 13/01/2003 | 26 | P141 | M | 29/10/2003 | 38 | P193 | H | 24/11/2004 | 54 |
| P077 | M | 20/02/2003 | 68 | P143 | M | 30/10/2003 | 27 | P195 | H | 14/12/2004 | 54 |
| P078 | M | 05/03/2003 | 27 | P144 | M | 19/11/2003 | 60 | P196 | M | 14/12/2004 | 42 |
| P082 | M | 18/03/2003 | 40 | P146 | H | 03/12/2003 | 69 | P199 | H | 12/01/2005 | 72 |
| P085 | H | 04/04/2003 | 52 | P148 | M | 15/12/2003 | 39 | P200 | H | 12/01/2005 | 53 |
| P086 | H | 04/04/2003 | 43 | P151 | M | 22/12/2003 | 20 | P201 | H | 12/01/2005 | 63 |
| P094 | M | 30/04/2003 | 43 | P153 | H | 27/01/2004 | 32 | P203 | M | 03/02/2005 | 59 |
| P101 | H | 26/05/2003 | 48 | P154 | M | 28/01/2004 | 43 | P205 | H | 10/02/2005 | 55 |
| P102 | M | 28/05/2003 | 41 | P156 | M | 05/02/2004 | 48 | P206 | M | 16/02/2005 | 23 |
| P104 | M | 05/06/2003 | 47 | P157 | M | 24/02/2004 | 41 | P211 | H | 05/04/2005 | 39 |
| P105 | H | 06/06/2003 | 43 | P158 | M | 24/02/2004 | 37 | P212 | H | 06/04/2005 | 48 |
| P108 | H | 11/06/2003 | 43 | P160 | M | 27/02/2004 | 40 | P213 | H | 20/04/2005 | 36 |

3.3.2. Cálculo del índice de anticuerpos en LCR

Diversos grupos han intentado, mediante fórmulas matemáticas, separar el componente IgG producido dentro del SNC (síntesis intratecal) del componente IgG procedente del suero (trasudado). En un aumento patológico del contenido de proteínas en LCR la fracción IgG LCR/ IgG suero y el coeficiente de albúmina están alterados respecto a las situaciones no patológicas, es decir, nos encontramos una fracción elevada de IgG y albúmina en LCR respecto al suero [Reiber, 1980]. La fórmula de Tourtellotte [Tourtellotte, 1970] o la de Reiber y Felgenhauer [Reiber y Felgenhauer, 1987] utilizan la proporcionalidad entre los cocientes LCR/suero de la albúmina con la IgG. Estas ecuaciones corrigen el aumento de proteína trasudada desde el suero debida a la ruptura de la barrera hematoencefálica, mediante coeficientes establecidos para cada proteína (IgG, IgM, etc.).

El cálculo de la fórmula de Reiber permite realizar una gráfica en la que se sitúa en el eje de abscisas el cociente entre la IgG en el LCR corregido y en el suero, y en las ordenadas, el cociente entre la albúmina en el LCR corregido y en el suero, de forma que, según donde se sitúe el punto de intersección entre estos valores, puede verse la relación entre la IgG de síntesis intratecal y la procedente del suero de manera muy sencilla: si los valores son normales el punto de intersección se encuentra en la banda central de normalidad; si existe síntesis intratecal de IgG, el punto de intersección se sitúa en la zona a la izquierda de la normalidad; y si hay un trasudado de inmunoglobulinas, se sitúa en la zona a la derecha de la normalidad [Fernández y cols., 2005].

Para determinar la producción intratecal de IgG se obtuvieron los valores de albúmina y de IgG totales en LCR y suero mediante una técnica de nefelometría inmunoquímica (Dade Behring Nephelometer, Marburg, Alemania). La producción intratecal de IgG fue determinada cuantitativamente mediante el estudio del diagrama de la fracción IgG LCR/suero frente al coeficiente de albúmina, según el procedimiento descrito por Reiber y Peter, [2001].

El análisis de la presencia de síntesis intratecal de anticuerpos específicos frente a determinados antígenos representa un importante apoyo

para el diagnóstico de las enfermedades neurológicas. El cálculo del índice de anticuerpos (IA) es un métodos sensible y específico para el diagnóstico de éstas [Reiber y Lange, 1991; Reiber y Peter, 2001]. Esta producción específica de anticuerpos se determinó mediante la fórmula introducida por Felgenhauer y cols. [1985]:

$$IA = \frac{Q_{spec}}{Q_{IgG (total)}}$$

donde:

$$Q_{spec} = \frac{DO_{LCR}}{DO_{suero}}$$

$$Q_{IgG} = \frac{IgG_{LCR}}{IgG_{suero}}$$

y, por lo tanto:

$$IA = \frac{DO_{LCR}/DO_{suero}}{IgG_{LCR}/IgG_{suero}} = \frac{DO_{LCR} \times IgG_{suero}}{DO_{suero} \times IgG_{LCR}}$$

En nuestro caso, se analizaron los anticuerpos específicos frente al antígeno EBNA1 en LCR y suero mediante un procedimiento de ELISA. Para ello, al realizar la técnica, el LCR y el suero fueron diluidos para obtener la misma concentración de IgG (ver procedimiento de ELISA en apartado 3.3.3.), quedando, definitivamente:

$$IA = \frac{DO_{LCR}}{DO_{suero}}$$

El rango normal de referencia para IA se estableció entre 0,7 y 1,3 ($1,0 \pm 2$ DE), y se definió la existencia de síntesis intratecal de anticuerpos específicos cuando el cociente de la absorbancia de la IgG específica anti-EBNA1 entre LCR y suero fue superior o igual a 1,5 [Reiber y Lange, 1991].

Cuando la $Q_{IgG (total)}$ fue mayor que Q_{lim} , se realizó una corrección según la fórmula:

$$IA = \frac{Q_{spec}}{Q_{lim}}$$

donde Q_{lim} representó la fracción de IgG en LCR procedente únicamente de sangre y se calculó según el procedimiento propuesto por Reiber y Lange [1991].

3.3.3. Determinación de la presencia de anticuerpos IgG anti-EBNA1 en suero y LCR

La determinación de la presencia de anticuerpos IgG anti-EBNA1 se realizó mediante un procedimiento de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) indirecto. Este método está basado en la reacción antígeno-anticuerpo, es decir, en la unión de los anticuerpos presentes en una muestra con un antígeno específico unido a la superficie de una fase sólida, habitualmente de poliestireno (figura 16).

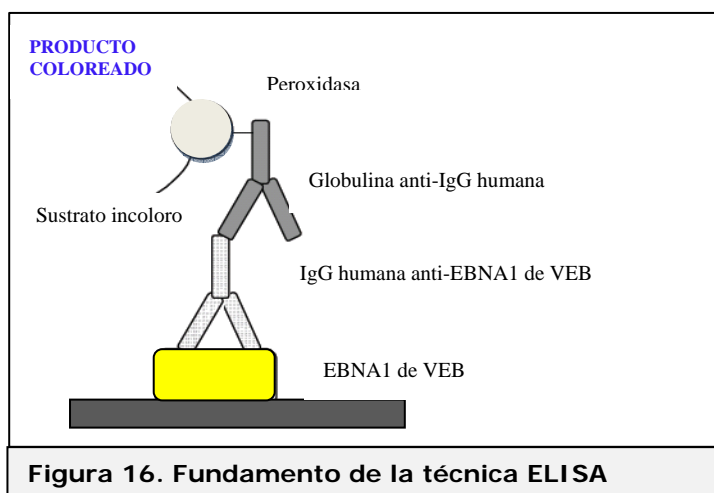


Figura 16. Fundamento de la técnica ELISA

En nuestro caso se realizó una modificación del ensayo "EPSTEIN-BARR EBNA ELISA IgG" (Vircell SL, Granada, España), según el protocolo que se muestra en la figura 17. Para ello:

- Se añadieron 100 μ l de diluyente de muestras a todos los pocillos en los que se emplearían los controles del procedimiento (1 control positivo, 1 control negativo y 1 calibrador). Se añadieron 5 μ l del control positivo, 5 μ l del control negativo y 5 μ l del calibrador por duplicado.
- Las muestras de LCR se diluyeron en una relación 1:1 con el diluyente de muestras, en un volumen final de 100 μ l en cada pocillo.

- Para que, en la técnica de ELISA, la concentración de IgG en suero equivaliese a la concentración de IgG en LCR, las muestras de suero se diluyeron a diferentes concentraciones (tabla 13) en un volumen final de 100 µl en cada pocillo. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Dilución suero} = (\text{IgG}_{\text{suero}} / \text{IgG}_{\text{LCR}}) \times 2$$

- Se agitó la placa durante 2 minutos para homogeneizar las mezclas
- Se cubrió la placa y se incubó 45 minutos a 37°C
- Se realizaron cinco lavados con la respectiva solución de lavado
- Se añadieron 100 µl de conjugado IgG en cada pocillo (muestras de LCR y suero, controles y calibradores)
- Se cubrió la placa e incubó 30 minutos a 37°C
- Se realizaron cinco lavados con la respectiva solución de lavado
- Se añadieron 100 µl de sustrato TMB en cada pocillo
- Se incubó la placa 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad
- Se añadieron 50 µl de solución de parada en cada pocillo
- Por último, la absorbancia (DO) de las muestras se determinó antes de los 60 minutos en un espectrofotómetro (ELx800, Bio-Tek Instruments, Estados Unidos) a 450 nm y un filtro de referencia de 620 nm

La reproducibilidad de los resultados fue previamente comprobada mediante la repetición del procedimiento en el primer 25% de las muestras, aceptando variaciones en los resultados de absorbancia de menos del 5%.

Cada ensayo fue validado según los parámetros descritos en la tabla 12.

Tabla 12. Validación de resultados

| Control | DO |
|------------------|--|
| Control positivo | > 0,9 |
| Control negativo | < 0,55 |
| Calibradores | < 0,7 x DO control positivo > 1,5 x DO control negativo |

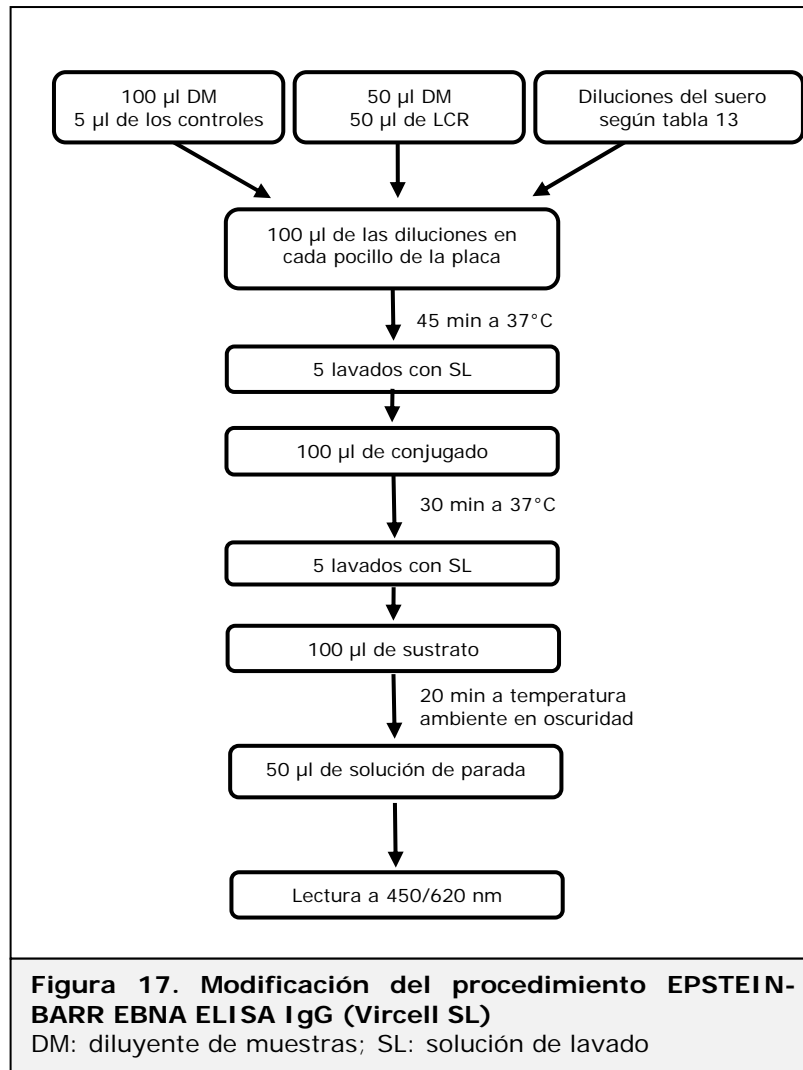


Tabla 13. Diluciones de las muestras de suero en la técnica de ELISA

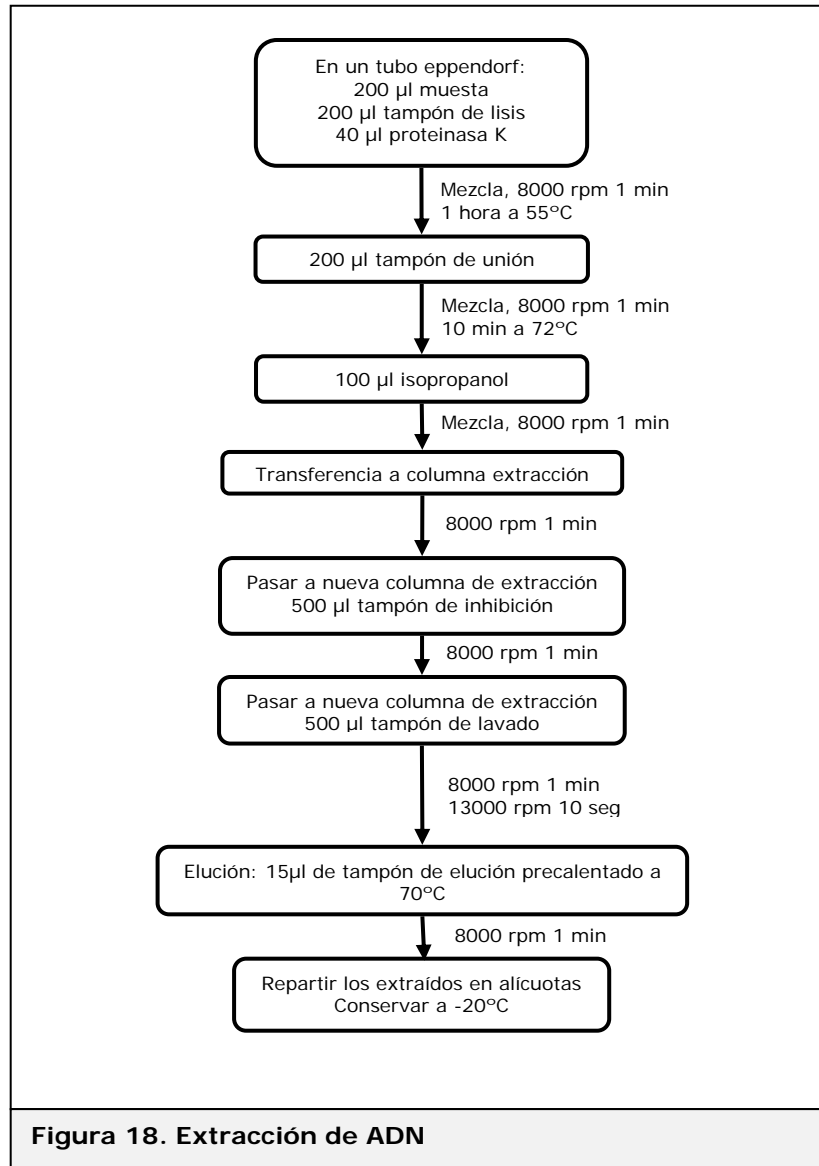
| | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Código | P001 | P002 | P003 | P004 | P006 | P007 | P008 | P016 | P017 | P019 | P021 |
| Dilución | 1/400 | 1/1100 | 1/350 | 1/1200 | 1/850 | 1/450 | 1/1550 | 1/400 | 1/550 | 1/450 | 1/200 |
| Código | P023 | P024 | P027 | P028 | P029 | P030 | P031 | P032 | P033 | P035 | P036 |
| Dilución | 1/450 | 1/850 | 1/300 | 1/300 | 1/450 | 1/800 | 1/1100 | 1/750 | 1/550 | 1/250 | 1/1000 |
| Código | P037 | P038 | P040 | P041 | P042 | P043 | P045 | P047 | P048 | P049 | P050 |
| Dilución | 1/250 | 1/100 | 1/750 | 1/1000 | 1/600 | 1/550 | 1/250 | 1/450 | 1/400 | 1/450 | 1/1150 |
| Código | P051 | P052 | P053 | P055 | P057 | P058 | P059 | P060 | P063 | P064 | P065 |
| Dilución | 1/800 | 1/950 | 1/1050 | 1/1000 | 1/700 | 1/350 | 1/850 | 1/450 | 1/1000 | 1/550 | 1/1750 |
| Código | P077 | P078 | P079 | P080 | P081 | P082 | P083 | P084 | P085 | P086 | P088 |
| Dilución | 1/400 | 1/800 | 1/1250 | 1/400 | 1/550 | 1/1150 | 1/1050 | 1/300 | 1/750 | 1/850 | 1/200 |
| Código | P093 | P094 | P097 | P098 | P099 | P100 | P101 | P102 | P103 | P104 | P105 |
| Dilución | 1/500 | 1/1450 | 1/600 | 1/300 | 1/350 | 1/250 | 1/750 | 1/750 | 1/800 | 1/1050 | 1/800 |
| Código | P106 | P108 | P109 | P117 | P119 | P120 | P121 | P122 | P123 | P124 | P125 |
| Dilución | 1/900 | 1/750 | 1/500 | 1/950 | 1/750 | 1/600 | 1/600 | 1/600 | 1/200 | 1/850 | 1/750 |
| Código | P126 | P127 | P128 | P129 | P130 | P131 | P132 | P133 | P134 | P135 | P136 |
| Dilución | 1/450 | 1/800 | 1/550 | 1/1250 | 1/650 | 1/400 | 1/950 | 1/350 | 1/1500 | 1/1200 | 1/1400 |
| Código | P137 | P138 | P139 | P140 | P141 | P142 | P143 | P144 | P145 | P146 | P147 |
| Dilución | 1/1450 | 1/350 | 1/1500 | 1/1100 | 1/1300 | 1/1250 | 1/1150 | 1/950 | 1/350 | 1/900 | 1/450 |
| Código | P148 | P149 | P150 | P151 | P152 | P153 | P154 | P155 | P156 | P157 | P158 |
| Dilución | 1/500 | 1/550 | 1/900 | 1/750 | 1/1000 | 1/50 | 1/1000 | 1/1000 | 1/1000 | 1/500 | 1/1350 |
| Código | P159 | P160 | P161 | P162 | P163 | P164 | P165 | P166 | P167 | P168 | P169 |
| Dilución | 1/1100 | 1/1300 | 1/950 | 1/800 | 1/1700 | 1/1250 | 1/900 | 1/350 | 1/50 | 1/200 | 1/600 |
| Código | P170 | P171 | P172 | P173 | P174 | P175 | P176 | P177 | P178 | P179 | P180 |
| Dilución | 1/1300 | 1/400 | 1/1750 | 1/1000 | 1/700 | 1/250 | 1/500 | 1/400 | 1/900 | 1/1200 | 1/1100 |
| Código | P181 | P182 | P183 | P184 | P185 | P186 | P187 | P188 | P189 | P190 | P191 |
| Dilución | 1/700 | 1/1250 | 1/800 | 1/700 | 1/1150 | 1/550 | 1/350 | 1/350 | 1/900 | 1/200 | 1/650 |
| Código | P192 | P193 | P195 | P196 | P197 | P198 | P199 | P200 | P201 | P202 | P203 |
| Dilución | 1/700 | 1/500 | 1/350 | 1/850 | 1/400 | 1/900 | 1/350 | 1/1050 | 1/650 | 1/350 | 1/450 |
| Código | P204 | P205 | P206 | P207 | P208 | P209 | P210 | P211 | P212 | P213 | |
| Dilución | 1/450 | 1/500 | 1/1100 | 1/550 | 1/650 | 1/450 | 1/450 | 1/1100 | 1/1350 | 1/800 | |

3.3.4. Detección de ADN de VEB en LCR, suero y CMSP

3.3.4.1. Extracción del ADN

La extracción de ADN a partir de las muestras de LCR, suero y CMSP se realizó mediante el equipo "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostics, Alemania). El esquema del procedimiento realizado se describe en la figura 18 y constó de los siguientes pasos:

- Se pusieron 200 μ l de cada muestra en un tubo eppendorf y se añadieron 200 μ l de tampón de lisis (urea 4M, tris 200mM, NaCl 20mM y EDTA 200mM) y 40 μ l de proteinasa K
- Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm
- Se puso el tubo eppendorf en un baño a 55°C durante 1 hora
- Se añadieron 200 μ l de tampón de unión (guanidina-HCl 6M, urea 10mM, tris-HCl 10mM, Triton X-100)
- Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm
- Se puso el tubo eppendorf en un baño a 72°C durante 10 minutos
- Se añadieron 100 μ l de isopropanol
- Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm
- Se transfirió todo el volumen a una columna de extracción
- Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm
- Se transfirió todo el volumen a una nueva columna de extracción y se añadieron 500 μ l de tampón de inhibición (guanidina-HCl 5M, tris-HCl 20mM)
- Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm
- Se transfirió todo el volumen a una nueva columna de extracción y se añadieron 500 μ l de tampón de lavado (NaCl 20mM, tris-HCl 2mM)
- Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm
- Se centrifugó durante 10 segundos a 13000 rpm
- Se añadieron 15 μ l de tampón de elusión (tris-HCl 10mM) precalentado a 70°C
- Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm
- El ADN extraído se conservó a -20°C
- La concentración de ADN fue determinado mediante espectrofotometría a 260 nm con un espectrofotómetro (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad, España).



3.3.4.2. Nested-PCR

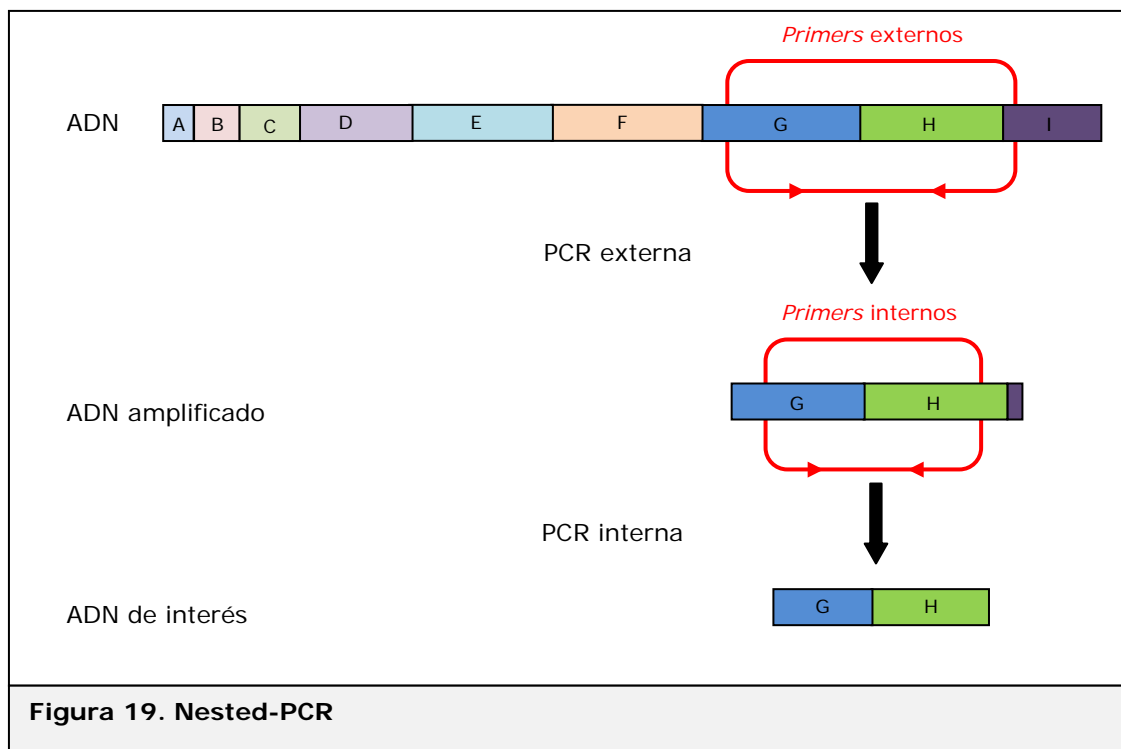
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) [Mullis y cols., 1986] es una técnica que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico mediante síntesis enzimática *in vitro* a partir de mínimas cantidades de material de partida. La técnica copia la doble cadena de ADN consiguiendo, por repetición del proceso, una amplificación exponencial del material genético. Usa dos oligonucleótidos sintéticos (complementarios a los extremos de la secuencia diana y en sentido antiparalelo uno respecto a otro) como cebadores o iniciadores (*primers*) de una reacción de replicación catalizada por una ADN polimerasa termoestable.

La amplificación es el resultado de la repetición de una serie de ciclos compuestos de tres fases: desnaturalización (ruptura, mediante la aplicación de temperatura elevada seguida de un enfriamiento rápido, de los puentes de hidrógeno que mantienen la doble cadena de ADN, dando lugar a dos cadenas sencillas sobre las cuales pueda actuar la ADN polimerasa), hibridación (se hace descender la temperatura para que los *primers* puedan unirse específicamente a las secuencias complementarias en el ADN diana) y elongación (la Taq-ADN polimerasa utiliza los nucleótidos presentes en el medio para sintetizar la cadena complementaria a partir del cebador hibridado con su secuencia diana en sentido 5' a 3').

Las nuevas cadenas de ADN, producidas en cada ciclo, sirven de molde en el ciclo siguiente, por lo que la repetición de un ciclo de PCR produce una amplificación exponencial del material de partida igual a 2^n , siendo "n" el número de ciclos realizados.

Una vez finalizada la PCR la detección del producto amplificado se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN se separan según su tamaño. El gel se tiñe con bromuro de etidio, que se une al ADN de cadena doble de forma inespecífica y se visualiza con luz ultravioleta.

Para intentar aumentar la sensibilidad de la técnica de PCR se desarrolló la nested-PCR (figura 19). Se trata de una técnica que comporta dos PCRs sucesivas, con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en la segunda PCR (*internal* o *nested PCR*) flanqueen una región genómica amplificada en la primera reacción en cadena (*external PCR*). El método de la nested-PCR se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del ADN de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas que a veces se observan con la PCR clásica, dado que en cada etapa se realiza un número menor de ciclos (las PCR de muchos ciclos conllevan a menudo errores de lectura y de síntesis, debido, entre otras cosas, a la falta de fidelidad de la Taq polimerasa). Además, si el producto de la primera PCR es el resultado de una amplificación inespecífica, el segundo par de cebadores internos no reconocerá la secuencia complementaria, y, por consiguiente, no habrá amplificación.

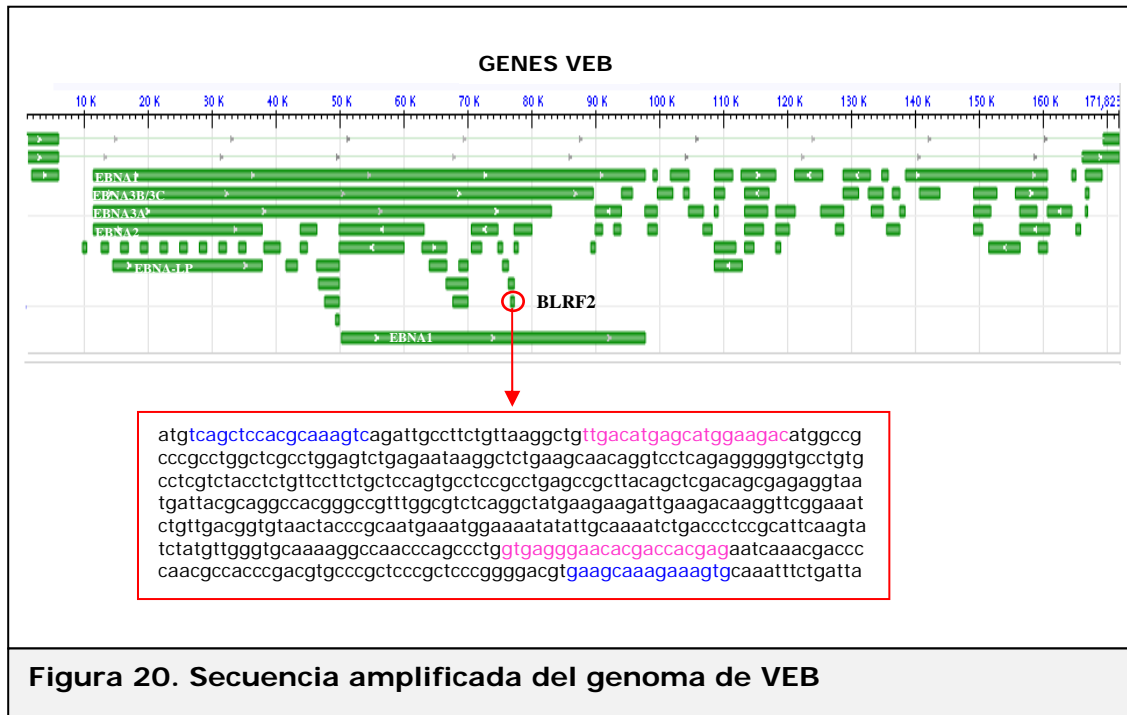


Dada la gran sensibilidad de esta técnica para detectar ácidos nucleicos, fue el método empleado en nuestro estudio para la detección del ADN de VEB en las muestras de LCR, suero y CMSP de los enfermos con EM y los controles.

Se amplificó el fragmento p23, de 363 pb, del gen BLRF2 de VEB (figura 20), usando los *primers* descritos en la tabla 14.

Tabla 14. *Primers* empleados en la nested-PCR

| <i>Primers</i> | Secuencia | Amplificado (pb) |
|----------------|-----------------------------|------------------|
| p23-1 ext | 5' TCAGCTCCACGCAAAGTC 3' | 471 |
| p23-2 ext | 5' CACTTTCTTTGCTTC 3' | 471 |
| p23-3 int | 5' TTGACATGAGCATGGAAGAC 3' | 363 |
| p23-4 int | 5' CTCGTGGTCGTGTTCCCTCAC 3' | 363 |



Para confirmar la presencia de ADN en todas las muestras, se incluyeron, sólo en la primera PCR (externa), una pareja de primers para la amplificación del gen de la β -actina humana: 5' AGCCAACCGCGAGAAGATGACC 3' y 5' GAAGTCCAGGGCGACGTAGCAC 3' a una concentración final de 0,1 μ M.

En ambas PCRs (externa e interna) se utilizó una mezcla de PCR con buffer (1x), $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTPs (160 μ M), primers (0,8 μ M) y Taq polimerasa (1U) (Promega, Estados Unidos) en un volumen final de 25 μ l.

Las condiciones empleadas en el termociclador (Eppendorf Mastercycler personal, Eppendorf, Estados Unidos) se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Condiciones de amplificación (iguales para ambas PCRs)

| Paso | Temperatura | Tiempo | Nº ciclos |
|---------------------------|-------------|------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 95°C | 5 min. | 1 |
| Desnaturalización | 95°C | 1 min. | |
| Hibridación | 60°C | 1 min. | 30 |
| Extensión | 72°C | 1 min. | |
| Extensión final | 72°C | 2 min. | 1 |
| Conservación | 4°C | Indefinido | - |

En todos los casos se utilizó un control negativo libre de ADN y un control positivo constituido por ADN genómico liofilizado de virus Epstein-Barr a una concentración inicial de $1,5 \times 10^2$ copias/ μl una vez reconstituido, obtenido de células P3HR1 en cultivo infectadas. La cuantificación de este control de ADN del virus fue realizada por PCR a tiempo real (Epstein-Barr virus DNA control, Vircell S.L, España).

Además, para determinar la sensibilidad de la nested-PCR se realizaron diluciones seriadas (1/10) a partir de un control de ADN genómico del VEB cuantificado a $1,5 \times 10^4$ copias/ μl (Epstein-Barr virus DNA control).

Una vez obtenidos los amplificados se realizaron geles de agarosa al 1,5% en un tampón de Tris-Borato-EDTA 0,5X (Tris 0,1M, ácido bórico 0,08M, EDTA 0,1 mM) y con bromuro de etidio, y en ellos se depositaron las muestras.

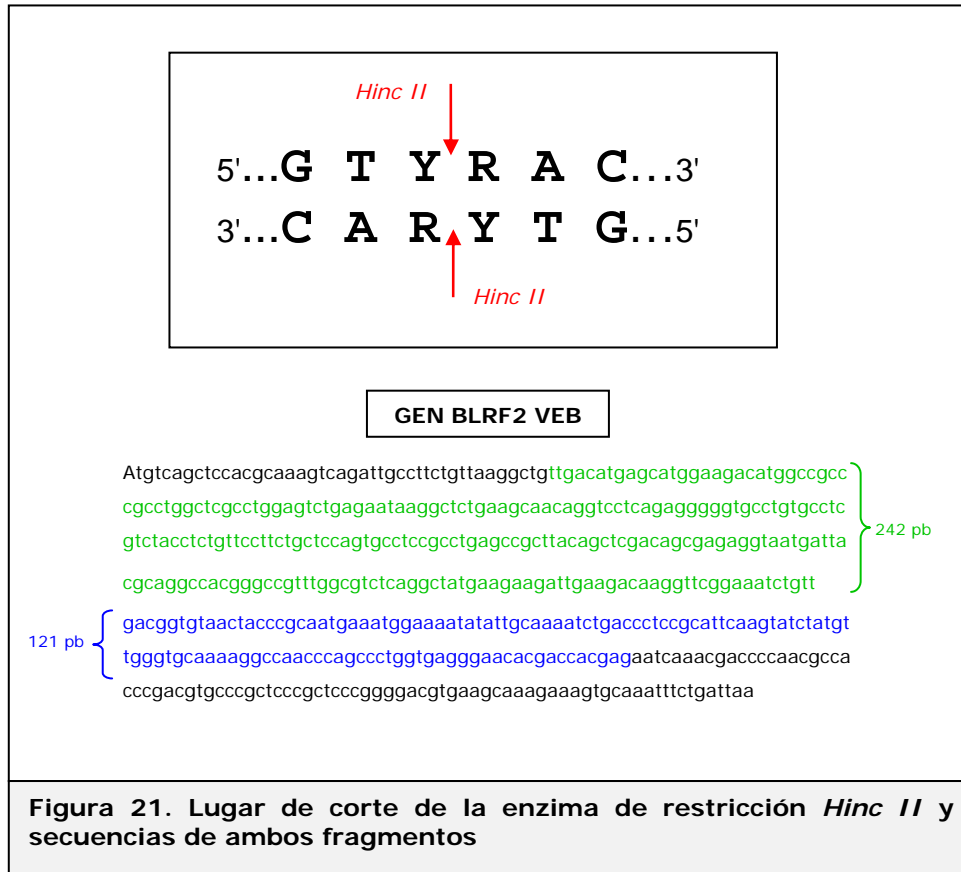
Para la electroforesis se utilizó una cubeta de electroforesis (Mini-Sub Cell Gt System Agarose Electroforesis, Bio-Rad, Estados Unidos) en las siguientes condiciones: voltaje entre 120-130 V y amperaje a 145 mA. Se utilizó el marcador de masas moleculares "DNA Molecular Weight Marker V" (rango entre 8 bp y 587 bp) (Roche Applied Science S.L, Alemania). Finalmente, las muestras se fotografiaron bajo iluminación ultravioleta.

3.3.4.3. Digestión con enzimas de restricción

Tras la electroforesis de los amplificados, y con la finalidad de confirmar que la secuencia amplificada era correcta, se procedió a cortarlos mediante la enzima de restricción *HincII*. Teniendo en cuenta que el amplicón de interés (363 pb) tiene una secuencia diana para la enzima *HincII*, la obtención de dos fragmento de ADN de 242 bp y 121 bp, indicó que la región amplificada era la adecuada según el procedimiento utilizado (figura 21).

El análisis de restricción se realizó con 8 μl del producto resultante de la nested-PCR, 2 μl de tampón Tango™ 10X (Fermentas, Alemania) y 1 μl de la enzima *HincII* (Fermentas, Alemania), en un volumen final de 20 μl . La mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C. A continuación, se realizó electroforesis en

un gel de agarosa al 1,5 %, 120-130 V y 145 mA, durante 45 minutos y se visualizó bajo iluminación ultravioleta.



3.3.5. Método estadístico

Para evaluar si existían diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto al índice de anticuerpos y, por tanto, a la existencia de síntesis intratecal, se utilizaron los tests de Wilcoxon y Welch.

Se utilizó el test exacto de Fisher para tablas r x s para comparar la positividad del ADN de VEB, detectado en las diferentes muestras, entre el grupo de casos y el grupo de controles.

En todos los casos se consideró hipótesis nula (H_0) la ausencia de diferencias entre el grupo de casos y el de controles en cuanto a las variables analizadas, e hipótesis alternativa (H_1) la existencia de diferencia significativa entre ambos grupos en cuanto a dichas variables.

4. RESULTADOS

Para exponer los resultados se han construido diferentes tablas en función de los marcadores de infección por VEB en los diferentes estudios considerados. En ellas se muestran las referencias bibliográficas que identifican cada estudio, el tipo de muestra utilizada por los investigadores, número total de resultados positivos (y porcentaje) o negativos de cada determinación, diferenciando los casos de los controles, las *OR* estimadas en cada estudio y su intervalo de confianza al 95%, así como el peso asignado. También aparecen las puntuaciones otorgadas en la valoración de la calidad según la escala NOS. Por último se muestra el valor de la *OR* conjunta, con su intervalo de confianza al 95% y el valor *p*.

Una manera de expresar las *OR* de los artículos incluidos en un meta-análisis y la *OR* conjunta es mediante el modelo gráfico denominado *forest plot*. En él la *OR* estimada para cada uno de los estudios se representa con un punto, el cuadrado que rodea a éste representa el tamaño muestral. Mediante una línea horizontal se expresa el IC 95%, siendo más larga la línea cuanto más ancho sea el intervalo.

4.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y META-ANÁLISIS

4.1.1. Estudios con determinación de IgG anti-VCA

En la tabla 16 y figura 22 se muestran los 13 estudios que analizaron la detección de IgG anti-VCA de VEB en pacientes de EM y controles.

Tabla 16. Descripción de los estudios que investigaron IgG anti-VCA de VEB

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | | | Controles | | |
|----------------------------|-----------------|--------------|-------------|----------|--------------|--------------|----------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Alotaibi y cols., 2004 | Suero | 25 | 5 | 83,3 | 81 | 62 | 56,7 |
| Ascherio y cols., 2001 | Suero | 143 | 1 | 99,3 | 269 | 19 | 93,4 |
| Banwell y cols., 2007 | Suero | 108 | 18 | 85,7 | 61 | 35 | 63,5 |
| Bray y cols., 1992 | LCR | 56 | 41 | 57,7 | 26 | 79 | 24,8 |
| Bray y cols., 1983 | Suero | 309 | 4 | 98,7 | 363 | 43 | 89,4 |
| Myhr y cols., 1998 | Suero | 141 | 3 | 97,9 | 138 | 32 | 81,1 |
| Pohl y cols., 2006 | Suero | 145 | 2 | 98,6 | 106 | 41 | 72,1 |
| Ponsonby y cols., 2005 | Suero | 136 | 0 | 100 | 252 | 9 | 96,5 |
| Shirodaria y cols., 1987 | Suero | 26 | 0 | 100 | 24 | 2 | 92,3 |
| Sundström y cols., 2004 | Suero | 234 | 0 | 100 | 693 | 9 | 98,7 |
| Sumaya y cols., 1980 | Suero | 155 | 2 | 98,7 | 76 | 5 | 93,8 |
| Sumaya y cols., 1976 | Suero | 140 | 2 | 98,6 | 70 | 4 | 94,6 |
| Zivadinov y cols., 2006 | Suero | 133 | 7 | 95 | 131 | 0 | 100 |
| Total | | 1751 | 85 | - | 2290 | 340 | - |
| Tasa de eventos (%) | | 95,37 | 4,62 | - | 87,07 | 12,92 | - |

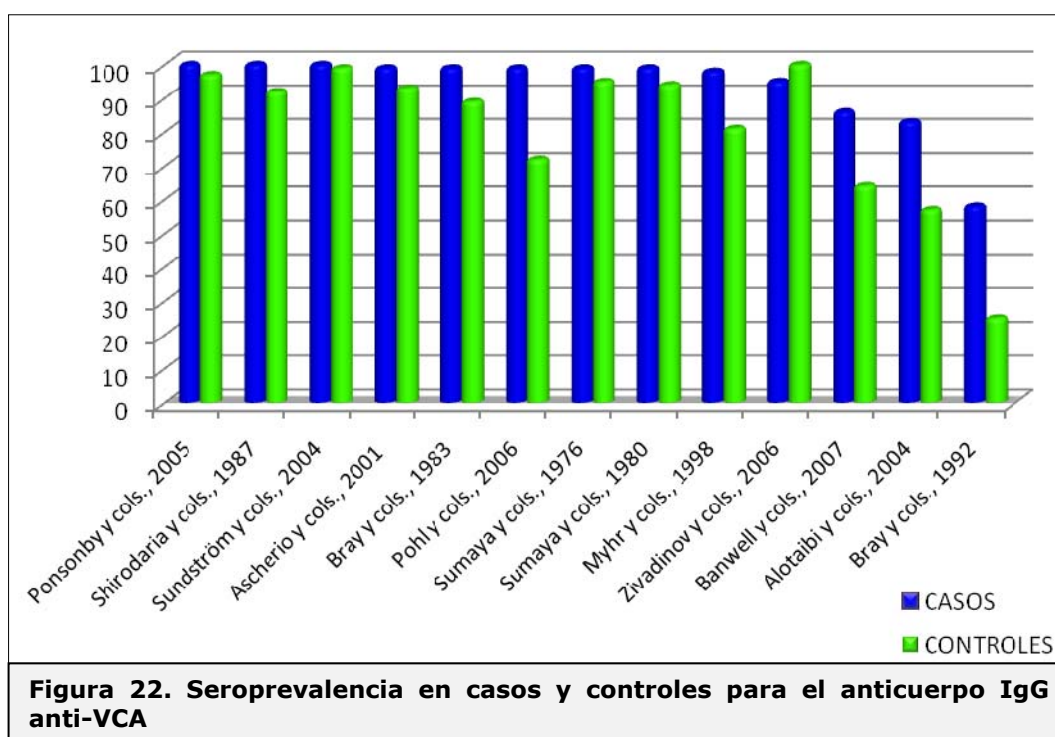


Figura 22. Seroprevalencia en casos y controles para el anticuerpo IgG anti-VCA

Como se puede apreciar, hubo tres estudios en los que se detectó IgG anti-VCA en el 100% de los casos [Ponsonby y cols., 2005; Shirodaria y cols., 1987; Sundström y cols., 2004]; mientras que la tasa más elevada entre los sujetos control se dio en el estudio de Zivadinov y cols. [2006], que fue, además, el único trabajo en el que la tasa de anticuerpos fue superior entre los controles que entre los casos de EM (100% vs. 95%, respectivamente).

Por su parte, las tasas más bajas de IgG, tanto entre casos como entre controles, aparecieron en el estudio de Bray y cols. [1992], que fue, además, el único de los trabajos realizado sobre LCR. Entre los estudios realizados en suero, destaca la menor tasa de anticuerpos, también en casos y controles, del estudio de Alotaibi y cols., [2004].

Las mayores diferencias porcentuales en las tasas de IgG entre casos y controles se dieron, precisamente, en el estudio de Bray y cols. [1992], seguido del trabajo de Alotaibi y cols., [2004]. Los porcentajes de positividad más cercanos entre sí, para este marcador, se dieron en el estudio de Sundström y cols., [2004]

Por último, hay que destacar que los estudios de Alotaibi y cols. [2004], Banwell y cols. [2007] y Phol y cols. [2006] se realizaron en niños, siendo los que presentaron las mayores diferencias en tasas de anticuerpos entre casos y controles.

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos al realizar el meta-análisis de los estudios anteriores, reflejando la *OR* obtenida, junto al intervalo de confianza al 95% y el peso, para cada uno de los estudios considerados. En la figura 23 se representa el gráfico *forest plot* de dichos trabajos.

Tabla 17. Resultados del meta-análisis de los estudios que determinaron IgG anti-VCA de VEB

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|--------------------------|---------------|---|----------|---------|----|-----|
| | OR | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Alotaibi y cols., 2004 | 3,8 | 1,38 - 10,56 | 11,50 | *** | * | ** |
| Ascherio y cols., 2001 | 10,1 | 1,33 - 76,22 | 4,56 | ** | ** | * |
| Banwell y cols., 2007 | 3,4 | 1,79 - 6,59 | 16,53 | * | ** | * |
| Bray y cols., 1992 | 4,2 | 2,28 - 7,55 | 17,31 | ** | | * |
| Bray y cols., 1983 | 9,2 | 3,24 - 25,77 | 11,27 | * | ** | *** |
| Myhr y cols., 1998 | 10,9 | 3,26 - 36,42 | 9,49 | ** | ** | *** |
| Pohl y cols., 2006 | 28,0 | 6,63 - 118,05 | 7,56 | ** | ** | ** |
| Ponsonby y cols., 2005 | 10,3 | 0,59 - 177,82 | 2,53 | ** | ** | ** |
| Shirodaria y cols., 1987 | 5,4 | 0,24 - 118,34 | 2,20 | * | ** | *** |
| Sundström y cols., 2004 | 6,4 | 0,37 - 110,80 | 2,54 | ** | ** | *** |
| Sumaya y cols., 1980 | 5,1 | 0,96 - 26,88 | 6,17 | ** | | *** |
| Sumaya y cols., 1976 | 4,0 | 0,71 - 22,37 | 5,85 | ** | | *** |
| Zivadínov y cols., 2006 | 0,1 | 0,004 - 1,19 | 2,50 | **** | ** | *** |
| Total | | OR: 5,5 (IC 95%= 3,37-8,81; p<0,0001) | | | | |

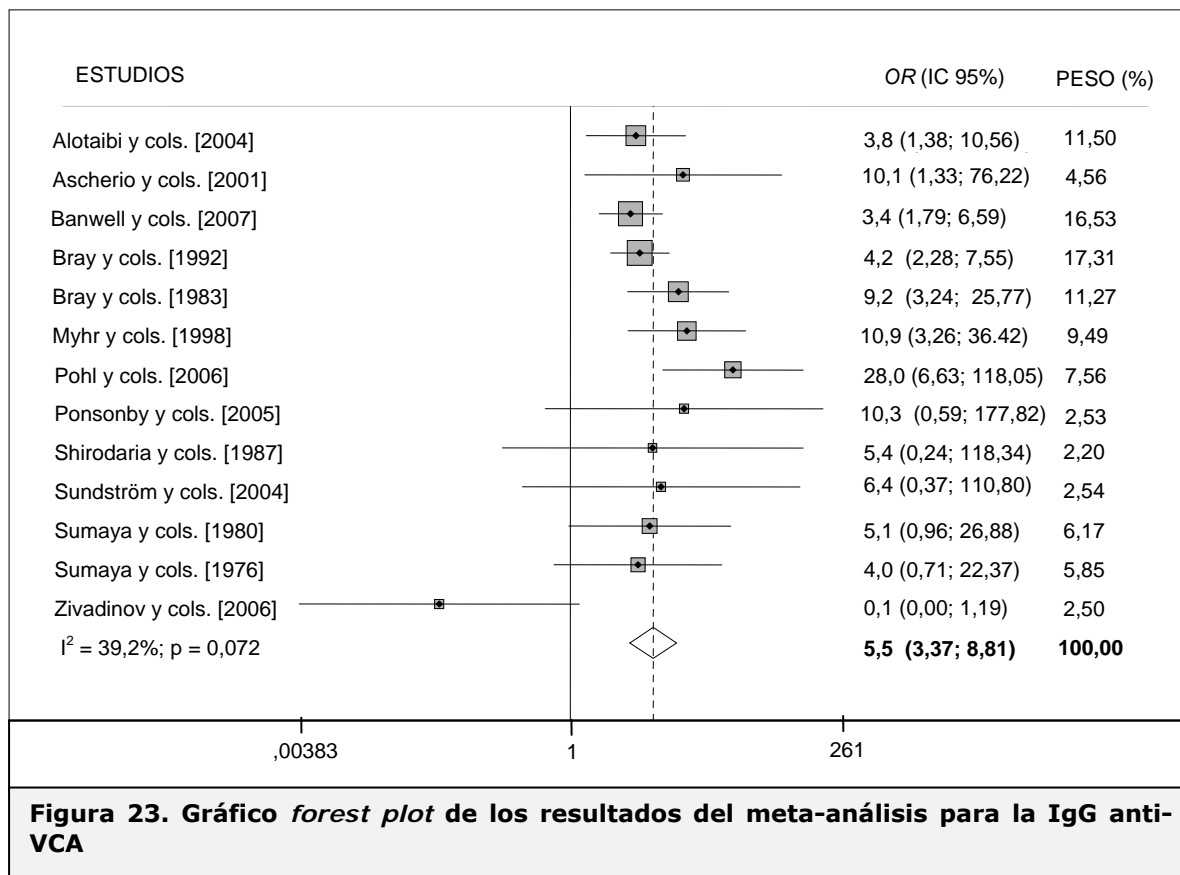


Figura 23. Gráfico forest plot de los resultados del meta-análisis para la IgG anti-VCA

Entre los estudios anteriores destaca que 7 de ellos [Alotaibi y cols., 2004; Ascherio y cols., 2001; Banwell y cols., 2007; Bray y cols., 1983; Bray y cols., 1992; Myhr y cols., 1998; Pohl y cols., 2006] encontraron asociación significativa de la EM con la positividad de la IgG anti-VCA, presentando unas *OR* elevadas, con IC 95% superiores a la unidad. Estos trabajos fueron, además, los que presentaron un mayor peso (4,56%-17,31%). Entre ellos se incluyó el único estudio que analizó la presencia de este anticuerpo en LCR. Frente a éstos, sin embargo, 6 estudios no encontraron asociación significativa [Ponsonby y cols., 2005; Shirodaria y cols., 1987; Sumaya y cols., 1980; Sumaya y cols., 1976; Sundström y cols., 2004; Zivadinov y cols., 2006], aunque fueron los que presentaron un menor peso (2,20%-6,17%).

Para poder valorar si los datos podían ser resumidos en una única medida, se estudió el grado de heterogeneidad de los trabajos mediante la *Q* de Cochran obteniendo χ^2_{exp} :19,74, 12 gl, $p=0,072$, lo que indicó que, sin llegar a ser significativa, hubo indicios, es decir, podría haber una tendencia a la diferencia entre estudios. Para ratificarlo se empleo la I^2 de Higgins, una medida de la variabilidad de la *OR* conjunta que es debida a la heterogeneidad de los estudios. Su valor fue de un 39,2% (figura 23). Esta diferencia entre estudios, no muy importante, nos permitió obtener, de manera fiable, una estimación conjunta de la *OR*.

Así, la estimación global o conjunta de la *OR* de los resultados individuales obtenidos en estos trabajos dio un resultado de 5,5, con un intervalo de confianza al 95% entre 3,37 y 8,81, que nos permitió concluir que existe asociación significativa ($p<0,0001$) entre el microorganismo y la enfermedad determinado a través de la búsqueda de anticuerpos IgG anti-VCA.

Finalmente, se estudio la calidad de los estudios mediante la escala Newcastle-Otawa (NOS). Individualmente los artículos con mayor calidad fueron los de Zivadinov y cols. [2006] y Sundström y cols. [2004], en los que no se encontró asociación significativa entre el virus y la EM, y el de Myhr y cols. [1998], que sí la halló.

Por último, se hizo una meta-regresión para estudiar la relación entre la calidad del artículo, medida según la escala de puntuación Newcastle-Otawa (NOS), y la *OR* individual correspondiente, obteniéndose un coeficiente significativamente positivo ($p=0,017$) que nos permitió afirmar que cuanto mayor fue la calidad del trabajo mayor fue la *OR*. Al estudiar de forma separada la *OR* de los estudios con mayor calidad, los resultados fueron análogos a los obtenidos cuando no se tuvo en cuenta la calidad.

4.1.2. Estudios con determinación de IgG anti-complejo EBNA

En la tabla 18 se muestran los 5 estudios que analizaron la detección de IgG anti-complejo EBNA de VEB en pacientes de EM y controles.

Tabla 18. Descripción de los estudios que investigaron IgG anti-complejo EBNA de VEB

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | | | Controles | | |
|--------------------------|-----------------|--------------|-------------|----------|--------------|--------------|----------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Alotaibi y cols., 2004 | Suero | 25 | 5 | 83,3 | 60 | 83 | 41,9 |
| Ascherio y cols., 2001 | Suero | 141 | 3 | 97,9 | 266 | 22 | 92,4 |
| Myhr y cols., 1998 | Suero | 143 | 1 | 99,3 | 160 | 10 | 94,1 |
| Shirodaria y cols., 1987 | Suero | 26 | 0 | 100 | 24 | 2 | 92,3 |
| Riverol y cols., 2007 | Suero | 167 | 5 | 97,1 | 75 | 10 | 88,2 |
| Total | | 502 | 14 | - | 585 | 127 | - |
| Tasa eventos (%) | | 97,28 | 2,71 | - | 82,16 | 17,83 | - |

Como observamos, hubo un solo estudio en el que se detectó IgG anti-complejo EBNA en el 100% de los casos [Shirodaria y cols., 1987]; mientras que la tasa más elevada entre los sujetos control se dio en el estudio de Myhr y cols. [1998]. Todos los trabajos presentaron una tasa de resultados positivos mayor para los casos que para los controles.

Por su parte, las tasas más bajas de IgG, tanto entre casos como entre controles, aparecieron en el estudio de Alotaibi y cols. [2004], único trabajo realizado en niños.

Las mayores diferencias porcentuales en las tasas de IgG entre casos y controles se dieron también en el estudio de Alotaibi y cols. [2004], que, en

este sentido, se diferenci6 mucho del resto de trabajos, con tasas de positividad m6s cercanas entre ambos grupos (casos y controles). Los porcentajes de positividad m6s cercanos entre s6, para este marcador, se dieron en el estudio de Myhr y cols. [1998].

En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos al realizar el meta-an6lisis de los estudios anteriores, reflejando la OR obtenida, junto al IC 95% y el peso, para cada uno de los estudio considerados. En la figura 24 se representa el gr6fico *forest plot* de dichos trabajos.

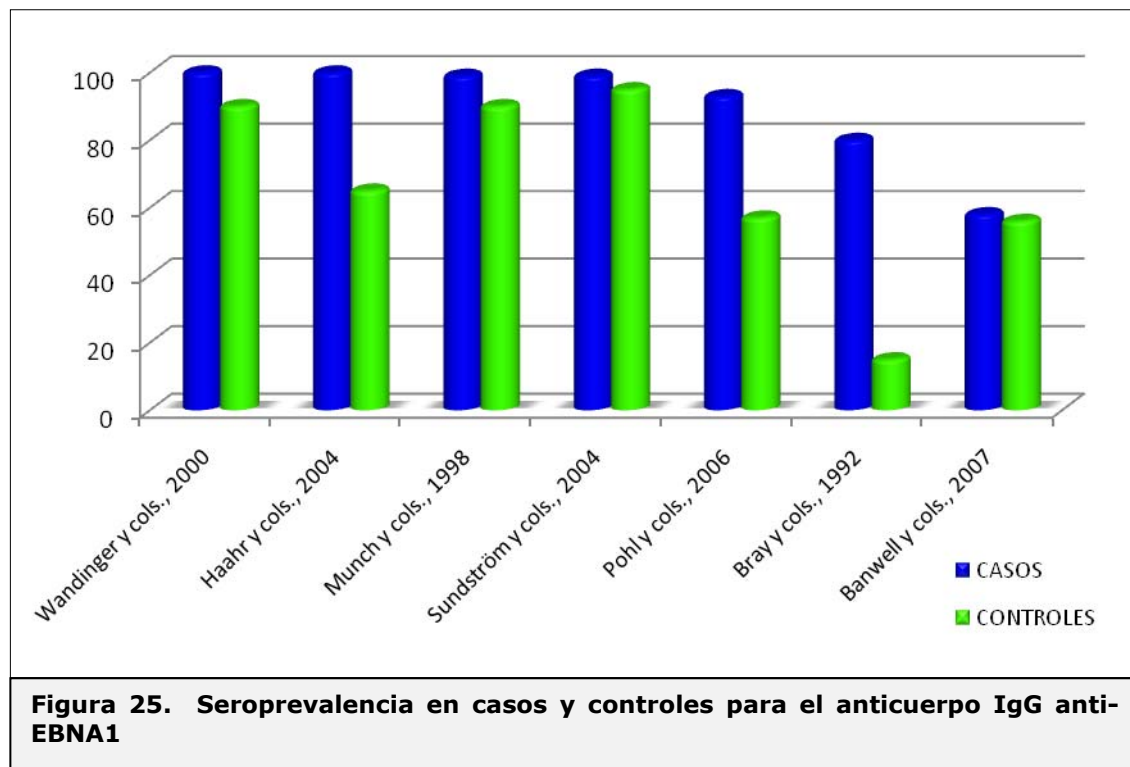
Entre estos estudios destac6 que 4 [Alotaibi y cols., 2004; Ascherio y cols., 2001; Myhr y cols., 1998; Riverol y cols., 2007] encontraron asociaci6n significativa de la EM con la positividad de la IgG anti-complejo EBNA, caracteriz6ndose todos ellos por ser los de mayor peso de los cinco estudios incluidos (8,38%-34,71%). Por su parte, el estudio de Shirodaria y cols. [1987] fue el 6nico que no encontr6 relaci6n significativa, siendo, adem6s, el de menor peso.

Tabla 19. Resultados del meta-an6lisis de los estudios que determinaron EgG anti-complejo EBNA de VEB

| Estudios | Meta-an6lisis | | | Calidad | | |
|--------------------------|---------------|-------------|---|---------|----|-----|
| | OR | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Alotaibi y cols., 2004 | 6,9 | 2,50-19,10 | 34,71 | *** | * | ** |
| Ascherio y cols., 2001 | 3,9 | 1,14-13,21 | 23,94 | ** | ** | * |
| Myhr y cols., 1998 | 8,9 | 1,13-70,68 | 8,38 | ** | ** | *** |
| Shirodaria y cols., 1987 | 5,4 | 0,24-118,34 | 3,76 | * | ** | *** |
| Riverol y cols., 2007 | 4,5 | 1,47-13,48 | 29,21 | ** | | *** |
| Total | | | OR: 5,4 | | | |
| | | | (IC 95%= 2,94-9,76; p<0,0001) | | | |

Tabla 20. Descripción de los estudios que investigaron IgG anti-EBNA1 de VEB

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | | | Controles | | |
|--------------------------|-----------------|--------------|-------------|----------|--------------|--------------|----------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Banwell y cols., 2007 | Suero | 73 | 53 | 57,9 | 54 | 42 | 56,2 |
| Bray y cols., 1992 | LCR | 114 | 29 | 79,7 | 19 | 112 | 14,5 |
| Haahr y cols., 2004 | Suero | 153 | 0 | 100 | 646 | 355 | 64,5 |
| Munch y cols., 1998 | Suero | 137 | 1 | 99,2 | 124 | 14 | 89,8 |
| Pohl y cols., 2006 | Suero | 124 | 10 | 92,5 | 77 | 57 | 57,4 |
| Sundström y cols., 2004 | Suero | 233 | 1 | 99,6 | 669 | 33 | 95,3 |
| Wandinger y cols., 2000 | Suero | 108 | 0 | 100 | 147 | 16 | 90,2 |
| Total | | 942 | 94 | - | 1736 | 629 | - |
| Total eventos (%) | | 90,92 | 9,07 | - | 73,40 | 26,60 | - |



Se puede observar que hubo 2 estudios en los que se detectó IgG anti-EBNA1 en el 100% de los casos [Haahr y cols., 2004, Wandinger y cols., 2000]; mientras que las tasas más elevadas entre los controles (95,3%) se dieron en el estudio de Sundström y cols. [2004]. Todos los trabajos presentaron una tasa de resultados positivos mayor para los casos que para los controles.

La tasa más baja de IgG entre los casos fue para el estudio de Banwell y cols. [2007], realizado en niños, mientras que las tasas más bajas entre los controles aparecieron en el estudio de Bray y cols. [1992], realizado sobre LCR.

Las mayores diferencias porcentuales en las tasas de IgG entre casos y controles se dieron, precisamente, en el estudio de Bray y cols. [1992], seguido de Haahr y cols. [2004]. Los porcentajes de positividad más cercanos entre sí, para este marcador, se dieron en el trabajo de Banwell y cols. [2007].

Por último, fue destacable que aunque el artículo de Pohl y cols. [2006] también se realizó en niños, las tasas de prevalencia de infección por VEB en pacientes con EM determinadas por la positividad de IgG anti-EBNA1 fueron muy altas.

En la tabla 21 se muestran los resultados obtenidos al realizar el meta-análisis de los estudios anteriores. En la figura 26 se representa el gráfico *forest plot* de dichos trabajos.

Tabla 21. Resultados del meta-análisis de los estudios de determinaron IgG anti-EBNA1 de VEB

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|-------------------------|---------------|-----------------|---|---------|----|-----|
| | OR | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Banwell y cols., 2007 | 1,1 | 0,63 - 1,83 | 17,95 | * | ** | * |
| Bray y cols., 1992 | 23,2 | 12,29 - 43,71 | 17,75 | ** | | * |
| Haahr y cols., 2004 | 168,8 | 10,48 - 2719,31 | 10,38 | **** | ** | *** |
| Munch y cols., 1998 | 15,5 | 2,01 - 119,34 | 12,99 | | ** | *** |
| Pohl y cols., 2006 | 9,2 | 4,44 - 19,04 | 17,53 | ** | ** | ** |
| Sundström y cols., 2004 | 11,5 | 1,56 - 84,50 | 13,18 | ** | ** | *** |
| Wandinger y cols., 2000 | 24,3 | 1,44 - 409,04 | 10,23 | **** | | *** |
| Total | | | OR: 12,1 (IC 95%= 3,13-46,89; p<0,0001) | | | |

Seis de los siete estudios presentaron asociación significativa de la EM con la infección por VEB determinada por la positividad en la detección de igG anti-EBNA1 [Bray y cols., 1992; Haahr y cols., 2004; Munch y cols., 1998; Pohl y cols., 2006; Sundström y cols., 2004; Wandinger y cols., 2000]. Fue

y un valor $p < 0,0001$, lo que indicó que existió una asociación significativa entre la exposición al virus, determinada mediante la búsqueda de IgG anti-EBNA1 y la EM.

Los artículos con mayor calidad según la escala NOS fueron los de Haahr y cols. [2004] y Sundström y cols. [2004].

Por último, se realizó una meta-regresión para estudiar la relación entre la calidad del artículo y la *OR* individual correspondiente, obteniéndose un coeficiente significativamente positivo ($p = 0,026$), que nos permitió afirmar que cuanto mayor fue la calidad del artículo, mayor fue la *OR*.

4.1.4. Estudios con determinación de IgG anti-EA

En la tabla 22 se muestran los resultados relativos a la determinación en suero de IgG anti-EA de VEB en 6 estudios.

Tabla 22. Descripción de los estudios que investigaron IgG anti-EA de VEB

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | | | Controles | | |
|-------------------------|-----------------|--------------|--------------|---------|--------------|--------------|---------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Alotaibi y cols., 2004 | Suero | 0 | 30 | 0 | 21 | 122 | 14,7 |
| Buljevac y cols., 2005 | Suero | 26 | 28 | 48,1 | 13 | 39 | 25 |
| Munch y cols., 1998 | Suero | 50 | 88 | 36,2 | 57 | 81 | 41,3 |
| Myhr y cols., 1998 | Suero | 99 | 45 | 68,7 | 79 | 91 | 46,5 |
| Pohl y cols., 2006 | Suero | 9 | 138 | 6,1 | 7 | 140 | 4,7 |
| Wandinger y cols., 2000 | Suero | 15 | 93 | 13,8 | 28 | 135 | 17,1 |
| Total | | 199 | 422 | - | 205 | 608 | - |
| Tasa eventos (%) | | 32,04 | 67,95 | - | 25,21 | 74,78 | - |

Las tasas más elevadas de resultados positivos en la determinación de IgG anti-EA, tanto entre los casos, como entre los controles, se dieron en el estudio de Myhr y cols. [1998]. Por su parte, las tasas más bajas aparecieron en los estudios de Alotaibi y cols. [2004] para los casos, y Pohl y cols. [2006] entre los controles, ambos trabajos realizados en sujetos en edad pediátrica. Hubo tres estudios [Alotaibi y cols., 2004; Munch y cols., 1998; Wandinger y cols., 2000] en los que la tasa de resultados positivos fue superior entre los controles que en los casos.

Las mayores diferencias porcentuales en las tasas de IgG entre casos y controles se dieron en el trabajo de Buljevac y cols. [2005], seguido de cerca del de Myhr y cols. [1998]. Los porcentajes de positividad más cercanos entre sí, para este marcador, fueron los de Pohl y cols. [2006]. En todos ellos la diferencia fue favorable a los casos.

En la tabla 23 aparecen los resultados del meta-análisis de los estudios anteriores.

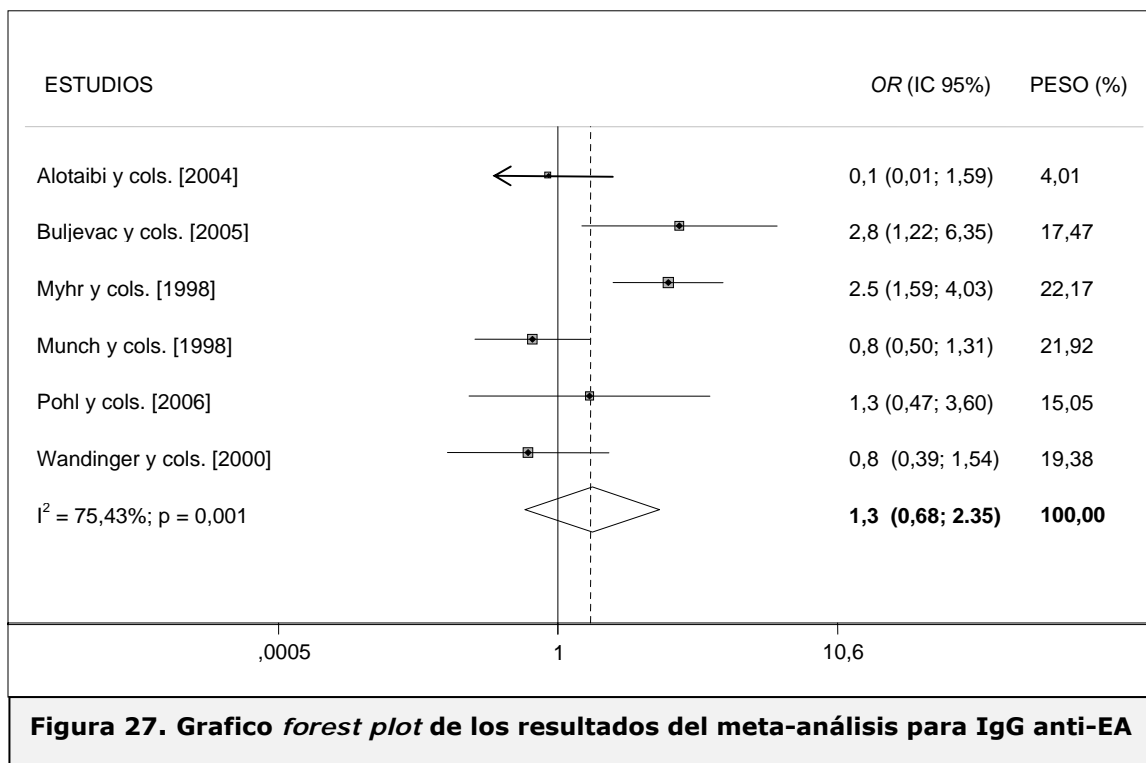
Tabla 23. Resultados del meta-análisis de los estudios que determinaron IgG anti-EA de VEB

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|-------------------------|---------------|-------------|--|---------|----|-----|
| | OR | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Alotaibi y cols., 2004 | 0,1 | 0,01 – 1,59 | 4,01 | *** | * | ** |
| Buljevac y cols., 2005 | 2,8 | 1,22 – 6,35 | 17,47 | * | | ** |
| Munch y cols., 1998 | 0,8 | 0,5 – 1,31 | 21,92 | | ** | *** |
| Myhr y cols., 1998 | 2,5 | 1,59 – 4,03 | 22,17 | ** | ** | *** |
| Pohl y cols., 2006 | 1,3 | 0,47 – 3,6 | 15,05 | ** | ** | ** |
| Wandinger y cols., 2000 | 0,8 | 0,39 – 1,54 | 19,38 | **** | | *** |
| Total | | | OR: 1,3 (IC 95%= 0,68-2,35; p= 0,457) | | | |

Entre los seis estudios anteriores sólo 2 de ellos [Buljevac y cols., 2004; Myhr y cols., 1998] encontraron asociación significativa de la EM con la positividad de la IgG anti-EA, con *OR* relativamente bajas si las comparamos con las obtenidas en apartados anteriores.

Hecha la comparación entre las *ORs* de los distintos estudios se observó que éstos eran heterogéneos (χ^2_{exp} : 20,30, 5 gl, $p=0,001$). Esta heterogeneidad se confirmó con un valor de $I^2=75,4\%$. Debido a esta heterogeneidad, debemos considerar menos fiable la estimación conjunta de la *OR* y debe tomarse con precaución.

La *OR* global estimada fue de 1,3, con un IC 95% entre 0,68 y 2,35, y un valor $p=0,457$, lo que indicó, finalmente, la ausencia de relación entre la exposición al virus, determinada mediante la búsqueda de IgG anti-EA y la EM.



Los artículos con mayor calidad fueron los de Myhr y cols. [1998] y Wandinger y cols. [2000].

4.1.5. Estudios con determinación de IgM anti-EA

La tabla 24 muestra los dos únicos estudios que llevaron a cabo la detección de IgM anti-EA de VEB en pacientes de EM y controles. Ambos se caracterizaron por unas tasas relativamente bajas de resultados positivos, tanto entre los casos como entre los controles.

Tabla 24. Descripción de los estudios que investigaron IgM anti-EA de VEB

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | | | Controles | | |
|-------------------------|-----------------|-------------|-------------|----------|-------------|-------------|----------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Munch y cols., 1998 | Suero | 14 | 124 | 10 | 14 | 124 | 10 |
| Wandinger y cols., 2000 | Suero | 15 | 93 | 14 | 34 | 129 | 21 |
| Total | | 29 | 217 | - | 48 | 253 | - |
| Tasa eventos (%) | | 11,8 | 88,2 | - | 15,9 | 84,1 | - |

En la tabla 25 se refleja el resultado del meta-análisis para estos dos estudios, caracterizados por la ausencia de asociación significativa entre la infección y la enfermedad, en ambos casos.

Tabla 25. Resultados del meta-análisis de los estudios que determinaron IgM anti-EA de VEB

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|-------------------------|--|-----------|----------|---------|----|-----|
| | OR | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Munch y cols., 1998 | 1 | 0,46-2,18 | 41,88 | | ** | *** |
| Wandinger y cols., 2000 | 0,6 | 0,31-1,19 | 58,12 | **** | | *** |
| TOTAL | OR: 0,8 (IC 95%= 0,45-1,25; p= 0,269) | | | | | |

El estudio de heterogeneidad indicó que ambos estudios presentaban poca variabilidad (χ^2_{exp} : 0,88, 1 gl, $p=0,348$; $I^2=0\%$), aunque hay que tener en cuenta que el número de estudios es muy pequeño para poder obtener unas conclusiones fiables a este respecto.

4.1.6. Estudios con determinación de anticuerpos totales anti-VCA

En la tabla 26 se reflejan los datos relativos a los 2 únicos trabajos que determinaron la presencia de anticuerpos totales anti-VCA en suero y LCR en pacientes de EM y sujetos control. Cabe destacar una tasa del 100% de resultados positivos para este marcador, entre los casos, en el estudio de Larsen y cols. [1985]. En ambos casos la tasa de positivos fue mayor entre los casos que entre los controles.

Tabla 26. Descripción de los estudios que investigaron anticuerpos anti-VCA de VEB

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | | | Controles | | |
|-----------------------------|-----------------|------------|----------|----------|--------------|--------------|----------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Larsen y cols., 1985 | Suero | 100 | 0 | 100 | 84 | 16 | 84 |
| Nikoskelainen y cols., 1975 | LCR | 14 | 6 | 70 | 15 | 43 | 26 |
| Total | | 114 | 6 | - | 100 | 59 | - |
| Tasa eventos (%) | | 95 | 5 | - | 62,89 | 37,11 | - |

En la tabla 27 se incluye el resultado del meta-análisis para estos dos estudios. En ambos su *OR* y el IC 95% indicó la existencia de asociación significativa entre la infección por el virus y la EM, de forma que la *OR* conjunta fue 9,9 (IC 95%=2,35-41,50; $p=0,002$), con un test de heterogeneidad que indicó que los estudios fueron homogéneos (χ^2_{exp} : 1,30, 1 gl, $p=0,254$, $I^2=23\%$).

Tabla 27. Resultados del meta-análisis de los estudios que determinaron anticuerpos anti-VCA de VEB

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|-----------------------------|---|---------------|----------|---------|----|----|
| | <i>OR</i> | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Larsen y cols., 1985 | 39,3 | 2,32 - 663,97 | 21,98 | ** | ** | ** |
| Nikoskelainen y cols., 1975 | 6,7 | 2,18 - 20,55 | 78,02 | ** | | ** |
| Total | <i>OR</i>: 9,9 (IC 95%= 2,35-41,50; $p= 0,002$) | | | | | |

4.1.7. Estudios con determinación de IgG anti-VEB

En la tabla 28 aparecen los datos relativos a los 2 únicos estudios en los que se determinó la presencia de IgG anti-VEB en suero y LCR. El mayor porcentaje de resultados positivos se obtuvo entre los controles en el estudio de Gutiérrez y cols. [2002].

Tabla 28. Descripción de los estudios que investigaron IgG anti-VEB

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | | | Controles | | |
|-------------------------|-----------------|--------------|--------------|---------|--------------|--------------|---------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Ablashi y cols., 1998 | LCR | 4 | 29 | 12 | 2 | 25 | 7 |
| Gutiérrez y cols., 2002 | Suero | 38 | 3 | 93 | 30 | 1 | 97 |
| Total | | 42 | 32 | - | 32 | 26 | - |
| Tasa eventos (%) | | 56,75 | 43,24 | - | 55,17 | 44,82 | - |

En la tabla 29 se refleja el meta-análisis para estos dos trabajos. Como en ninguno de ellos se encontró asociación significativa, la *OR* conjunta

tampoco lo fue. Los estudios fueron homogéneos (χ^2_{exp} : 0,89 1 gl, $p=0,345$; $I^2=0\%$).

Tabla 29. Resultados del meta-análisis de los estudios que determinaron IgG anti-VEB

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|-------------------------|---------------|--|----------|---------|---|-----|
| | OR | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Ablashi y cols., 1998 | 1,7 | 0,29 - 10,22 | 62,82 | | | *** |
| Gutierrez y cols., 2002 | 0,4 | 0,04 - 4,27 | 37,18 | ** | | *** |
| Total | | OR: 1,0 (IC 95%= 0,25-4,19; p= 0,976) | | | | |

4.1.8. Estudios con determinación de anticuerpos heterófilos

La característica que definió a estos trabajos fue que todos ellos se basaron en buscar en historias clínicas a sujetos que tuviesen una determinación de AH por sospecha clínica de mononucleosis infecciosa. A partir de esta selección, se consideraron casos a todos aquellos individuos que desarrollaron, a posteriori, EM, y controles a todos aquellos que no lo hicieron.

En la tabla 30 se muestran los cuatro estudios en los que se realizó este protocolo de trabajo.

Tabla 30: Descripción de los estudios que investigaron anticuerpos heterófilos de VEB

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | | | Controles | | |
|----------------------------|-----------------|--------------|--------------|----------|---------------|---------------|----------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Haahr y cols., 1995 | Suero | 16 | 25 | 39 | 6837 | 12864 | 34,7 |
| Hernán y cols., 2001 | Suero | 70 | 231 | 23,2 | 178 | 1238 | 12,6 |
| Lindberg y cols., 1991 | Suero | 3 | 0 | 100 | 491 | 211 | 70 |
| Nielsen y cols., 2007 | Suero | 104 | 68 | 60,5 | 556599 | 711157 | 43,9 |
| Total | | 193 | 324 | - | 564105 | 725470 | - |
| Tasa de eventos (%) | | 37,33 | 62,66 | - | 43,74 | 56,25 | - |

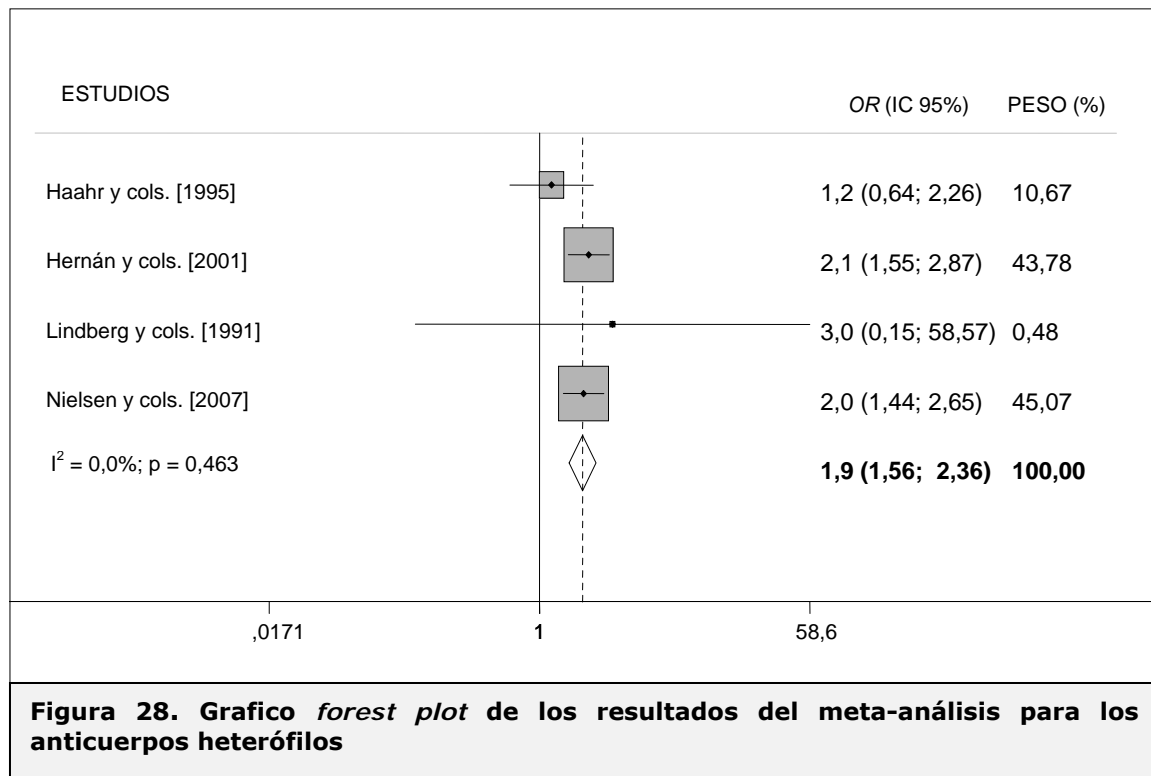
Como se puede apreciar, en uno de los estudios la tasa de positivos para este marcador entre los casos fue del 100% [Lindberg y cols., 1991]. Este mismo estudio también presentó la tasa más elevada de resultados positivos entre los controles (70%). En todos los trabajos las tasas de resultados positivos fueron mayores entre los casos que entre los controles. Las tasas más bajas, tanto en casos como en controles, correspondieron al estudio de Hernán y cols. [2001].

Las mayores diferencias porcentuales en las tasas de anticuerpos heterófilos entre casos y controles se dieron en el estudio de Lindberg y cols. [1991], mientras que los porcentajes más cercanos para este marcador se dieron en el trabajo de Haahr y cols. [1995].

En la tabla 31 y figura 28 se muestran los resultados obtenidos al realizar el meta-análisis de los estudios anteriores. Las *ORs* de los diferentes estudios fueron homogéneas (χ^2_{exp} : 2,57, 3 gl, $p=0,463$; $I^2=0\%$), y la determinación de la *OR* indicó que existía asociación significativa entre la exposición al virus, determinada por los anticuerpos heterófilos y la EM.

Tabla 31. Resultados del meta-análisis de los estudios que determinaron anticuerpos heterófilos de VEB

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|------------------------|---------------|--------------|---|---------|----|-----|
| | <i>OR</i> | IC del 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Haahr y cols., 1995 | 1,2 | 0,64 – 2,26 | 10,67 | ** | | *** |
| Hernán y cols., 2001 | 2,1 | 1,55 – 2,87 | 43,78 | ** | ** | *** |
| Lindberg y cols., 1991 | 3,0 | 0,15 – 58,57 | 0,48 | ** | | *** |
| Nielsen y cols., 2007 | 2,0 | 1,44 – 2,65 | 45,07 | *** | | ** |
| TOTAL | | | OR: 1,9 (IC del 95%= 1,56-2,36; $p=0,000$) | | | |



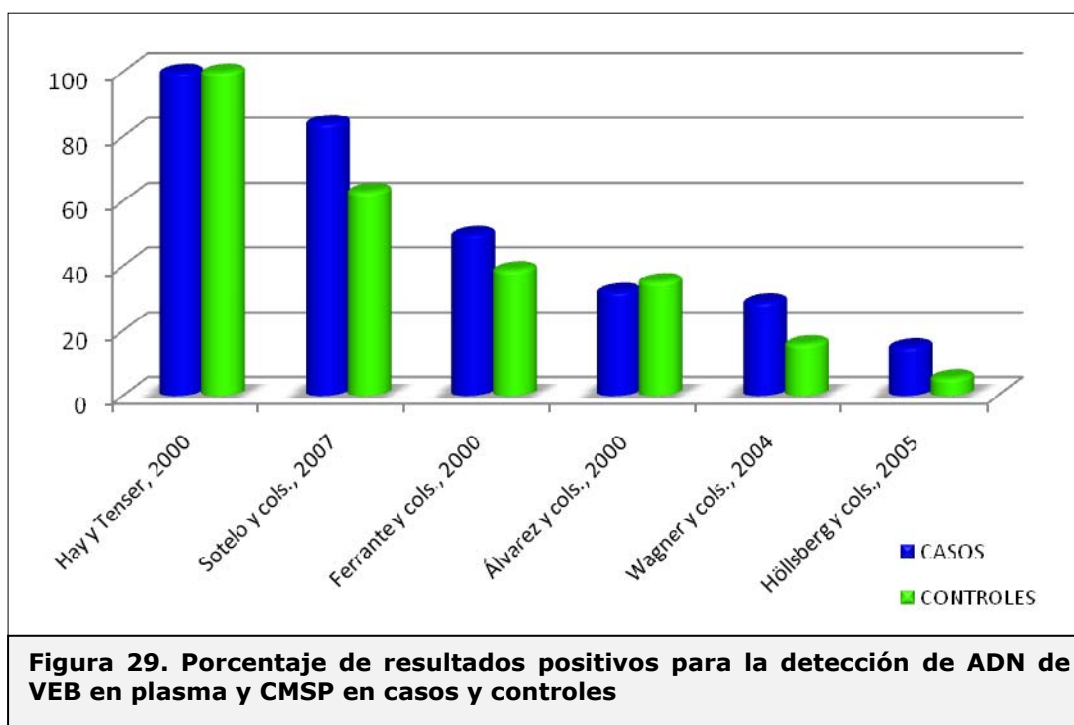
4.1.9. Estudios con determinación de ADN del virus de Epstein Barr

4.1.9.1. Estudios con determinación de ADN de VEB en plasma y células mononucleares de sangre periférica

En la tabla 32 y figura 29 se muestran los 6 estudios que analizaron la presencia de ADN de VEB en plasma (2 trabajos) y CMSP (4 trabajos).

Tabla 32. Descripción de los estudios que investigaron ADN de VEB en plasma y CMSP

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | | | Controles | | |
|-------------------------|-----------------|--------------|--------------|---------|--------------|--------------|---------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Álvarez y cols., 2000 | CM | 33 | 69 | 32,2 | 36 | 66 | 35,3 |
| Ferrante y cols., 2000 | CM | 13 | 13 | 50 | 7 | 11 | 38,9 |
| Hay y Tenser, 2000 | CM | 29 | 0 | 100 | 7 | 0 | 100 |
| Höllsberg y cols., 2005 | PS | 5 | 28 | 15,2 | 1 | 17 | 5,5 |
| Sotelo y cols., 2007 | CM | 144 | 27 | 84,2 | 82 | 48 | 63,1 |
| Wagner y cols., 2004 | PS | 9 | 22 | 29 | 10 | 52 | 16,1 |
| Total | | 233 | 159 | - | 143 | 194 | - |
| Total ratio (%) | | 59,43 | 40,56 | - | 42,43 | 57,57 | - |



Como se puede apreciar, hubo un estudio en el que se detectó ADN de VEB en el 100% de las muestras [Hay y Tenser, 2000]. En el resto de los estudios, salvo en el de Álvarez y cols. [2000], las tasas de resultados positivos entre los casos fueron superiores a las de los controles.

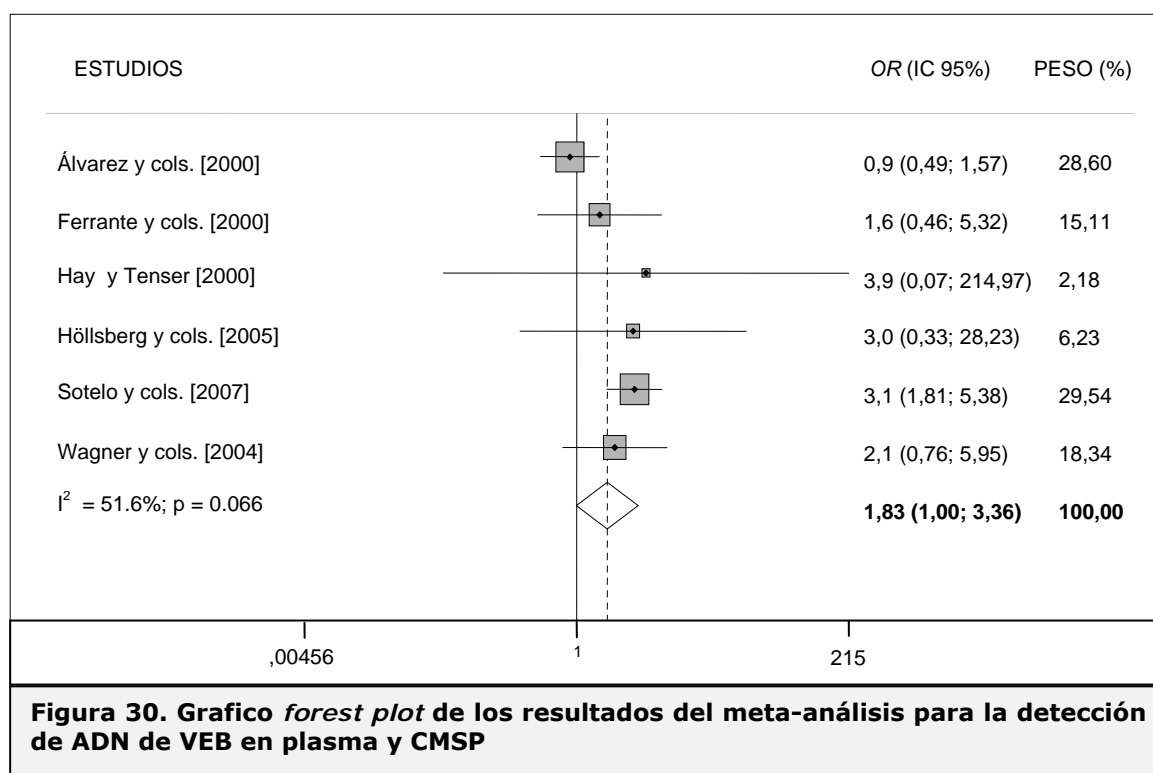
Por su parte, las tasas más bajas de muestras positivas, tanto entre casos como entre controles, se dieron en los trabajos de Höllsberg y cols. [2005] y Wagner y cols. [2004], ambos, realizados sobre muestras de plasma.

Las mayores diferencias porcentuales en las tasas de ADN entre casos y controles se dieron en el estudio de Sotelo y cols. [2007]. Los porcentaje de positividad más cercanos entre sí para este marcador fueron, evidentemente, las de Hay y Tenser [2000].

En la tabla 31 y figura 30 se muestran los resultados obtenidos al realizar el meta-análisis de los estudios anteriores, reflejando la *OR* obtenida, junto al IC 95% y el peso, para cada uno de los estudios considerados.

Tabla 31. Resultados del meta-análisis de los estudios que determinaron ADN de VEB en plasma y CMSP

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|-------------------------|---------------|--|----------|---------|----|-----|
| | OR | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Álvarez y cols., 2000 | 0,9 | 0,49 – 1,57 | 28,6 | ** | ** | *** |
| Ferrante y cols., 2000 | 1,6 | 0,46 – 5,32 | 15,11 | * | | ** |
| Hay y Tenser, 2000 | 3,9 | 0,07 – 214,97 | 2,18 | | | *** |
| Höllsberg y cols., 2005 | 3,0 | 0,33 – 28,23 | 6,23 | * | | ** |
| Sotelo y cols., 2007 | 3,1 | 1,81 – 5,38 | 29,54 | | | *** |
| Wagner y cols., 2004 | 2,1 | 0,76 – 5,95 | 18,34 | ** | ** | ** |
| Total | | OR: 1,8 (IC 95%= 0,99-3,36; p= 0,051) | | | | |

**Figura 30. Grafico forest plot de los resultados del meta-análisis para la detección de ADN de VEB en plasma y CMSP**

Entre los estudios anteriores destaca el trabajo de Sotelo y cols. [2007], por ser el único en el que se encontró asociación significativa entre la EM y la infección por VEB determinada por la detección de ADN en CMSP. Este estudio, además, fue el de mayor peso relativo de todos los considerados.

Para valorar si los datos podían ser resumidos en una única medida, se estudió el grado de heterogeneidad de los trabajos mediante la Q de Cochran, obteniendo una χ^2_{exp} : 10,34, 5 gl, $p=0,066$, lo que indicó que, sin llegar a ser

significativa, hubo indicios, es decir, podría existir una tendencia a la diferencia entre estudios. Para ratificarlo se empleó la I^2 de Higgins, una medida de la variabilidad de la *OR* conjunta que es debida a la heterogeneidad de los estudios. Su valor fue $I^2=51,6\%$ (figura 30). Esta diferencia entre estudios no nos permitió obtener un *OR* conjunta demasiado fiable. Aún así, la prueba de DerSimonian y Laird nos dio un valor *OR* conjunta de 1,8, con un IC 95% entre 0,99 y 3,36 y un valor $p=0,051$. Según estos valores, no se puede decir que existiera asociación significativa entre la exposición al virus, determinado mediante la búsqueda de ADN en sangre, y la EM, aunque sí que hubo indicios de significación.

En general, no son estudios con demasiada calidad según la escala NOS, especialmente en lo que se refiere a la definición de los grupos de casos y controles, salvo los de Álvarez y cols. [2000] y Wagner y cols. [2004].

4.1.9.2. Estudios con determinación de ADN de VEB en LCR y biopsia de tejido cerebral post mórtem

En la tabla 33 aparecen los 7 estudios que analizaron la presencia de ADN de VEB en LCR (5 trabajos) y tejido cerebral (2 trabajos).

Tabla 33. Descripción de los estudios que investigaron ADN de VEB en LCR y biopsia de tejido cerebral

| Estudios | Tipo de muestras | Casos | | | Controles | | |
|--------------------------------|------------------|-------------|--------------|---------|-------------|--------------|---------|
| | | Pos | Neg | Pos (%) | Pos | Neg | Pos (%) |
| Álvarez-Lafuente y cols., 2008 | LCR | 1 | 47 | 2,1 | 0 | 44 | 0 |
| Denne y cols., 2007 | LCR | 0 | 6 | 0 | 0 | 57 | 0 |
| Mancuso y cols., 2007 | LCR | 1 | 37 | 2,5 | 0 | 47 | 0 |
| Martin y cols., 1997 | LCR | 0 | 45 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| Morré y cols., 2001 | TC | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 |
| Morré y cols., 2001 | LCR | 0 | 27 | 0 | 0 | 36 | 0 |
| Sanders y cols., 1996 | TC | 10 | 27 | 27 | 14 | 23 | 37,8 |
| Total | | 12 | 199 | | 14 | 237 | |
| Tasa eventos (%) | | 5,69 | 94,31 | | 5,57 | 94,42 | |

Es de destacar que, entre los artículos citados, sólo se detectó ADN de VEB en tres de ellos: Mancuso y cols. [2007] y Álvarez-Lafuente y cols. [2008]

sólo detectaron ADN en muestras procedentes de los casos, ambos en LCR, y en un porcentaje muy pequeño (2,5% y 2,1%, respectivamente). Sanders y cols. [1996], en muestras de biopsia cerebral, obtuvieron un porcentaje de resultados positivos mayor, tanto entre casos como entre controles, con la particularidad de que éste fue mayor en el grupo control.

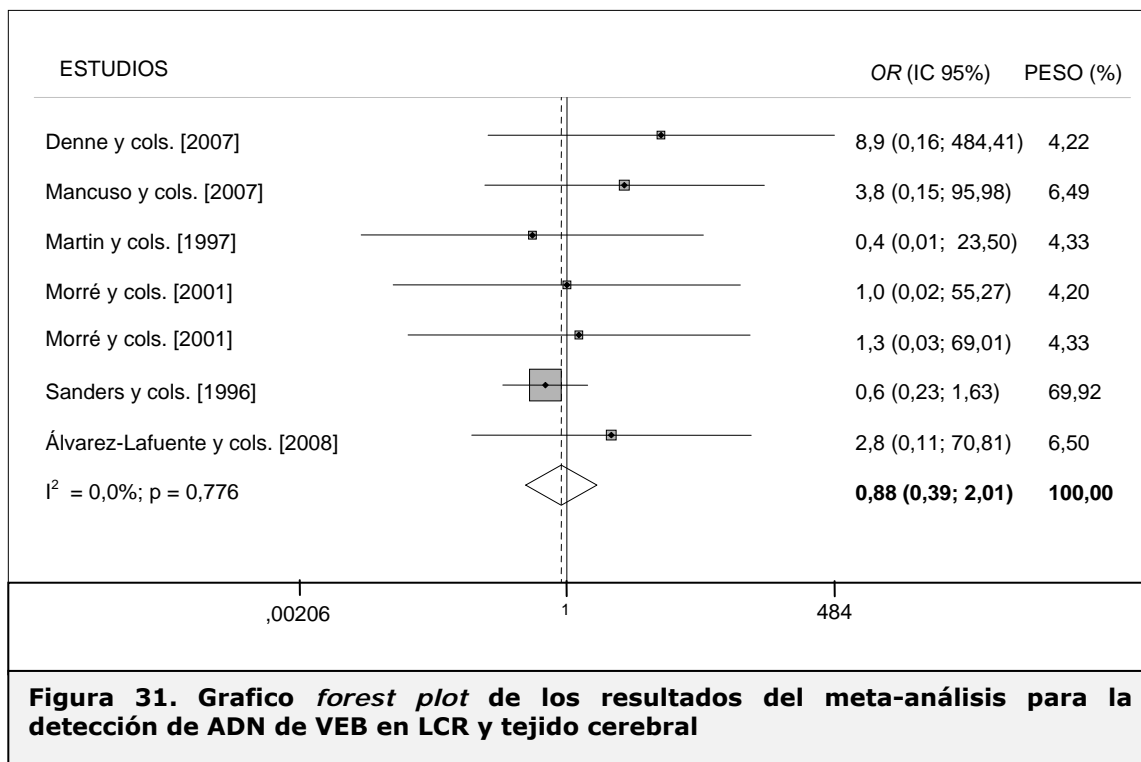
En la tabla 34 y figura 31 se reflejan los resultados obtenidos al realizar el meta-análisis de los estudios anteriores. En ninguno de ellos se encontró asociación significativa entre la EM y la infección por VEB.

Tabla 34. Resultados del meta-análisis de los estudios que determinaron ADN de VEB en LCR y biopsia de tejido cerebral

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|--------------------------------|---|---------------|----------|---------|---|-----|
| | OR | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Álvarez-Lafuente y cols., 2008 | 2,8 | 0,11-70,81 | 6,50 | ** | | *** |
| Denne y cols., 2007 | 8,9 | 0,16 - 484,41 | 4,22 | | | *** |
| Mancuso y cols., 2007 | 3,8 | 0,15 - 95,98 | 6,49 | ** | | *** |
| Martin y cols., 1997 | 0,4 | 0,01 - 23,5 | 4,33 | * | | *** |
| Morré y cols., 2001 | 1,0 | 0,02 - 55,27 | 4,20 | | | *** |
| Morré y cols., 2001 | 1,3 | 0,03 - 69,01 | 4,33 | | | *** |
| Sanders y cols., 1996 | 0,6 | 0,23 - 1,63 | 69,92 | | | *** |
| Total | OR: 0,9 (IC 95%=0,38-2,01; p= 0,768) | | | | | |

Las ORs de los diferentes estudios fueron homogéneas (χ^2 : 3,26, 6 gl, $p=0,776$, $I^2=0\%$) y la determinación de la OR indicó que no existía asociación significativa entre la exposición al virus, determinada mediante la detección de ADN en LCR o biopsia de tejido cerebral y la EM.

En general, no son estudios con demasiada calidad según la escala NOS, especialmente en lo que se refiere a la definición de los grupos de casos y controles, salvo los de Álvarez-Lafuente y cols. [2008] y Mancuso y cols. [2007].

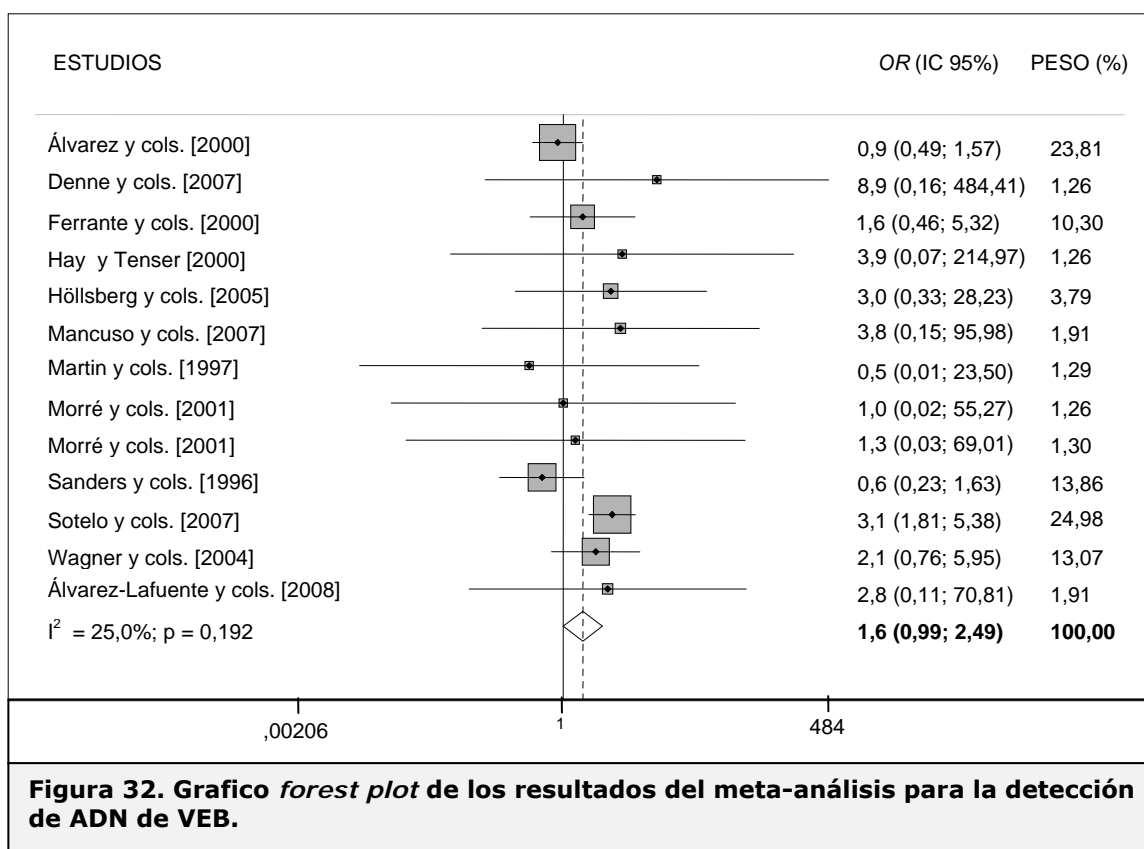


4.1.9.3. Evaluación general de los estudios que determinaron ADN de VEB

En la tabla 35 se muestran los resultados obtenidos al realizar el meta-análisis conjunto de los 13 estudios anteriores, que analizaron la presencia de ADN de VEB en pacientes con EM y controles. En este caso, en el test de heterogeneidad fue $\chi^2_{exp}=15,99$, 12 gl, $p=0,192$; $I^2=25\%$, que indicó que los estudios eran homogéneos. La OR conjunta fue 1,6, con un IC 95% entre 0,99 y 2,49, y un valor p cercano a la significación ($p=0,051$).

Tabla 35. Resultados del meta-análisis de los estudios que determinaron ADN de VEB

| Estudios | Meta-análisis | | | Calidad | | |
|--------------------------------|---------------|---------------|--|---------|----|-----|
| | OR | IC 95% | Peso (%) | S | C | E |
| Álvarez y cols., 2000 | 0,9 | 0,49 - 1,57 | 23,81 | ** | ** | *** |
| Álvarez-Lafuente y cols., 2008 | 2,8 | 0,11-70,81 | 1,91 | ** | | *** |
| Denne y cols., 2007 | 8,9 | 0,16 - 484,41 | 1,26 | | | *** |
| Ferrante y cols., 2000 | 1,6 | 0,46 - 5,32 | 10,30 | * | | ** |
| Hay y Tenser, 2000 | 3,9 | 0,07 - 214,97 | 1,26 | | | *** |
| Höllsberg y cols., 2005 | 3,0 | 0,33 - 28,23 | 3,79 | * | | ** |
| Mancuso y cols., 2007 | 3,8 | 0,15 - 95,98 | 1,91 | ** | | *** |
| Martín y cols., 1997 | 0,5 | 0,01 - 23,5 | 1,29 | * | | *** |
| Morré y cols., 2001 | 1,0 | 0,02 - 55,27 | 1,26 | | | *** |
| Morré y cols., 2001 | 1,3 | 0,03 - 69,01 | 1,30 | | | *** |
| Sanders y cols.,1996 | 0,6 | 0,23 - 1,63 | 13,86 | | | *** |
| Sotelo y cols., 2007 | 3,1 | 1,81 - 5,38 | 24,98 | | | *** |
| Wagner y cols., 2004 | 2,1 | 0,76 - 5,95 | 13,07 | ** | ** | ** |
| TOTAL | | | OR: 1,6 | | | |
| | | | (IC del 95%= 0,99-2,49; p= 0,051) | | | |

**Figura 32. Grafico forest plot de los resultados del meta-análisis para la detección de ADN de VEB.**

4.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS Y ADN

4.2.1. Producción intratecal de anticuerpos IgG específicos anti-EBNA1

Se analizó la presencia de síntesis intratecal de anticuerpos específicos IgG anti-EBNA1 de VEB en muestras pareadas de suero y LCR para cada sujeto en ambos grupos de estudio (casos y controles), diluidas para alcanzar la misma concentración de IgG (ver apartados 3.3.2. y 3.3.3.). Los resultados se muestran en las tablas 36 y 37, donde se incluye el código de cada paciente, densidad óptica (DO) de la muestra obtenida según la técnica de ELISA, para LCR y suero, y el valor del índice de anticuerpos IgG anti-EBNA1 en LCR.

Considerando un valor igual o superior a 1,5 para el índice de anticuerpos, pudimos establecer que, en 5 casos y 13 controles hubo síntesis intratecal de IgG anti-EBNA1.

Tabla 36. Cálculo del IA IgG anti-EBNA1 en los casos

| Código | DO LCR | DO Suero | Valor IA |
|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| P001 | 0,605 | 0,825 | 0,73 |
| P003 | 0,913 | 1,398 | 0,65 |
| P007 | 1,665 | 1,015 | 1,64 |
| P016 | 0,147 | 0,134 | 1,10 |
| P021 | 1,429 | 1,053 | 1,36 |
| P023 | 0,816 | 1,024 | 0,80 |
| P027 | 0,251 | 0,984 | 0,26 |
| P028 | 0,263 | 0,197 | 1,34 |
| P029 | 0,680 | 0,723 | 0,94 |
| P030 | 0,381 | 0,319 | 1,19 |
| P031 | 0,418 | 0,400 | 1,05 |
| P032 | 0,478 | 0,582 | 0,82 |
| P033 | 0,133 | 0,102 | 1,30 |
| P035 | 1,012 | 0,970 | 1,04 |
| P037 | 0,562 | 1,302 | 0,43 |
| P038 | 0,732 | 1,293 | 0,57 |
| P040 | 0,458 | 0,413 | 1,11 |
| P042 | 0,721 | 1,168 | 0,62 |

Tabla 36. Cálculo del IA IgG anti-EBNA1 en los casos (continuación)

| Código | DO LCR | DO Suero | Valor IA |
|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| P043 | 0,270 | 0,450 | 0,60 |
| P045 | 0,520 | 1,092 | 0,48 |
| P047 | 0,315 | 0,409 | 0,77 |
| P048 | 0,248 | 0,489 | 0,51 |
| P049 | 1,028 | 1,249 | 0,82 |
| P051 | 0,060 | 0,083 | 0,72 |
| P052 | 0,499 | 0,624 | 0,80 |
| P055 | 0,178 | 0,170 | 1,05 |
| P058 | 0,037 | 0,059 | 0,63 |
| P060 | 0,339 | 0,626 | 0,54 |
| P064 | 0,388 | 0,760 | 0,51 |
| P079 | 0,060 | 0,098 | 0,61 |
| P080 | 0,092 | 0,191 | 0,48 |
| P081 | 0,797 | 0,622 | 1,28 |
| P083 | 0,320 | 0,069 | 4,64 |
| P084 | 0,892 | 0,605 | 1,47 |
| P088 | 0,955 | 1,420 | 0,67 |
| P097 | 0,786 | 1,023 | 0,77 |
| P098 | 0,500 | 0,950 | 0,53 |
| P099 | 0,751 | 1,292 | 0,58 |
| P100 | 0,228 | 0,587 | 0,39 |
| P103 | 0,223 | 0,127 | 1,76 |
| P106 | 0,133 | 0,351 | 0,38 |
| P120 | 0,827 | 1,242 | 0,67 |
| P121 | 0,243 | 0,389 | 0,62 |
| P122 | 0,869 | 0,610 | 1,42 |
| P123 | 0,923 | 0,688 | 1,34 |
| P127 | 0,122 | 0,508 | 0,24 |
| P131 | 0,525 | 1,090 | 0,48 |
| P133 | 0,881 | 0,719 | 1,23 |
| P138 | 0,443 | 0,742 | 0,60 |
| P142 | 0,150 | 0,324 | 0,46 |
| P145 | 0,764 | 1,244 | 0,61 |
| P147 | 0,039 | 0,141 | 0,28 |
| P149 | 0,211 | 0,378 | 0,56 |
| P152 | 0,356 | 0,586 | 0,61 |
| P155 | 0,371 | 0,316 | 1,17 |

Tabla 36. Cálculo del IA IgG anti-EBNA1 en los casos (continuación)

| Código | DO LCR | DO Suero | Valor IA |
|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| P159 | 0,449 | 0,730 | 0,62 |
| P161 | 0,170 | 0,099 | 1,72 |
| P162 | 0,870 | 1,050 | 0,83 |
| P165 | 0,054 | 0,097 | 0,56 |
| P166 | 1,130 | 1,884 | 0,60 |
| P168 | 1,263 | 1,312 | 0,96 |
| P169 | 0,142 | 0,158 | 0,90 |
| P175 | 0,156 | 0,269 | 0,58 |
| P177 | 0,166 | 0,106 | 1,57 |
| P181 | 0,083 | 0,194 | 0,43 |
| P183 | 0,073 | 0,252 | 0,29 |
| P186 | 0,043 | 0,031 | 1,39 |
| P188 | 0,175 | 0,396 | 0,44 |
| P190 | 0,236 | 0,503 | 0,47 |
| P197 | 0,127 | 0,219 | 0,58 |
| P202 | 0,698 | 0,995 | 0,70 |
| P204 | 1,532 | 1,135 | 1,35 |
| P207 | 0,681 | 1,212 | 0,56 |
| P208 | 0,327 | 0,407 | 0,80 |
| P209 | 0,653 | 0,892 | 0,73 |
| P210 | 0,666 | 1,353 | 0,49 |

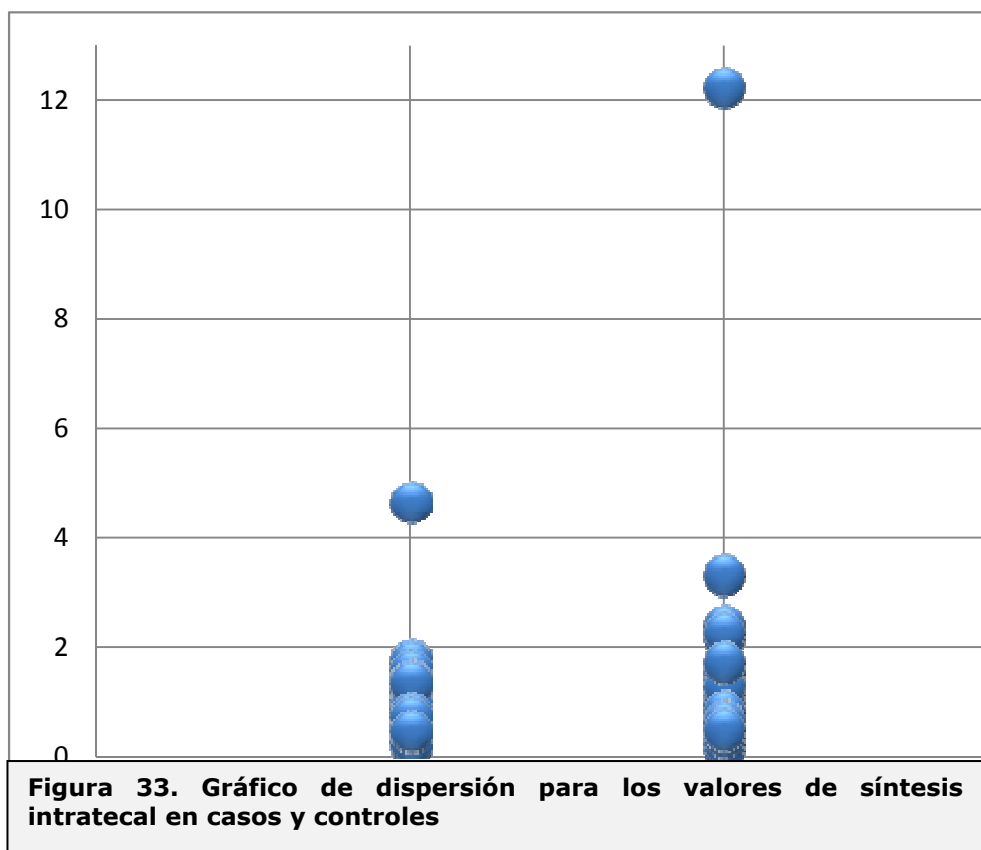
Tabla 37. Cálculo del IA IgG anti-EBNA1 en los controles

| Codigo | DO LCR | DO Suero | Valor IA |
|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| P002 | 0,109 | 0,333 | 0,33 |
| P004 | 0,189 | 0,185 | 1,02 |
| P006 | 0,399 | 0,430 | 0,93 |
| P008 | 0,271 | 0,126 | 2,15 |
| P017 | 0,372 | 0,156 | 2,38 |
| P019 | 0,319 | 0,531 | 0,60 |
| P024 | 0,470 | 0,704 | 0,67 |
| P036 | 0,436 | 0,609 | 0,72 |
| P041 | 0,194 | 0,435 | 0,45 |
| P050 | 0,082 | 0,034 | 2,41 |
| P053 | 0,042 | 0,042 | 1,00 |
| P059 | 0,179 | 0,206 | 0,87 |
| P063 | 0,221 | 0,229 | 0,97 |
| P065 | 0,104 | 0,109 | 0,95 |
| P077 | 0,414 | 0,556 | 0,74 |
| P078 | 0,157 | 0,222 | 0,71 |
| P082 | 0,248 | 0,247 | 1,00 |
| P085 | 1,170 | 1,259 | 0,93 |
| P086 | 0,072 | 0,278 | 0,26 |
| P094 | 0,110 | 0,082 | 1,34 |
| P101 | 1,323 | 1,445 | 0,92 |
| P102 | 0,413 | 0,327 | 1,26 |
| P104 | 0,160 | 0,204 | 0,78 |
| P105 | 0,165 | 0,171 | 0,96 |
| P108 | 0,429 | 0,259 | 1,66 |
| P109 | 0,447 | 0,288 | 1,55 |
| P117 | 0,512 | 2,128 | 0,24 |
| P124 | 1,022 | 0,933 | 1,10 |
| P125 | 0,733 | 0,752 | 0,97 |
| P126 | 1,101 | 1,682 | 0,65 |
| P128 | 0,323 | 0,709 | 0,46 |
| P129 | 0,124 | 0,167 | 0,74 |
| P130 | 0,293 | 0,389 | 0,75 |
| P134 | 0,401 | 0,546 | 0,73 |
| P135 | 0,737 | 0,222 | 3,32 |
| P136 | 0,667 | 0,805 | 0,83 |
| P139 | 0,050 | 0,129 | 0,39 |

Tabla 32. Cálculo del IA IgG anti-EBNA1 en los controles (continuación)

| Codigo | DO LCR | DO Suero | Valor IA |
|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| P140 | 0,098 | 0,124 | 0,79 |
| P141 | 0,081 | 0,185 | 0,44 |
| P143 | 0,181 | 0,286 | 0,63 |
| P144 | 0,661 | 0,054 | 12,24 |
| P146 | 0,388 | 0,869 | 0,45 |
| P148 | 0,475 | 0,713 | 0,67 |
| P151 | 0,514 | 0,998 | 0,52 |
| P153 | 0,987 | 0,644 | 1,53 |
| P154 | 0,443 | 0,356 | 1,24 |
| P156 | 0,344 | 0,648 | 0,53 |
| P157 | 1,031 | 1,355 | 0,76 |
| P158 | 0,363 | 1,054 | 0,34 |
| P160 | 0,249 | 0,311 | 0,80 |
| P163 | 0,069 | 0,044 | 1,57 |
| P164 | 0,142 | 0,214 | 0,66 |
| P167 | 1,110 | 0,898 | 1,24 |
| P170 | 0,072 | 0,050 | 1,44 |
| P171 | 0,170 | 0,336 | 0,51 |
| P172 | 0,051 | 0,044 | 1,16 |
| P174 | 0,134 | 0,097 | 1,38 |
| P176 | 0,023 | 0,167 | 0,14 |
| P180 | 0,293 | 0,172 | 1,70 |
| P182 | 0,109 | 0,208 | 0,52 |
| P187 | 0,195 | 0,086 | 2,27 |
| P191 | 0,055 | 0,198 | 0,28 |
| P192 | 0,206 | 0,259 | 0,80 |
| P193 | 0,655 | 0,523 | 1,25 |
| P195 | 0,383 | 0,585 | 0,65 |
| P196 | 0,659 | 0,440 | 1,50 |
| P199 | 0,263 | 0,376 | 0,70 |
| P200 | 0,371 | 0,287 | 1,29 |
| P201 | 0,862 | 1,051 | 0,82 |
| P203 | 0,618 | 0,901 | 0,69 |
| P205 | 0,905 | 1,386 | 0,65 |
| P206 | 0,164 | 0,414 | 0,40 |
| P211 | 0,135 | 0,079 | 1,71 |
| P212 | 0,084 | 0,174 | 0,48 |
| P213 | 0,128 | 0,255 | 0,50 |

En la figura 33 se observa la distribución de los valores del índice de anticuerpos, para los casos y los controles. La mayor parte de valores se agrupan, en ambos casos, entre un valor de IA=0 e IA=3, aproximadamente.



En la tabla 38 se observa la media (\pm DE) y rango del valor del IA de IgG anti-EBNA1 considerando todos los sujetos del estudio. Como se puede apreciar, el valor medio del IA fue menor en los casos que en los controles, y estos últimos presentaron un rango de valores más amplio.

Tabla 38. Valor medio del IA de IgG anti-EBNA1 en pacientes con EM y controles

| | Número observaciones | Valor medio IA (\pm DE) | Rango |
|------------------|----------------------|----------------------------|------------|
| Casos | 76 | 0,85 (\pm 0,58) | 0,24-4,64 |
| Controles | 75 | 1,11 (\pm 1,42) | 0,14-12,24 |

En la tabla 39 se observa la media (\pm DE) y rango del valor de IA de IgG anti-EBNA1 considerando aquellos sujetos que tuvieron una IA $\geq 1,5$. Al igual que en la situación anterior, el valor medio del IA, fue menor en los casos que en los controles, y estos últimos presentaron un rango de valores más amplio.

Tabla 39. Valor medio del IA de IgG anti-EBNA1 en los sujetos con un IA $\geq 1,5$

| | Número observaciones (%) | Valor medio IA (\pm DE) | Rango |
|------------------|--------------------------|----------------------------|-----------|
| Casos | 5/76 (6,6%) | 2,3 \pm 1,32 | 1,57-4,64 |
| Controles | 13/75 (17,3%) | 2,8 \pm 2,89 | 1,5-12,24 |

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (casos y controles) para los valores de IA en LCR, determinado mediante el Test de Wilcoxon para muestras independientes ($p=0,1229$), ni con el test de Welch ($p=0,1548$).

4.2.1.1. Distribución del IA en función de la edad

En las figuras 34 y 35 se muestra la distribución de los valores de IA según la edad de los casos y los controles, respectivamente.

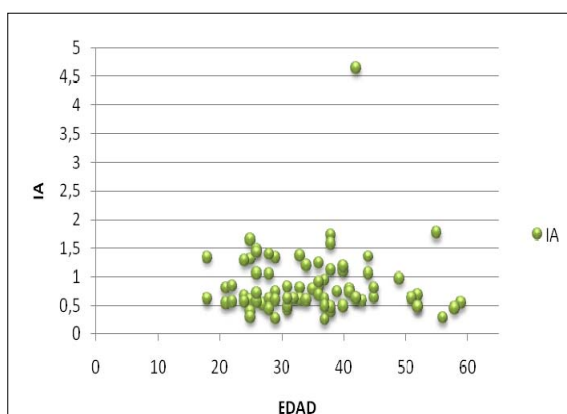


Figura 34. Gráfico de dispersión para los valores de IA en los casos, en función de la edad

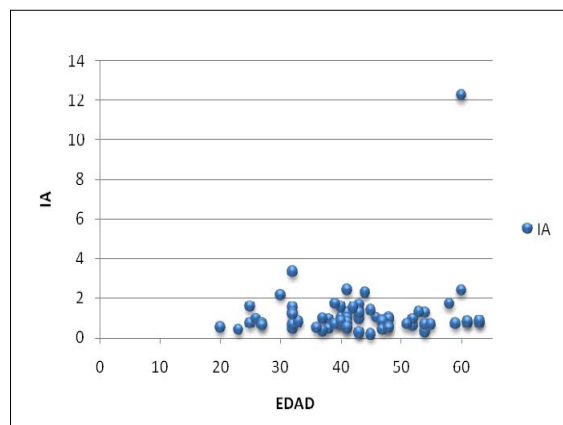


Figura 35. Gráfico de dispersión para los valores de IA en los controles, en función de la edad

En las figuras 36 y 37 se muestra la distribución de los valores de IA que fueron iguales o superiores a 1,5, según la edad de los casos y los controles, respectivamente.

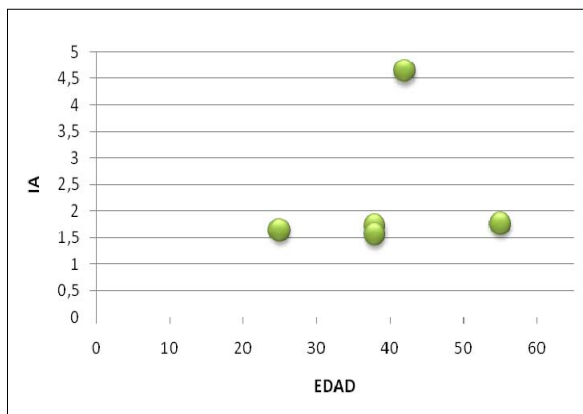


Figura 36. Gráfico de dispersión para los valores de IA $\geq 1,5$ entre los casos, en función de la edad

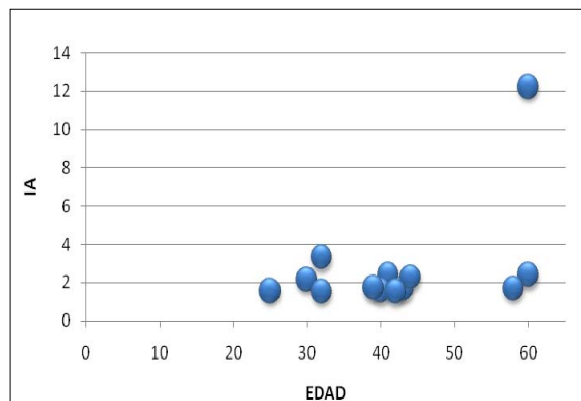


Figura 37. Gráfico de dispersión para los valores de IA $\geq 1,5$ entre los controles, en función de la edad

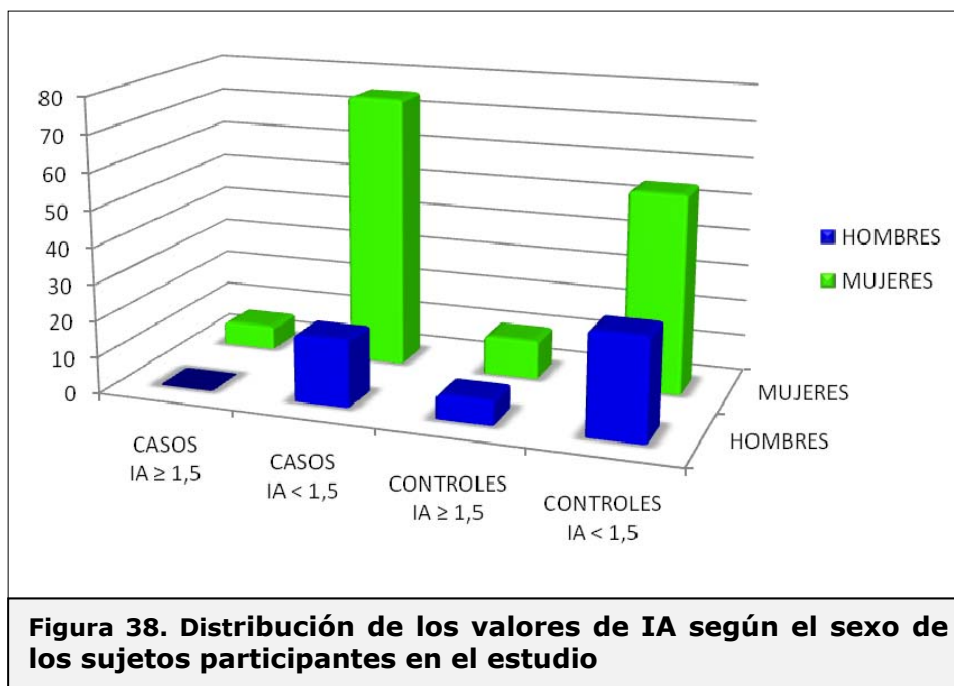
En la tabla 40 se muestra la edad media (\pm DE) y rango de edades de los sujetos que presentaron valores de IA superiores o iguales a 1,5, tanto entre los casos como entre los controles, comparados con los valores de edad entre los sujetos con un IA inferior a 1,5.

Tabla 40. Edad media (\pm DE) y rango de los sujetos participantes en el estudio según el IA

| | IA $\geq 1,5$ (%) | Edad media \pm DE (rango) | IA $< 1,5$ (%) | Edad media \pm DE (rango) |
|------------------|---|---|---|---|
| Casos | 5/76 (6,6%) | 39,6 \pm 10,76 (22-55) | 71/76 (93,4%) | 34,57 \pm 9,67 (18-59) |
| Controles | 13/75 (17,3%) | 42 \pm 11,38 (25-60) | 62/75 (82,6%) | 46,29 \pm 13,13 (20-73) |

4.2.1.2. Distribución del IA en función del sexo

En la figura 38 se muestra la distribución de los valores de IA según el sexo de los casos y los controles.



En la tabla 41 se muestra la distribución por sexos de los sujetos participantes en el estudio según el IA. No hubo diferencias significativas en la distribución del IA según el sexo de los sujetos ($p=1,000$).

Tabla 41. Distribución por sexos de los sujetos participantes en el estudio según el IA

| | IA ≥ 1,5 | | IA < 1,5 | |
|------------------|------------|-----------|-------------|-------------|
| | Mujeres | Hombres | Mujeres | Hombres |
| Casos | 5 (6,57%) | 0 | 57 (75%) | 14 (18,42%) |
| Controles | 8 (10,68%) | 5 (6,66%) | 41 (54,66%) | 21 (28%) |

4.2.1.3. Distribución del IA en función del tiempo de evolución de la enfermedad

En la figura 39 se muestra la distribución de los valores de IA según el tiempo de evolución de la enfermedad. En las figuras 40 y 41 se diferencia en función del punto de corte de los valores de IA (1,5).

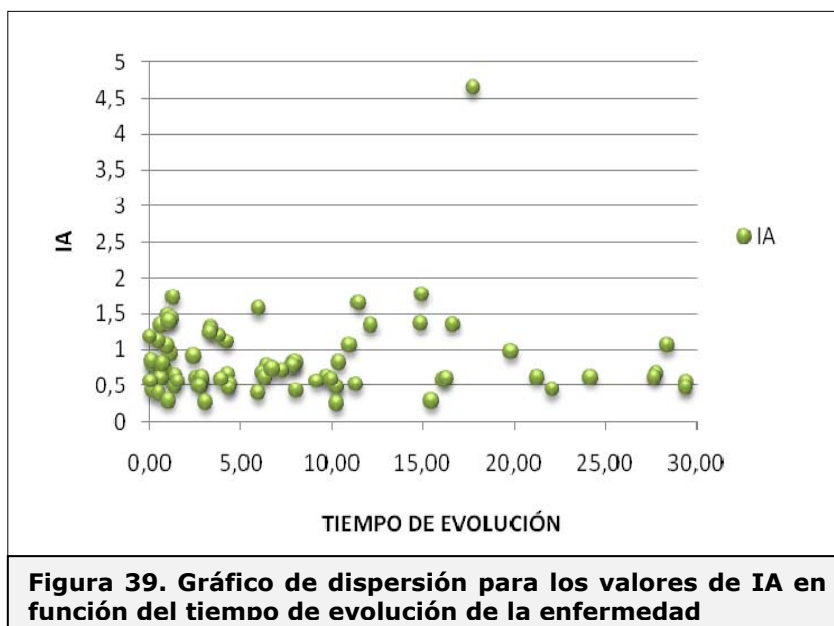


Figura 39. Gráfico de dispersión para los valores de IA en función del tiempo de evolución de la enfermedad

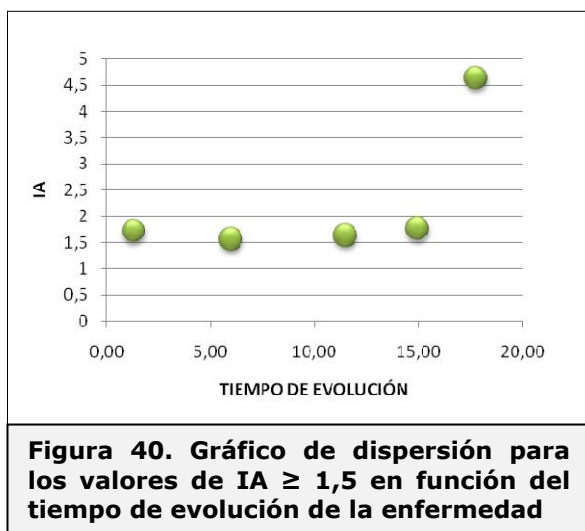


Figura 40. Gráfico de dispersión para los valores de IA $\geq 1,5$ en función del tiempo de evolución de la enfermedad

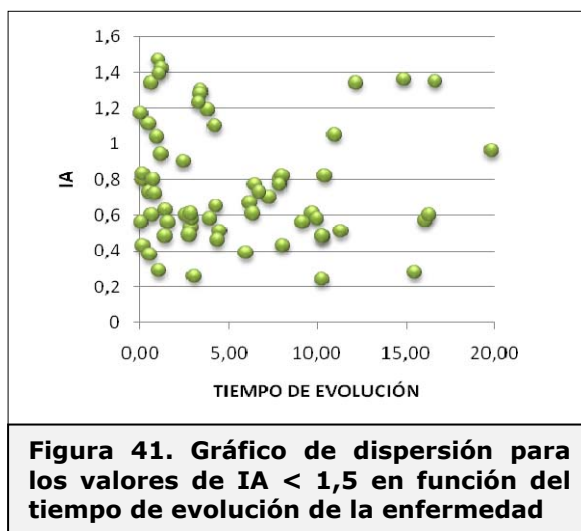


Figura 41. Gráfico de dispersión para los valores de IA $< 1,5$ en función del tiempo de evolución de la enfermedad

En la tabla 42 se muestra el tiempo medio de evolución de la EM (\pm DE) y rango en los enfermos con una IA $\geq 1,5$ y en los enfermos con un IA $< 1,5$.

Tabla 42. Índice de anticuerpo en función del tiempo medio de evolución de la enfermedad

| | | Tiempo medio de evolución (años) ± DE (rango) |
|--------------------|----------------|--|
| IA ≥ 1,5 | 5/76 (6,6%) | 10,31 ± 6,67 (1,32-17,76) |
| IA < 1,5 | 71/76 (93,42%) | 7,84 ± 8,22 (0,05-29,45) |

4.2.1.4. Distribución del IA en función de la forma de presentación clínica de la enfermedad

En la figura 42 se muestra la distribución de los valores de IA según la forma de presentación de la enfermedad.

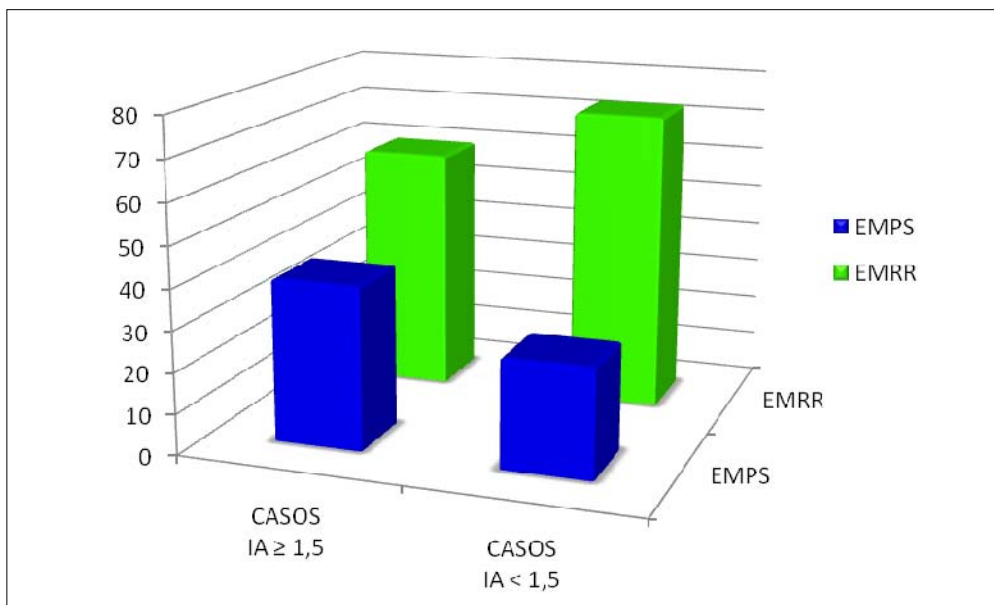


Figura 42. Distribución de los valores de IA según la forma clínica de presentación de la enfermedad

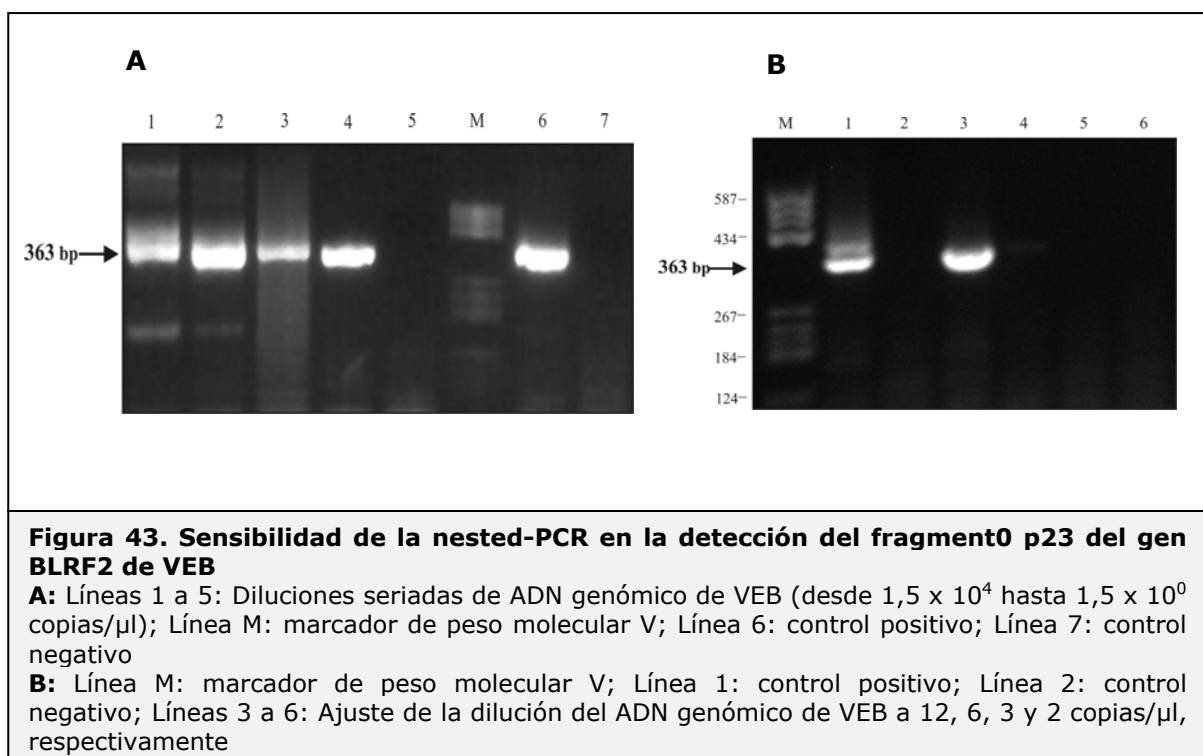
En la tabla 43 se muestra la distribución de los casos según la forma clínica de la enfermedad y el IA. No hubo diferencias significativas en la distribución de los valores de IA según la forma clínica de presentación de la enfermedad (p=0,612).

Tabla 43 Índice de anticuerpo en función de la forma clínica de la enfermedad

| | EMRR | EMSP |
|---------------------------------|---------------|---------------|
| IA \geq 1,5 | 3/5 (60%) | 2/5 (40%) |
| IA < 1,5 | 52/71 (73,2%) | 19/71 (26,7%) |

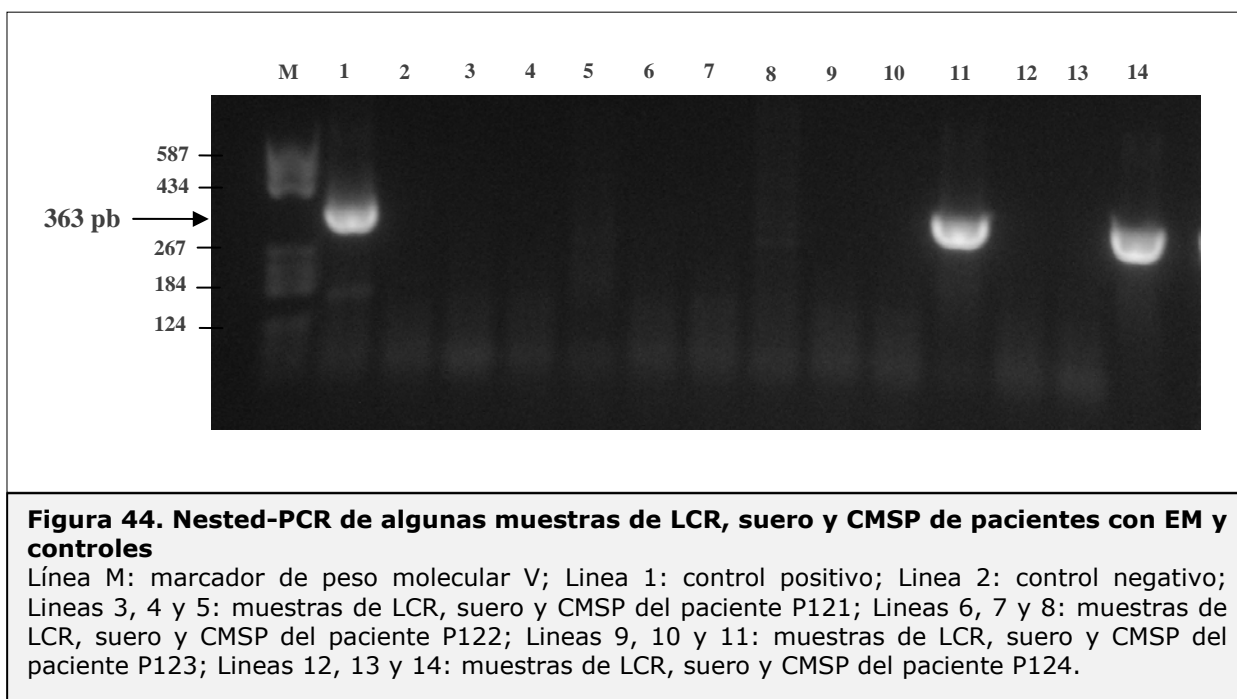
4.2.2. Sensibilidad de la nested-PCR para la detección de ADN de VEB

Antes de realizar la detección de ADN de VEB en cada una de las muestras de LCR, suero y CMSP en los casos y controles, se realizó un ensayo para determinar la sensibilidad de la técnica de nested-PCR que se utilizaría (apartado 3.3.4.2.). Como se observa en la figura 43, el ADN del fragmento p23 del gen BLRF2 de VEB pudo ser detectado con una sensibilidad de 6 copias/ μ l, que consideramos adecuada para nuestro estudio.



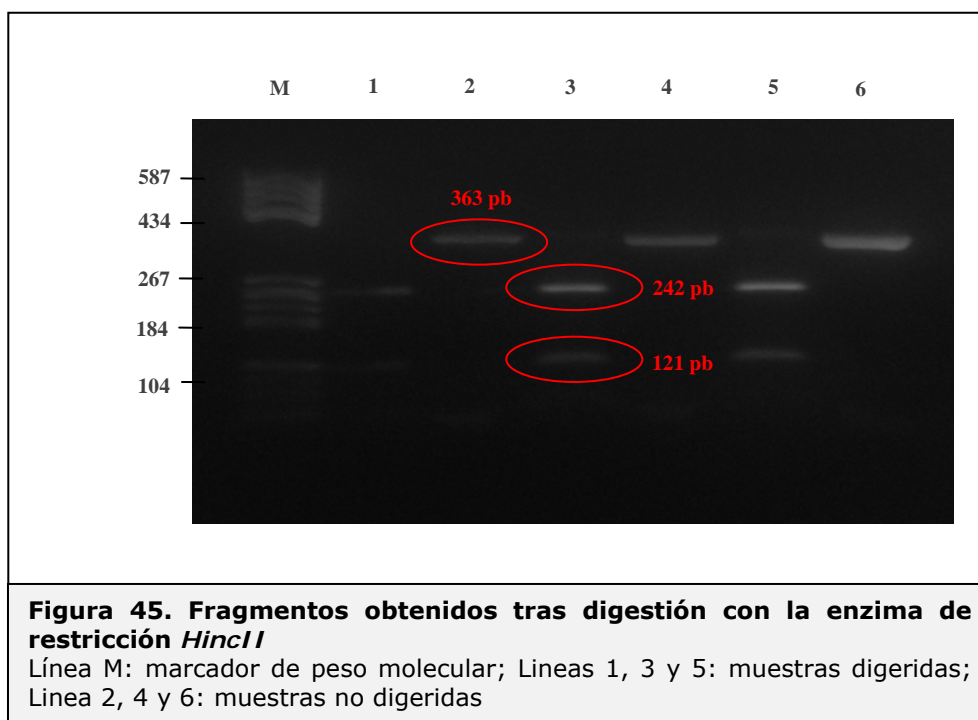
4.2.3. Detección de ADN de VEB mediante nested PCR en suero, LCR, y CMSP

En la figura 44 se observa el resultado de la nested-PCR en diferentes muestras de LCR, suero y CMSP, observándose, en las muestras positivas, la presencia de una banda de 363 pb. En todas las muestras de CMSP, de todos los sujetos del estudio, además, se amplificó el gen de la β -actina en la primera PCR (datos no mostrados).



Para comprobar que los amplicones generados eran los correctos, y por lo tanto el fragmento que buscamos, los productos positivos de la nested-PCR se confirmaron mediante la digestión con enzima de restricción *HincII*, dando lugar a dos fragmentos de 242 pb y 121 pb (figura 45).

Los resultados obtenidos se observan en la tabla 44, donde se describe, para cada grupo de sujetos, el código de cada paciente y la detección o no de ADN en cada muestra.



Hubo, entre los casos, 19 sujetos en los que se detectó ADN en alguna de las tres muestras. No se detectó ADN en suero, sólo en un caso se detectó ADN en LCR y en 19 se detectó en CMSP. Entre los controles se detectó ADN exclusivamente en CMSP en 14 individuos. Según el test de Fisher, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la detección de ADN de VEB entre los casos y los controles ($p=0,432$).

Tabla 44. Detección de ADN de VEB en los casos

| Codigo | LCR | Suero | Células |
|---------------|------------|--------------|----------------|
| P001 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P003 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P007 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P016 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P021 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P023 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P027 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P028 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P029 | Negativa | Negativa | Negativa |

Tabla 44. Detección de ADN de VEB en los casos (continuación)

| Código | LCR | Suero | Células |
|---------------|------------|--------------|----------------|
| P030 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P031 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P032 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P033 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P035 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P037 | Positiva | Negativa | Positiva |
| P038 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P040 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P042 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P043 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P045 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P047 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P048 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P049 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P051 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P052 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P055 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P058 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P060 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P064 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P079 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P080 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P081 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P083 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P084 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P088 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P097 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P098 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P099 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P100 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P103 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P106 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P120 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P121 | Negativa | Negativa | Negativa |

Tabla 44. Detección de ADN de VEB en los casos (continuación)

| Codigo | LCR | Suero | Células |
|---------------|------------|--------------|----------------|
| P122 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P123 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P127 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P131 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P133 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P138 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P142 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P145 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P147 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P149 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P152 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P155 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P159 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P161 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P162 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P165 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P166 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P168 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P169 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P175 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P177 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P181 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P183 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P186 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P188 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P190 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P197 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P202 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P204 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P207 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P208 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P209 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P210 | Negativa | Negativa | Negativa |

Tabla 45. Detección de ADN de VEB en los controles

| Codigo | LCR | Plasma | Células |
|---------------|------------|---------------|----------------|
| P002 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P004 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P006 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P008 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P017 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P019 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P024 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P036 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P041 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P050 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P053 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P059 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P063 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P065 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P077 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P078 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P082 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P085 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P086 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P094 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P101 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P102 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P104 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P105 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P108 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P109 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P117 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P124 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P125 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P126 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P128 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P129 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P130 | Negativa | Negativa | Negativa |

Tabla 45. Detección de ADN de VEB en los controles (continuación)

| Codigo | LCR | Plasma | Células |
|---------------|------------|---------------|----------------|
| P134 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P135 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P136 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P139 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P140 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P141 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P143 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P144 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P146 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P148 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P151 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P153 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P154 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P156 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P157 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P158 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P160 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P163 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P164 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P167 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P170 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P171 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P172 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P174 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P176 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P180 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P182 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P187 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P191 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P192 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P193 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P195 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P196 | Negativa | Negativa | Negativa |

Tabla 45. Detección de ADN de VEB en los controles (continuación)

| Codigo | LCR | Plasma | Células |
|---------------|------------|---------------|----------------|
| P199 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P200 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P201 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P203 | Negativa | Negativa | Positiva |
| P205 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P206 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P211 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P212 | Negativa | Negativa | Negativa |
| P213 | Negativa | Negativa | Negativa |

4.2.3.1. Resultados de la nested-PCR en función de la edad en CMSP

En la tabla 46 se muestra la edad media \pm DE y rango de edades de los sujetos en los que se detectó ADN de VEB, tanto entre los casos como entre los controles, comparados con los valores de edad entre los sujetos en los que no se detectó ADN.

Tabla 46. Edad media \pm DE y rango de los sujetos participantes en el estudio según la presencia de ADN

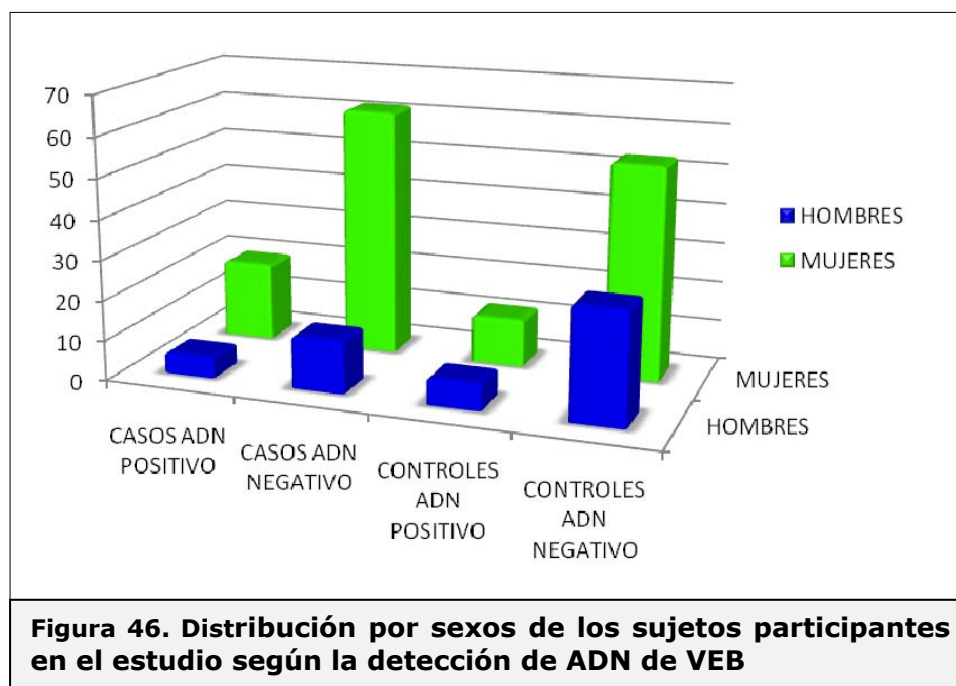
| | Positivos (%) | Edad media \pm DE (rango) | Negativos (%) | Edad media \pm DE (rango) |
|------------------|----------------------|---|----------------------|---|
| Casos | 19/76 (25%) | 35,31 \pm 10,10 (18-56) | 57/76 (75%) | 34,77 \pm 9,72 (18-59) |
| Controles | 14/75 (18,7%) | 51,21 \pm 13,48 (32-72) | 61/75 (81,3%) | 44,24 \pm 12,48 (20-73) |

4.2.3.2. Resultados de la nested-PCR en función del sexo en CMSP

En la tabla 47 y figura 46 se muestra la distribución por sexos de los sujetos participantes en el estudio según la detección de ADN de VEB. No hubo diferencias significativas en los resultados de la detección de ADN en CMSP entre ambos sexos ($p=1,000$).

Tabla 47. Distribución por sexos de los sujetos participantes en el estudio según la detección de ADN

| | Positivo | | Negativo | |
|------------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| | Mujeres | Hombres | Mujeres | Hombres |
| Casos | 15 (19,73%) | 4 (5,26%) | 47 (61,84%) | 10 (13,17%) |
| Controles | 9 (12%) | 5 (6,66%) | 40 (53,34%) | 21 (28%) |



4.2.3.3. Resultados de la nested-PCR en función del tiempo de evolución de la enfermedad

En la tabla 48 se muestra el tiempo medio de evolución de la EM (\pm DE) y rango en los enfermos con o sin presencia de ADN de VEB.

Tabla 48. Presencia de ADN de VEB en función del tiempo medio de evolución de la enfermedad

| | | Tiempo medio de evolución (años) ± DE (rango) |
|------------------|-------------|--|
| Positivos | 19/76 (25%) | 8,45 ± 9,2 (0,18-29,42) |
| Negativos | 57/76 (75%) | 7,85 ± 7,8 (0,05-29,45) |

4.2.3.4. Resultados de la nested-PCR en función de la forma clínica

En la tabla 49 y figura 47 se muestra la distribución de los casos según la forma clínica de la enfermedad y la detección de ADN. No hubo diferencias significativas en los resultados de la detección de ADN de VEB según la forma clínica de presentación de la EM (p=1,000).

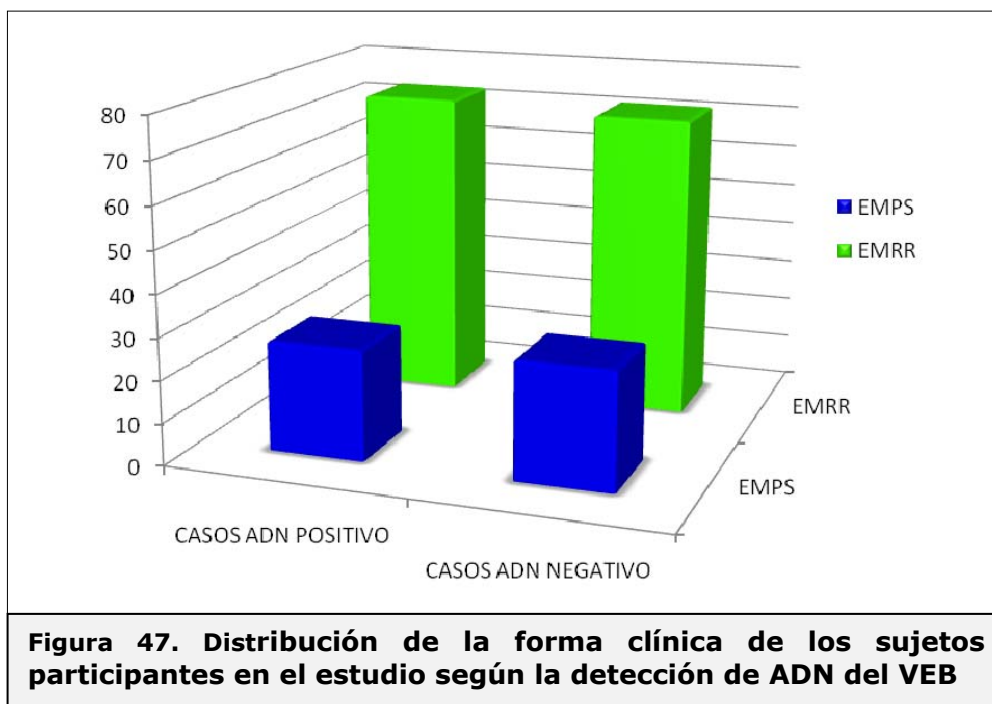


Tabla 49. Presencia de ADN de VEB en función de la forma clínica de la enfermedad

| | EMRR | EMSP |
|------------------|----------------|--------------|
| Positivos | 14/19 (73,7 %) | 5/19 (26,3%) |
| Negativos | 41/57 (71,92%) | 16/57 (28%) |

5. DISCUSIÓN

5.1. REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

5.1.1. Asociación entre la detección de anticuerpos frente al virus de Epstein-Barr y riesgo de esclerosis múltiple

Desde hace más de 30 años se ha estudiado la posible asociación entre la infección por el VEB y la EM basándose en estudios serológicos. En uno de estos primeros trabajos, Sumaya y cols. [1976], se encontró un aumento del título de anticuerpos anti-VCA en un gran porcentaje de pacientes con EM, comparando con controles sanos. Posteriormente, en 1980, los mismos autores [Sumaya y cols., 1980] volvieron a encontrar el mismo patrón.

Unos años más tarde, Larsen y cols. [1985] estudiaron la presencia de anticuerpos anti-complejo EBNA y anti-VCA en pacientes con EM y controles, y hallaron un 100% de seropositivos entre los casos, frente a un 84% entre los controles. Estos resultados se han ido reproduciendo, posteriormente, por otros grupos de investigadores, por lo que algunos autores han deducido que la infección por el VEB podría ser un posible prerrequisito para desarrollar EM [Ascherio y cols, 2001; Bray y cols., 1983; Buljevac y cols., 2005; De Jager y cols., 2008; Haahr y cols., 2004; Levin y cols., 2005; Myhr y cols., 1998; Riverol y cols., 2007; Shirodaria y cols., 1987, Sumaya y cols., 1985; Sündstrom y cols., 2004; Villoslada y cols., 2003; Wadinger y cols., 2000].

En determinadas enfermedades causadas por el VEB, como LB, CNF o LH, se han encontrado títulos elevados de anticuerpos frente al virus varios años antes del diagnóstico de estas enfermedades [Ascherio y Munger, 2007]. Por eso, una contribución importante para entender la relación entre el VEB y la EM procede de los estudios prospectivos y longitudinales, realizados en individuos sanos que, posteriormente, han desarrollado esta enfermedad. En este sentido, existen algunos trabajos realizados sobre muestras recogidas entre 5 y 20 años antes de los primeros síntomas, por tanto, en individuos sanos, que han demostrado que el riesgo de desarrollar EM es superior en personas con títulos de anticuerpos elevados (fundamentalmente anti-EBNA1, anti-EBNA2 y anti-EA) antes de los primeros síntomas de la enfermedad

[Ascherio y cols, 2001; DeLorenze y cols, 2006; Levin y cols., 2003; Levin y cols, 2005; Sundström y cols., 2004].

5.1.1.1. Anticuerpos IgG anti-VCA

El antígeno VCA es un antígeno que se expresa en la fase tardía del ciclo replicativo del virus. Los niveles elevados de IgG anti-VCA no indican infección reciente, por muy altos que sean éstos, sino que son indicativos de infección pasada. No se incrementan en la fase de convalecencia y son detectables de por vida [Gutiérrez y cols., 2006].

La existencia, según nuestra metodología analítica, de asociación significativa entre la detección de IgG anti-VCA y EM, no indicaría la presencia de infección reciente, sino una infección ya pasada, y, por lo tanto, podríamos decir que la presencia de este anticuerpo se relacionaría con una posible implicación del VEB en el inicio del proceso patogénico de la enfermedad.

En diversos estudios que han realizado determinación cuantitativa de IgG anti-VCA, y que, por su metodología, no han podido ser utilizados en este meta-análisis, el título de anticuerpos en los enfermos con EM fue significativamente más elevado que en los controles (tabla 50). También en estos trabajos, por tanto, según el comportamiento del anticuerpo anti-VCA, podríamos considerar que la infección pasada por VEB podría ser un prerrequisito para el desarrollo posterior de EM, de forma que el virus requeriría un periodo de latencia tras el cual se incrementaría el riesgo de padecer la enfermedad.

Este mismo patrón observado para anti-VCA y propuesto para la EM, se ha encontrado en otras enfermedades como LB [de-Thé y cols., 1978], CNF [Zeng, 1985], LH [Mueller y cols., 1989], Leucemia Crónica Linfocítica [Dölken y cols., 1986], LES [Origi y cols., 1988; Zandman-Goddard y cols., 2009], AR [Shirodaria y cols., 1987], y otros estados de inmunodeficiencia [Yao y cols., 1996; Yao y cols., 1985;]. Aunque, en algunos casos, la titulación no fue muy elevada, siempre estuvo por encima del título de los controles.

En algunas de estas enfermedades asociadas al VEB, especialmente en el CNF, el incremento del título de anticuerpos meses, e incluso varios años antes de los primeros síntomas de la enfermedad, se ha usado, además, como marcador de la misma [Rickinson y Kieff, 2001].

Tabla 50. Resultados cuantitativos en los estudios que investigaron IgG anti-VCA

| Estudios | Tipo de muestras | Casos | Valor casos (unidades) | Controles | Valor controles (unidades) |
|-----------------------------|------------------|-------|--------------------------|-----------|----------------------------|
| Ascherio y cols., 2001 | Suero | 144 | 1613 (MGT) | 288 | 1036 (MGT) |
| Bray y cols., 1992b | LCR | 77 | 2,79 (MGT) | 41 | 1,41 (MGT) |
| | Suero | 77 | 292 (MGT) | 41 | 218 (MGT) |
| Bray y cols., 1983 | Suero | 313 | 208 (MGT) | 406 | 65 (MGT) |
| DeLorenze y cols., 2006 | Suero | 42 | 718 (MGT) | 132 | 633 (MGT) |
| Pohl y cols., 2006 | Suero | 94 | 62 (UI/ml) | 94 | 44 (UI/ml) |
| Shirodaria y cols., 1987 | Suero | 26 | 1584 MGT | 26 | 340 MGT |
| Sumaya y cols., 1980 | Suero | 157 | 107 (MGT) | 81 | 77,1 (MGT) |
| Sumaya y cols., 1976 | Suero | 142 | 111 (MGT) | 74 | 82 (MGT) |
| Woyciechowska y cols., 1985 | Suero | 32 | 2,62 ± 0,19 (MGT) | 16 | 2,69 ± 0,12 (MGT) |
| Zivadnov y cols., 2006 | Suero | 140 | 221,8 ± 117,5 (MGT ± DE) | 131 | 196,3 ± 98,8 (MGT ± DE) |

5.1.1.2. Anticuerpos IgG anti-complejo EBNA

En general, los EBNA son antígenos no estructurales y los primeros en expresarse tras la infección por VEB. Los anticuerpos anti-complejo EBNA se detectan unos meses más tarde, en una fase avanzada de la infección, ya que su formación depende de la destrucción de la célula infectada y de que el antígeno quede expuesto al sistema inmune. La IgG anti-complejo EBNA se puede detectar en suero de pacientes con infección primaria por VEB, normalmente coincidiendo con el descenso de IgM anti-VCA, y permanece detectable de por vida [Gutiérrez y cols., 2006].

Según la metodología empleada en nuestro trabajo, existió asociación significativa entre la detección de este marcador de infección y la enfermedad. La presencia de estos anticuerpos no indicaría infección reciente, sino una infección latente, y, por lo tanto, podríamos decir que la detección de estos

anticuerpos se relacionaría con una posible implicación del VEB en el inicio del proceso patogénico de la enfermedad.

De entre los estudios incluidos en el meta-análisis, únicamente el trabajo de Shirodaria y cols. [1987] no mostró asociación entre el virus y la enfermedad; sin embargo, considerando el valor cuantitativo en la detección de este anticuerpo, en ese mismo trabajo, pudimos encontrar que el título de anticuerpos fue significativamente mayor en los enfermos que en los controles (tabla 51). En esta misma tabla observamos que otros autores han obtenido resultados similares, con títulos de anticuerpos significativamente superiores siempre entre los enfermos con EM que entre los controles.

Tabla 51. Resultados cuantitativos en los estudios que investigaron IgG anti-complejo EBNA

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | Valor casos (unidades) | Controles | Valor controles (unidades) |
|--------------------------|-----------------|-------|------------------------|-----------|----------------------------|
| Ascherio y cols., 2001 | Suero | 144 | 667 (MGT) | 288 | 333 (MGT) |
| DeLorenze y cols., 2006 | Suero | 42 | 320 (MGT) | 132 | 174 (MGT) |
| Levin y cols., 2005 | Suero | 80 | 469 (MGT) | 158 | 282 (MGT) |
| Levin y cols., 2003 | Suero | 83 | 537 (MGT) | 165 | 224 (MGT) |
| Shirodaria y cols., 1987 | Suero | 26 | 1,96±0,41 (MGT ± DE) | 26 | 1,45±0,68 (MGT ± DE) |

También en este caso, en el CNF, el incremento del título de anticuerpos IgG anti-EBNA meses, e incluso varios años antes de los primeros síntomas de la enfermedad, se ha usado como marcador de la misma [Rickinson y Kieff, 2001].

5.1.1.3. Anticuerpos IgG anti-EBNA1

EBNA1 es una de las primeras proteínas expresadas después de la infección, durante la fase de latencia. El comportamiento del anticuerpo anti-EBNA1 es diferente al resto de los componentes del complejo EBNA. Muchos de los pacientes, aunque no todos, en la fase aguda de la enfermedad, presentan respuesta de tipo IgG anti-EBNA2 (y también, probablemente, anti-

EBNA3A, 3B y 3C, aunque existe más dificultad para su determinación), mientras que la respuesta de IgG anti-EBNA1 no se detecta hasta la fase de convalecencia. El patrón de respuesta frente a este anticuerpo, comparada con la respuesta frente al resto de antígenos que forman la familia EBNA, podría interpretarse como la presencia de diferentes tipos de células infectadas de forma latente [Rickinson y Kieff, 2001].

Según la metodología empleada en nuestro trabajo, existió asociación significativa entre la detección de este marcador de infección y la enfermedad. La aparición de estos anticuerpos podría indicar una infección ya pasada, y, por lo tanto, podríamos decir que la presencia de este anticuerpo también se relacionaría con una posible implicación del VEB en el inicio del proceso patogénico de la enfermedad.

En los estudios que realizaron un análisis cuantitativo del anticuerpo IgG anti-EBNA1 (tabla 52), destacó que los títulos fueron, en todos los trabajos, significativamente superiores entre los casos, por tanto, según éstos, también parece existir relación entre la infección por VEB y la EM.

Tabla 52. Resultados cuantitativos en los estudios que investigaron IgG anti-EBNA1

| Estudios | Tipo de muestra | Casos | Valor casos (unidades) | Controles | Valor controles (unidades) |
|-------------------------|-----------------|-------|-------------------------|-----------|----------------------------|
| Ascherio y cols., 2001 | Suero | 18 | 515 (MGT) | 18 | 203 (MGT) |
| Banwell y cols., 2007 | Suero | 126 | 187,4 ± 59,5 (MGT ± DE) | 96 | 152,5 ± 70,1 (MGT ± DE) |
| DeLorenze y cols., 2006 | Suero | 42 | 299 (MGT) | 132 | 162 (MGT) |
| Levin y cols., 2005 | Suero | 80 | 326 (MGT) | 158 | 230 (MGT) |
| Levin y cols., 2003 | Suero | 83 | 385 (MGT) | 165 | 179 (MGT) |
| Pohl y cols., 2006 | Suero | 71 | 36 (UI/ml) | 71 | 14 (UI/ml) |
| Vaughan y cols., 1996 | Suero | 35 | 1,63 ± 0,078 (MGT ± DE) | 36 | 1,15 ± 0,106 (MGT ± DE) |

En el trabajo de Ascherio y cols. [2001], realizado en muestras de suero recolectadas antes de los primeros síntomas, encontraron un aumento significativo del título de anticuerpos frente a los antígenos del VEB expresados durante la fase de latencia (EBNA1 y EBNA2) y de la fase de replicación del virus (EA). Levin y cols. [2005], en un estudio similar, también

encontraron un aumento significativo de los títulos de IgG anti-complejo EBNA y EBNA1 en el suero procedente de sujetos que aún no habían desarrollado los primeros síntomas de la enfermedad. DeLorenze y cols. [2006] obtuvieron resultados similares a los anteriores, con títulos elevados de anticuerpos anti-EBNA1 hasta 20 años antes de los primeros síntomas, y que permanecían constantes en el tiempo.

La causa de la elevación de los niveles de estos anticuerpos antes de la EM es desconocida, pero se considera que podría ser una manifestación temprana de una fase preclínica de la enfermedad, lo que indicaría que el incremento de la respuesta de anticuerpos frente al VEB no es una consecuencia de la EM, sino un evento temprano en el proceso patogénico que da lugar, posteriormente, a la desmielinización y a la enfermedad clínica, siendo, por tanto, en este supuesto, la infección pasada por el VEB un prerrequisito para desarrollar la EM.

Evidentemente, estos hallazgos, a su vez, se relacionaron con la edad en que se desarrollaba la EM. En el estudio de DeLorenze y cols. [2006] se vio que en enfermos que desarrollaron la enfermedad en edades tardías, se podían detectar anticuerpos IgG anti-EBNA1 antes de los primeros síntomas de la EM; sin embargo, este patrón de respuesta no se pudo aplicar a individuos que desarrollaron la enfermedad más jóvenes. Levin y cols. [2005], por su parte, encontraron que en pacientes que desarrollaban EM después de los 25 años se detectaba previamente un aumento del título de anticuerpos frente al complejo EBNA y anti-EBNA-1, que no se daba en edades más precoces.

Este aumento del título de anticuerpos, previo a la aparición de la sintomatología de la EM, supone la hipótesis de una vulnerabilidad, relacionada con la edad [Kurtzke, 1993]. Aún así, establecer la edad de los primeros síntomas es difícil ya que muchos pacientes asintomáticos pueden presentar lesiones radiológicas silenciadas [Levin y cols., 2005].

5.1.1.4. Anticuerpos IgG anti-EA

El anticuerpo IgG anti-EA es un marcador de infección primaria o reactivación, que se produce frente a un antígeno temprano del ciclo lítico del virus. Suele desaparecer en la fase de convalecencia, aunque en un 4-20% de las personas que han pasado la infección, la respuesta a los antígenos precoces puede persistir [Gutiérrez y cols., 2006]. Según nuestro meta-análisis, no hubo asociación significativa entre la detección de IgG anti-EA y el desarrollo de EM.

Solamente en dos de los estudios [Buljevac y cols., 2005; Myhr y cols., 1998], se encontró asociación entre la infección y la enfermedad, a partir de la determinación de este marcador. En el primero de ellos se estudió, en pacientes en fase EMRR, los niveles de anticuerpos frente al VEB y la situación de actividad determinada por RMN. Se encontró, en todos los pacientes, anticuerpos frente a VCA, complejo EBNA y EA, sin diferencias significativas entre la fase estable o activa de la EMRR. En definitiva, aunque encontraron asociación entre la detección de anti-EA y la EM, la presencia de estos anticuerpos no se relacionó con la situación clínica de la enfermedad. En el segundo de los trabajos, los autores encontraron diferencias significativas entre la presencia de anticuerpos IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA e IgG anti-EA en pacientes con EM comparados con controles, pero también fue independiente de la situación clínica del paciente en el momento de la recolección de las muestras.

Por lo tanto, la presencia del anticuerpo IgG anti-EA no se ha asociado a la enfermedad, al menos de una forma clara, probablemente porque, como hemos dicho en los apartados anteriores, la infección por el VEB podría participar en las fases iniciales de desarrollo de la EM, en las que la enfermedad aún no daría manifestaciones clínicas y, para cuando éstas apareciesen, años más tarde, este anticuerpo ya no sería detectable.

Sin embargo, contrariamente a los estudios cualitativos que han detectado IgG anti-EA, la mayoría de los trabajos que han determinado la titulación de estos anticuerpos, han encontrado títulos significativamente

superiores para los enfermos que para los controles, a excepción del trabajo de DeLorenze y cols. [2006] (tabla 53).

Tabla 53. Resultados cuantitativos en los estudios que investigaron IgG anti-EA

| Estudio | Tipo de muestra | Casos | Valor casos (unidades) | Controles | Valor controles (unidades) |
|-------------------------|-----------------|-------|------------------------|-----------|----------------------------|
| Ascherio y cols., 2001 | Suero | 18 | 15,9 (MGT) | 18 | 5,9 (MGT) |
| DeLorenze y cols., 2006 | Suero | 42 | 4 (MGT) | 132 | 4 (MGT) |
| Levin y cols., 2005 | Suero | 80 | 5,3 (MGT) | 158 | 3,6 (MGT) |
| Levin y cols., 2003 | Suero | 83 | 4,3 (MGT) | 165 | 3,5 (MGT) |

En otras enfermedades asociadas al VEB, como el LB, se ha visto que existe elevación de los títulos de anticuerpos anti-VCA y anti-EA [Henle y cols., 1969]. En el CNF están elevados los niveles de IgG e IgA anti-VCA y EA [Henle y Henle, 1976], y el título de anticuerpos frente a antígenos del ciclo lítico aumentan en proporción a la carga tumoral [Henle y cols., 1970]. Esto sugiere que la estimulación antigénica proviene del mismo tumor, o que la replicación en algún otro sitio se asocia con la evolución y progresión del tumor. En este sentido, el análisis de ADN en las biopsias del CNF muestra solo ADN circular (latente) y no lineal (lítico) [Raab-Traub y Flynn 1986].

5.1.1.5. Anticuerpos heterófilos

Los AH son anticuerpos del tipo IgM, con capacidad de aglutinar eritrocitos de oveja y caballo, siendo ésta la base del test de Paul-Bunnell-Davidsohn, que, cuando es positivo, es indicativo de MI asociada al VEB, aunque los anticuerpos están con frecuencia ausentes en las infecciones primarias, principalmente en niños.

Su presencia junto a anticuerpos IgM anti-VCA, IgG anti-VCA e IgG anti-EBNA1 es indicativa de infección primaria [Nystad y Myrmel, 2007]. Normalmente, durante la infección latente, estos anticuerpos suelen estar ausentes [Thijssen y Deege, 2008].

En nuestro trabajo se encontró asociación significativa entre la detección de este marcador de infección primaria por VEB y la EM. Se podría decir que, al igual que otros anticuerpos estudiados previamente, éste se relacionaría con una posible implicación del VEB en el inicio del proceso patogénico de la enfermedad. En este sentido, Hernán y cols. [2001] consideraron que padecer MI incrementaba 2,3 veces el riesgo de desarrollar EM respecto de los sujetos que no sufrían la infección por VEB.

5.1.1.6. Otros anticuerpos frente al virus de Epstein-Barr

Debido al escaso número de trabajos incluidos en nuestro meta-análisis que estudiaron los anticuerpos IgM anti-EA, anti-VCA totales e IgG anti-VEB, debemos tomar con precaución los resultados obtenidos.

5.1.1.7. Relación entre la detección de anticuerpos, factores genéticos y esclerosis múltiple

Existen estudios que, además de la determinación de anticuerpos, han incluido el estudio de factores genéticos asociados a la EM, ya que, únicamente la exposición ambiental al VEB, no es suficiente para explicar por qué sólo unos pocos individuos desarrollan la enfermedad. Así, con el fin de encontrar una asociación entre factores genéticos, inmunológicos y microbianos en la etiología y patogénesis de la EM, Ellison y cols. [1977], realizaron un estudio que incluyó todos los factores. En este trabajo encontraron una asociación débil entre un título de anticuerpos anti-VCA elevado (>160) y la expresión de la molécula HLA-DW2 en pacientes con EM, que no se daba entre los controles. En otro estudio [Compston y cols., 1986] encontraron asociación significativa entre una alta tasa de anticuerpos frente al VEB y la presencia de HLA-DR2 en enfermos con EM. Más recientemente, Nielsen y cols. [2009], investigaron la relación entre los alelos HLA-DRB1*1501, la MI y la EM y encontraron que en los pacientes portadores de los alelos que no presentaban MI el riesgo de desarrollar EM era 2,4 veces superior respecto a los controles sanos, y que este riesgo se incrementaba hasta 7 veces en individuos con historia de MI.

Sündstrom y cols. [2008], por su parte, determinaron que el riesgo de padecer EM era mayor en individuos con presencia de anti-EBNA1 y positividad para HLA DRB1*1501. Posteriormente, en otro estudio [Sündstrom y cols., 2009], tuvieron en cuenta la reactividad epitópica de los anticuerpos frente a determinados fragmentos de EBNA1 y su asociación con la molécula de HLA DRB1*1501, observando que los enfermos con EM presentaban una mayor reactividad epitópica frente a varios dominios de EBNA1 en comparación con los controles. Determinaron que la asociación de la expresión del HLA DRB1*1501 con la presencia de anticuerpos anti-EBNA1 aumenta 24 veces el riesgo de desarrollar EM. La positividad a HLA DRB1*1501, parece estar relacionada, por tanto, con un incremento en la habilidad del sistema inmune para reconocer EBNA1 en los enfermos con EM.

5.1.2. Asociación entre la detección de ADN del virus de Epstein-Barr en sangre, LCR y tejido cerebral y riesgo de esclerosis múltiple

5.1.2.1. ADN de VEB en plasma y células mononucleares de sangre periférica

Entre los estudios incluidos en nuestro meta-análisis y que detectaron ADN de VEB en plasma [Höllsberg y cols., 2005; Wagner y cols., 2004] y en CMSP [Álvarez y cols., 2000; Ferrante y cols., 2000; Hay y Tenser y cols., 2000; Sotelo y cols., 2007], sólo se encontró asociación significativa entre la infección por el virus y el desarrollo de la enfermedad en el trabajo de Sotelo y cols. [2007], y no así en el resto de estudios. El meta-análisis de estos trabajos no encontró asociación significativa entre la detección de ADN de VEB en sangre y el desarrollo de EM, aunque hubo indicios de significación.

En los pacientes con MI el ADN del VEB puede ser detectado en el suero, lo que indica replicación viral. Posteriormente, coincidiendo con la desaparición clínica de la enfermedad la carga viral se hace indetectable en suero. Una vez pasada la infección, el VEB permanece latente en las células B memoria de la persona infectada durante el resto de su vida. Por lo tanto, en esta situación, la determinación de la carga viral en individuos sanos, nos puede dar valores aproximados de entre 3 y 29 copias/ml de sangre total

[Khan y cols., 1996; Thijsen y Deege, 2008]. De hecho, estas células B, teóricamente, pueden migrar por el organismo, y, por lo tanto, el ADN del VEB podría detectarse en una gran variedad de tejidos [Thijsen y Deege, 2008]. En estos portadores de infección, la detección de ADN en suero es debida a la rotura celular durante la manipulación de la muestra [Thijsen y Deege, 2008].

Por lo tanto, el tipo de muestra utilizada depende del objetivo que queramos darle al estudio, ya que si buscamos una infección primaria o una reactivación del VEB, una determinación del ADN presente en suero o plasma sería suficientemente sensible. Algunos autores afirman que la sangre total sería la mejor muestra para el estudio de una infección reciente o una reactivación, ya que, en ella, se detectan tanto el ADN libre en suero como el ADN presente en células memoria [Niesters, 2001; Oertel y cols., 2006].

La presencia de ADN del VEB en CMSP de individuos con EM, únicamente indicaría que estos pacientes pasaron la infección en algún momento de su vida y, por tanto, el virus podría tener una posible implicación en el inicio del proceso patogénico de la enfermedad. En este sentido algunos autores han comprobado la presencia de infección por el virus antes de los primeros síntomas de enfermedad [Wagner y cols., 2004].

5.1.2.2. ADN de VEB en LCR y biopsia de tejido cerebral post mórtem

Ninguno de los estudios incluidos en el meta-análisis y realizados en muestras procedentes del SNC, bien en LCR [Álvarez-Lafuente y cols., 2008; Denne y cols., 2007; Mancuso y cols., 2007; Martin y cols., 1997; Morré y cols., 2001] o en biopsias de tejido cerebral [Morré y cols., 2001; Sanders y cols., 1996], mostró asociación entre la infección por VEB y la enfermedad.

Sin embargo, en otro trabajo [Serafini y cols., 2007], se han encontrado marcadores de infección lítica y latente en LCR de enfermos con EM, y en folículos ectópicos, con una gran presencia de células B. Según los autores, este hallazgo sugiere un nuevo concepto patogénico de la enfermedad, donde las células B podrían estar infectadas de forma crónica y ser las portadoras del virus en el LCR. En otro estudio [Opshal y Kennedy, 2007] se buscó ARNm del VEB en sustancia blanca cortical normal y lesionada de enfermos con EM y

secciones de tejido en controles sanos, encontrando niveles bajos de este ácido nucleico en las tres categorías de tejidos, sin diferencias significativas entre los tejidos procedentes de los enfermos respecto de los controles sanos.

Sanders y cols. [1996] realizó un estudio sobre muestras de tejido cerebral para comparar la presencia del virus en placas activas e inactivas por RMN. De los estudios incluidos, fue el único en el que la detección de ADN en las muestras fue especialmente importante, si bien el porcentaje de muestras positivas en los casos (27%) fue inferior al de los controles (37,8%), constituido por pacientes con enfermedades neurológicas como Parkinson o Alzheimer. Dentro del grupo de enfermos con EM, se encontró un 5% de muestras positivas procedentes de placas activas y un 10% de las placas inactivas, por lo tanto, los autores concluyeron que el VEB no parece tener un rol directo en el proceso activo de desmielinización.

5.2. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES

5.2.1. Síntesis intratecal de anticuerpos

El LCR de los pacientes con EM es de aspecto macroscópico normal, transparente, incoloro y de presión normal. El número de células es normal (hasta 4 células/ μ l) en el 60% de los pacientes; la mayor parte son linfocitos T. Las proteínas totales y la albúmina son normales o están ligeramente elevadas en el 40% y el 20-30% de los casos, respectivamente. Un hallazgo característico es la elevación relativa, con respecto a las demás proteínas, de las inmunoglobulinas (normal hasta el 11-12% de las proteínas totales), sobre todo de la IgG (normal hasta 4 mg / 100 ml), lo que implica síntesis intratecal. La presencia de más de 50 células o de polimorfonucleares y de más de 100 mg / 100 ml de proteínas totales, y la ausencia de BO, deben hacernos sospechar otras enfermedades [Fernández y cols., 2005].

Como hemos visto en el meta-análisis, puesto que se piensa que el VEB podría jugar un papel destacado en el desarrollo de la EM, ya sea de forma directa o indirecta, se ha intentado buscar, en el órgano diana, el SNC, indicios de la presencia del virus. En este sentido son diversos los estudios que han planteado la posibilidad de que exista un aumento de la respuesta humoral frente al VEB en el cerebro de pacientes con EM. Más del 90% de los pacientes enfermos presentan altas concentraciones de inmunoglobulinas, principalmente IgG, en el LCR y en el tejido cerebral, cuya síntesis es mantenida intratecalmente [Salvetti y cols., 2009]. En las infecciones del SNC es característica la presencia de IgG oligoclonal en el LCR, que desaparece con el tiempo; sin embargo, en la EM, las BO son persistentes [Walsh y Tourtellotte, 1986]. Poco se conoce de la especificidad de estas BO, aunque se ha visto que algunas pueden unirse a antígenos virales, entre ellos, del VEB [Franciotta y cols., 2008].

Uno de los primeros estudios que determinó la presencia de anticuerpos anti-virales en el LCR fue realizado en 1975 en pacientes con neuritis óptica [Nikoskelainen y cols., 1975]. Determinaron anticuerpos frente al virus del sarampión, rubéola, parainfluenza-1 y VEB. Para este último obtuvieron un 53% de casos seropositivos frente a un 26% entre los controles.

Posteriormente, Sumaya y cols. [1985] analizaron, en pacientes con EM, las proporciones relativas de anticuerpos anti-VEB presentes en suero frente a las que se detectaban en LCR, encontrando que un 82% de los pacientes presentaban aumentada la cantidad de anticuerpos frente al antígeno VCA en LCR, en contraposición al suero, lo que se interpretó como un aumento de la producción de anticuerpos en el SNC. En 1992, otro estudio de casos y controles [Bray y cols., 1992b] estudió la presencia de inmunoglobulinas en el SNC frente al VEB, encontrando que el 85% de los pacientes con EM presentaba anticuerpos anti-EBNA1 en LCR, frente al 13% de los controles.

Tanto Rand y cols. [2000] como Cepok y cols. [2005] estudiaron la respuesta intratecal frente al VEB y observaron que las BO presentaban especificidad frente a dos proteínas del virus, EBNA1 y BRRF2, en pacientes con EM. Previamente, en el estudio de Bray y cols. [1992b] encontraron dos pentapéptidos idénticos entre EBNA1 y la proteína básica de la mielina. Este hallazgo apoya la teoría del "mimetismo molecular" basada en la homología entre secuencias peptídicas del VEB y secuencias de proteínas del SNC.

En teoría, según Rand y cols. [2000] la producción intratecal específica de anticuerpos frente a EBNA1 podría deberse a:

- Una replicación activa del VEB en el SNC. Sin embargo, si esto fuese así, también se habrían encontrado niveles de anticuerpos elevados frente a VCA, pero ésto no ocurre. Además, tampoco se ha encontrado ARNm del virus en el SNC [Hilton y cols., 1994]. Frente a éstos, Serafini y cols. [2007] encontraron expresión de proteínas de las fases de infección lítica y latente en LCR de enfermos con EM (LMP1 y EBNA2, respectivamente), y en folículos ectópicos, con una gran presencia de células B.
- Otra posibilidad es que el patrón de BO frente a EBNA1 sea debido a una encefalitis por VEB producida hace tiempo, pasando desapercibida. Esta posibilidad se basa en que durante una MI es posible una infección del SNC, que ocurre entre el 1% y el 5% de estos pacientes [Bray y cols., 1992a; Connelly y DeWitt, 1994]. Esta situación ocurre normalmente en niños [Domachowske y cols., 1996], y casi de forma exclusiva durante la infección aguda primaria [Häusler y cols., 2002]. El VEB podría permanecer latente

en el SNC después de este evento, y evadir el sistema inmune. Pero la encefalitis causada por el VEB suele ser autolimitada y se presenta con curso moderado, y normalmente se asocia con recuperación completa en pacientes inmunocompetentes [Bernstein y Wolff, 1950; Todman, 1983]. Además, en adultos, que es donde principalmente aparecen las manifestaciones clínicas de EM, se han visto muy pocos casos de encefalitis [Takeuchi y cols., 2010].

- También podría ocurrir que los niveles elevados de anticuerpos frente a EBNA1 del VEB pudieran ser el resultado de la misma actividad de la enfermedad, ya que el desequilibrio inmune en la EM se ha demostrado tanto en la respuesta inflamatoria mediada por células como en la respuesta de anticuerpos, oligoclonal y policlonal [Lassmann, 1998; Martino y cols., 2000; Swanson, 1989]. Esta producción intratecal específica de anticuerpos frente al VEB podría producirse como parte de la reactividad humoral poli-específica promovida por la inflamación activa del cerebro en la EM [Catellazzi y cols., 2010]. La síntesis intratecal de anticuerpos en el SNC podría estar originada por los infiltrados perivasculares de células B, que proliferan y maduran localmente. Junto con los anticuerpos específicos frente a un agente biológico en una infección en el SNC, puede producirse una gran fracción de inmunoglobulinas con especificidades antigénicas diferentes no relacionadas con la causa de la enfermedad, como los componentes del SNC. Este fenómeno se explica por la teoría de la red inmune, que sostiene que cada reacción inmune inducida por un simple inmunógeno, involucra a toda la red [Reiber, 1994; Reiber y Davey, 1996; Varela y Coutinho, 1991].

Un estudio más reciente [Pohl y cols., 2010] ha comparado la frecuencia e intensidad de la síntesis intratecal de anticuerpos frente al VEB con otros virus neurotrópicos (sarampión, rubéola y VVZ) en pacientes con los primeros síntomas de la EM, en muestras pareadas de suero y LCR, detectando síntesis intratecal en un 21% de los enfermos pediátricos y en un 8% de los adultos. La media de IAs para el VEB fue menor que para los otros virus. Concluyeron que la respuesta humoral frente al VEB en la EM era sólo parte de la producción poli-específica de anticuerpos intratecales en la enfermedad;

aunque sus resultados no descartaron la posibilidad de que el virus esté implicado en la patogénesis de la EM por activación de diversos mecanismos de inmunidad celular.

En nuestro estudio sobre pacientes con EM, hemos hallado producción intratecal de anticuerpos frente a IgG anti-EBNA1 únicamente en un 6,6% de éstos, frente a un 17,3% entre los controles, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de sujetos.

Estos mismos resultados se han producido en otros trabajos. Así por ejemplo, Sargsyan y cols. [2010] tampoco encontraron diferencias significativas en la producción intratecal de anticuerpos frente al VEB en adultos con EM, con cifras de un 15% entre los pacientes y un 40% entre los controles. En otro trabajo más reciente, se obtuvo para EBNA1 un índice de anticuerpos en LCR de 6,3%, sin diferencias significativas entre enfermos y controles [Castellazi y cols., 2010].

Sin embargo, existen trabajos que sí han documentado un incremento de la síntesis intratecal de anticuerpos frente al VEB en enfermos con EM comparados con grupos controles. Es el caso de los estudios de Bray y cols. [1992b], Cepok y cols. [2005], Sumaya y cols. [1985]. En el primero de estos trabajos, por ejemplo, encontraron síntesis intratecal en el 85% de pacientes con EM, mientras que sólo la presentaron el 13% de los controles.

5.2.2. Detección de ADN del virus de Epstein-Barr

Mediante nested-PCR (con una sensibilidad a partir de 6 copias/ μ l), se amplificaron secuencias del genoma de VEB en CMSP en el 25% de los enfermos con EM frente al 18,7% de los controles, sin diferencias significativa entre ambos grupos. En teoría, los métodos de determinación del IA y de detección de ADN podrían identificar agentes infecciosos similares en condiciones clínicas similares [Denne y cols., 2007]. Sin embargo, en nuestro estudio, sólo en un paciente se detectó, a la vez, producción intratecal de anticuerpos IgG anti-EBNA1 y ADN vírico en CMSP.

Estos resultados son también similares a los obtenidos por autores como Ferrante y cols. [2000] o Sotelo y cols. [2007], que también detectaron ADN del VEB en CMSP en mayor proporción entre los enfermos con EM que entre los controles, aunque sin diferencias significativas. Más recientemente, otros autores como Lindsey y cols. [2009] encontraron ADN de VEB en CMSP de casos y controles mediante PCR a tiempo real, sin diferencias significativas entre ambos. En este mismo estudio, en tres de los sujetos, que tenían sangre recolectada antes de un brote de la enfermedad, se observó que la carga viral estaba elevada en relación con el resto de muestras, lo que indicaba que podría haber una reactivación del virus semanas antes de la recaída. En contraposición, otros autores como Sotelo y cols. [2007], no han encontrado ningún aumento de la carga viral en fase de exacerbación en sangre recolectada antes de los primeros síntomas.

Hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos a partir de CMSP carecen de valor para relacionarlos con la actividad de la EM, ya que el VEB establece latencia en CMSP [Khan y cols., 1996], por lo que la detección de ADN en estas muestras no diferencia entre infección activa por el virus y latencia o persistencia del virus. Para discriminar el estado de la infección, se debe probar el aumento de la carga viral en distintas fases de la infección, pero siempre son más apropiadas, para ello, las muestras de suero o plasma [Gutiérrez y cols., 2006].

En este sentido, existen algunos estudios en los que se encontró asociación entre la presencia del virus y la actividad de la enfermedad en sujetos con EM [Hollsberg y cols., 2005; Wandinger y cols., 2000], determinada a partir del seguimiento de pacientes durante un periodo de tiempo y detectando ADN del virus en suero o plasma. Aunque en estos trabajos se encontraron pocas muestras positivas, hubo una mayor detección de ADN en el grupo de pacientes en fase activa de la enfermedad que en fase estable.

Ninguna muestra de suero y sólo una muestra de LCR procedente de los enfermos fue positiva (que también lo fue para este paciente en CMSP). Otros autores han obtenido también unos niveles de detección de ADN del virus muy

bajos en este tipo de muestra [Álvarez-Lafuente y cols., 2008; Mancuso y cols., 2007], y, algunos, ni siquiera obtuvieron muestras positivas ni entre los casos ni entre los controles [Denne y cols., 2007; Martin y cols., 1997; Morre y cols., 2001]. Esto indicaría que la presencia de ADN del VEB no es un evento común en suero y/o LCR para pacientes con EM diagnosticada, lo que sugiere que es improbable un rol directo del VEB en el compartimento sistémico o intratecal en la EM, aunque no podemos descartar que el virus esté presente en alguna fase de la enfermedad, incluso al principio del proceso, cuando todavía no se han detectado los primeros síntomas.

6. CONCLUSIONES

1. Tras realizar una revisión sistemática de la bibliografía que ha relacionado el virus de Epstein-Barr y la esclerosis múltiple, y un posterior meta-análisis de la misma, encontramos asociación estadísticamente significativa entre esta infección vírica y la enfermedad desmielinizante, puesta de manifiesto por una mayor seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-VCA, IgG anti-complejo EBNA, anticuerpos heterófilos y, especialmente, IgG anti-EBNA1 en pacientes con esclerosis múltiple. Sin embargo, dicha asociación no se encontró cuando se estudiaron los anticuerpos IgG anti-EA, IgM anti-EA e IgG anti-VEB. El meta-análisis tampoco demostró asociación significativa entre la infección por el virus y la esclerosis múltiple cuando se estudió la presencia de ADN vírico en sangre, líquido cefalorraquídeo o tejido cerebral.
2. La importante relación encontrada entre la enfermedad y la presencia de anticuerpos anti-EBNA1 podría sugerir el valor potencial de éstos como marcadores de diagnóstico precoz y de seguimiento de la esclerosis múltiple.
3. Considerando que se ha encontrado asociación entre la infección por el virus de Epstein-Barr y la esclerosis múltiple a partir de la detección de marcadores que, fundamentalmente, indican infección pasada, y no así con los que indican infección aguda o reactivación, podríamos pensar que la infección por este virus sería un factor ambiental que incidiría en estadios muy precoces, junto con otros factores ambientales y endógenos, alterando la función inmunológica normal, generando inflamación y desmielinización, y favoreciendo el inicio del proceso patogénico de la enfermedad.
4. Nuestro propio estudio, sobre un grupo de pacientes con esclerosis múltiple y otro de sujetos sin enfermedad, no encontró asociación significativa cuando se valoró la síntesis intratecal de anticuerpos IgG anti-EBNA1 ni al valorar la detección de ADN vírico en muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo. Estos resultados indicarían que la presencia de inmunoglobulinas específicas frente al virus en líquido

cefalorraquídeo y la presencia de ADN vírico no es un evento común en pacientes con esclerosis múltiple diagnosticada, aunque no podemos descartar que el virus pueda incidir en alguna fase, posiblemente precoz, de la enfermedad.

5. Pensamos que, para obtener una conclusión definitiva, es necesario que se desarrollen nuevos estudios prospectivos y comparativos, con un número suficiente de pacientes, que utilicen la combinación de varias técnicas microbiológicas para un mismo sujeto y muestra, y, fundamentalmente, determinen los diferentes marcadores de infección vírica valorando la situación clínica del paciente, incluso años antes de la aparición de los primeros síntomas de esclerosis múltiple.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hamid M**, Chen JJ, Constantine N y cols. EBV strain variation: Geographical distribution and relation to disease state. *Virology* 1992; 190: 168–75.
- Ablashi DV**, Lapps W, Kaplan M y cols. Human herpesvirus-6 (HHV-6). Infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Mult Scler* 1998; 4: 490-6.
- Aiyar A**, Aras S, Washington A y cols. Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 modulates replication of oriP-plasmids by impeding replication and transcription fork migration through the family of repeats. *Virology* 2009; 6: 29.
- Albert LJ**, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* 1999; 341: 2068-74.
- Alfieri C**, Birkenbach M, Kieff E. Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* 1991; 181: 595–608.
- Alonso A**, Egüés Olazábal N, Ayo Martín O. Infección por virus de Epstein-Barr y esclerosis múltiple. *Neurología* 2006; 21: 249-55.
- Alotaibi S**, Kennedy J, Tellier R y cols. Epstein-barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA* 2004; 291: 1875-9.
- Álvarez R**, Cour I, Kankan A y cols. Determinación de genomas de virus de la familia *Herpesviridae* en enfermos de esclerosis múltiple, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18: 223-8.
- Álvarez-Lafuente R**, Garcia-Montojo M, De Las Heras V y cols. CD46 expression and HHV-6 infection in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2009; 120: 246-50.
- Álvarez-Lafuente R**, García-Montojo M, De Las Heras V y cols. Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2008; 14: 595–601.
- Angius MA**, Kirvan CA, Schafer AL y cols. High prevalence of anti-alpha-crystallin antibodies in multiple sclerosis: correlation with severity and activity of disease. *Acta Neurol Scand* 1999; 100: 139-47.
- Archelos JJ**, Jung S, Rinner W y cols. Role of the leukocyte-adhesion molecule L-selectin in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 1998; 159: 127-34.
- Archelos JJ**, Previtali SC, Hartung HP. The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 1999; 22: 30-8.

- Ascherio A**, Munger KL, Lennette ET y cols. Epstein-barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2001; 286: 3083-8.
- Ascherio A**, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007; 61: 288-99.
- Ascherio A**. Epstein-Barr virus in the development of multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 2008; 8: 331-3.
- Atkins GJ**, McQuaid S, Morris-Downes MM y cols. Transient virus infection and multiple sclerosis. *Rev Med Virol* 2000; 10: 291-303.
- Baas D**, Prufer K, Ittel ME y cols. Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Glia* 2000; 31: 59-68.
- Babbe H**, Roers A, Waisman A y cols. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; 192: 393-404.
- Babcock GJ**, Decker LL, Freeman RB y cols. Epstein-Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* 1999; 190: 567-76.
- Bach JF**. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Eng J Med* 2002; 347: 911-20.
- Backovic M**, Longnecker R, Jardetzky TS. Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 2880-5.
- Baer R**, Bankier AT, Biggin MD y cols. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 1984; 310: 207-11.
- Balandraud N**, Meynard JB, Auger I y cols. Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1223-8.
- Banwell B**, Krupp L, Kennedy J y cols. Clinical features and virologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 2007; 6: 773-81.
- Baranzini SE**, Galwey NW, Wang J y cols. Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 2078-90.

- Beisel C**, Tanner J, Matsuo T y cols. Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J Virol* 1985; 54: 665-74.
- Bellas C**. Linfoma Hodgkin. *Rev Esp Patol* 2004; 37: 129-38.
- Bellows DS**, Howell M, Pearson C y cols. Epstein-Barr virus BALF1 is a BCL-2-like antagonist of the herpesvirus antiapoptotic BCL-2 proteins. *J Virol* 2002; 76: 2469-79.
- Berger T**, Rubner P, Schautzer F y cols. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003; 349: 139-45.
- Bernstein TC**, Wolff HG. Involvement of the nervous system in infectious mononucleosis. *Ann Intern Med* 1950; 33: 1120-38.
- Betts CD**, D'Mellow MT, Fowler CJ. Urinary symptoms and the neurological features of bladder dysfunction in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56: 245-50.
- Bjartmar C**, Kinkel RP, Kidd G y cols. Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology* 2001; 57: 1248-52.
- Boccellato F**, Anastasiadou E, Rosato P y cols. EBNA2 interferes with the germinal center phenotype by downregulating BCL6 and TCL1 in non-Hodgkin's lymphoma cells. *J Virol* 2007; 81: 2274-82.
- Booss J**, Esiri MM, Tourtellotte WW y cols. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1983; 62: 219-32.
- Bornkamm GW**, Hammerschmidt W. Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 437-59.
- Borza CM**, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus recombinant lacking expression of glycoprotein gp150 infects B cells normally but is enhanced for infection of epithelial cells. *J Virol* 1998; 72: 7577-82.
- Bray PF**, Bloomer LC, Salmon VC y cols. Epstein-barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1983; 40: 406-8.
- Bray PF**, Culp KW, McFarlin DE y cols. Demyelinating disease after neurologically complicated primary Epstein-Barr virus infection. *Neurology* 1992a; 42: 278-82.

- Bray PF**, Luka J, Culp KW y cols. Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology* 1992b; 42: 1798-804.
- Brown J**, Bianco JI, McGrath JJ y cols. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 2003; 343: 139-43.
- Bruck W**, Stadelmann C. The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 221-4.
- Buhl AM**, Cambier JC. Co-receptor and accessory regulation of B-cell antigen receptor signal transduction. *Immunol Rev* 1997; 160: 127-38.
- Buljevac D**, van Doornum GJ, Flach HZ y cols. Epstein-Barr virus and disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1377-81.
- Burkhardt AL**, Bolen JB, Kieff E y cols. An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J Virol* 1992; 66: 5161-7.
- Burkitt DP**. The discovery of Burkitt's Lymphoma. *Cancer* 1983; 51: 1777-86
- Busse C**, Feederle R, Schnölzer M y cols. Epstein-Barr viruses that express a CD21 antibody provide evidence that gp350's functions extend beyond B-cell surface binding. *J Virol* 2010; 84: 1139-47.
- Calabrese M**, Agosta F, Rinaldi F y cols. Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66: 1144-50.
- Castellazzi M**, Tamborino C, Cani A y cols. Epstein-Barr virus-specific antibody response in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; doi:10.1177/1352458510368051.
- Cepok S**, Zhou D, Srivastava R y cols. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2005; 115 : 1352-60.
- Cermelli C**, Jacobson S. Viruses and multiple sclerosis. *Viral Immunol* 2000; 13: 255-67.
- Chataway J**, Mander A, Robertson N y cols. Multiple sclerosis in sibling pairs: an analysis of 250 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71: 757-61.

- Chaudhuri A**, Behan O. Multiple sclerosis: looking beyond autoimmunity. *J R Soc Med* 2005; 98: 303-6.
- Chen A**, Zhao B, Kieff E y cols. EBNA-3B and EBNA-3C-regulated cellular genes in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 2006; 80: 10139-50.
- Chesnokova LS**, Nishimura SL, Hutt-Fletcher LM. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 20464-9.
- Cheung A**, Kieff E. Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 1982; 44: 286-94.
- Christensen T**. Human Herpesviruses in MS. *Int MS J* 2007; 14: 41-7.
- Cohen JI**, Herpesviruses. En: Cancer Medicine. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast, RCJ, Gansler TS, Holland JF, Frei III, Emil (eds). Hamilton, Canada: BC Decker Inc. 2003. 5ª edición.
- Coles AJ**, Wing M, Smith S y cols. Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet* 1999a; 354: 1691-5.
- Coles AJ**, Wing MG, Molyneux P y cols. Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999b; 46: 296-304
- Colombo M**, Dono M, Gazzola P y cols. Maintenance of B lymphocyte-related clones in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3433-8.
- Compston A**, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002; 359: 1221-31.
- Compston DA**, Vakarelis BN, Paul E y cols. Viral infection in patients with multiple sclerosis and HLA-DR matched controls. *Brain* 1986; 109: 325-44.
- Connelly KP**, DeWitt LD. Neurologic complications of infectious mononucleosis. *Pediatr Neurol* 1994; 10: 181-4.
- Correale J**, Ysraelit MC, Gaitán MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132: 1146-60.
- Dambaugh TR**, Kieff E. Identification and nucleotide sequences of two similar tandem direct repeats in Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 1982; 44: 823-33.

- Dantuma NP**, Heessen S, Lindsten K y cols. Inhibition of proteasomal degradation by the Gly-Ala repeat of Epstein-Barr virus is influenced by the length of the repeat and the strength of the degradation signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8381-5.
- Dantuma NP**, Masucci MG. The ubiquitin/proteasome system in Epstein-Barr virus latency and associated malignancies. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 69-76.
- De Jager PL**, Simon KC, Munger KL y cols. Integrating risk factors: HLA-DRB1*1501 and Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology* 2008; 70: 1113-8.
- Delecluse HJ**, Bartnizke S, Hammerschmidt W y cols. Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol* 1993; 67: 1292-9.
- DeLorenze GN**, Munger KL, Lennette ET y cols. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol* 2006; 63: 810-1.
- Denne C**, Kleines M, Dieckhofer A y cols. Intrathecal synthesis of anti-viral antibodies in pediatric patients. *Eur J Paediatr Neurol* 2007; 11: 29-34.
- DerSimonian R**, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986; 7: 177-88.
- Desbien AL**, Kappler JW, Marrack P. The Epstein-Barr virus Bcl-2 homolog, BHRF1, blocks apoptosis by binding to a limited amount of Bim. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 5663-8.
- de-Thé G**, Geser A, Day NE y cols. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* 1978; 274: 756-61.
- Dickinson JL**, Perera DI, van der Mei AF y cols. Past environmental sun exposure and risk of multiple sclerosis: a role for the Cdx-2 Vitamin D receptor variant in this interaction. *Mult Scler* 2009; 15: 563-70.
- Do NV**, Ingemar E, Phi PT y cols. A major EBNA1 variant from Asian EBV isolates shows enhanced transcriptional activity compared to prototype B95.8. *Virus Res* 2008; 132: 15-24.
- Dölken G**, Bross KJ, Hecht T y cols. Increased incidence of IgA antibodies to the Epstein-Barr virus-associated viral capsid antigen and early antigens in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 1986; 38: 55-9.

- Domachowske JB**, Cunningham CK, Cummings DL y cols. Acute manifestations and neurologic sequelae of Epstein-Barr virus encephalitis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 871-5.
- Dore-Duffy P**, Washington R, Dragovic L. Expression of endothelial cell activation antigens in microvessels from patients with multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol* 1993; 331: 243-8.
- Douglas AS**, Brown T, Reid D. Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease—a similar seasonality. *Leuk Lymphoma* 1996; 23: 323-31.
- Dowdell KC**, Gienapp IE, Stuckman S y cols. Neuroendocrine modulation of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: a critical role for the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroimmunol* 1999; 100: 243-51
- Ebers GC**, Kukay K, Bulman DE y cols. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* 1996; 13: 472-6.
- Ebers GC**, Sadovnick AD, Risch NJ y cols. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature* 1995; 377: 350-1.
- Edson CM**, Thorley-Lawson DA. Synthesis and processing of the three major envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus. *J Virol* 1983; 46:547-56.
- Eliopoulos AG**, Gallagher NJ, Blake SM y cols. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* 1999; 274: 16085-96.
- Eliopoulos AG**, Young LS. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 1998; 16: 1731-42.
- Ellison GW**, Myers LW, Sumaya CV y cols. Epstein-Barr virus antibodies and histocompatibility type in multiple sclerosis. *Trans Am Neurol Assoc* 1977; 102: 59-60.
- Engelhardt B**, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 112-29.
- Epplen C**, Jackel S, Santos EJ y cols. Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann Neurol* 1997; 41: 341-52.
- Epstein MA**, Achong BG. Various forms of Epstein-Barr virus infection in man: established facts and a general concept. *Lancet* 1973; 2: 836-9.

- Epstein MA**, Achong BG, Pope JH. Virus in cultured lymphoblasts from a New Guinea Burkitt lymphoma. *Brit Med J* 1967; 2: 290-1.
- Epstein MA**, Barr YM. Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 252-3.
- Evangelou N**, Konz D, Esiri MM y cols. Size-selective neuronal changes in the anterior optic pathways suggest a differential susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124: 1813-20.
- Feederle R**, Neuhierl B, Baldwin G y cols. Epstein-Barr virus BNRF1 protein allows efficient transfer from the endosomal compartment to the nucleus of primary B lymphocytes. *J Virol* 2006; 80: 9435-43.
- Felgenhauer K**, Schädlich HJ, Nekic M y cols. Cerebrospinal fluid virus antibodies. A diagnostic indicator for multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1985; 71: 291-9.
- Fernández O**, Fernández VE, Guerrero M. Esclerosis múltiple. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, 2ª Edición. 2005
- Ferrante P**, Mancuso R, Pagani E y cols. Molecular evidences for a role of HSV-1 in multiplesclerosis clinical acute attack. *J Neuro Virol* 2000; 6: S109-S14.
- Fingerroth JD**, Weis JJ, Tedder TF y cols. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4510-4.
- Fleming J**, Fabry Z. The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007; 61: 85-8.
- Franciotta D**, Salvetti M, Lolli F y cols. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7: 852-8.
- Fujii K**, Yokoyama N, Kiyono T y cols. The Epstein-Barr virus pol catalytic subunit physically interacts with the BBLF4-BSLF1-BBLF2/3 complex. *J Virol* 2000; 74: 2550-7.
- Fujinami RS**, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985; 230: 1043-5.
- Géoui T**, Buisson M, Tarbouriech N y cols. New insights on the role of the gamma-herpesvirus uracil-DNA glycosylase leucine loop revealed by the structure of the Epstein-Barr virus enzyme in complex with an inhibitor protein. *J Mol Biol* 2007; 366: 117-31.

- Giovannoni G**, Ebers G. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr Opin Neurol* 2007; 20: 361-8.
- Giovannoni G**, Lai M, Thorpe J y cols. Longitudinal study of soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: correlation with gadolinium enhanced magnetic resonance imaging. *Neurology* 1997; 48: 1557-65.
- Given D**, Kieff E. DNA of Epstein-Barr virus. VI. Mapping of the internal tandem reiteration. *J Virol* 1979; 31: 315-24.
- Glass GV**. Primary, secondary, and meta-analysis of research. *Educational Researcher* 1976; 5: 3-8.
- Goldacre MJ**, Wotton CJ, Seagroatt V y cols. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis: record linkage study. *J Epidemiol Community Health* 2004; 58: 1032-5.
- Gong M**, Kieff E. Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110. *J Virol* 1990; 64: 1507-16.
- Gong M**, Ooka T, Matsuo T y cols. Epstein-Barr virus glycoprotein homologous to herpes simplex virus gB. *J Virol* 1987; 61: 499-508.
- Gordon EJ**, Myers KJ, Dougherty JP y cols. Both anti-CD11a (LFA-1) and anti-CD11b (MAC-1) therapy delay the onset and diminish the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1995; 62: 153-60.
- Gran B**, Hemmer B, Vergelli M y cols. Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann Neurol* 1999; 45: 559-67.
- Grant WB**. Hypothesis-ultraviolet-B irradiance and vitamin D reduce the risk of viral infections and thus their sequelae, including autoimmune diseases and some cancers. *Photochem Photobiol* 2008; 84: 356-65.
- Gratama JW**, Lennette ET, Lonqvist B y cols. Detection of multiple Epstein-Barr viral strains in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Med Virol* 1992; 37: 39-47.
- Gratama JW**, Oosterveer MAP, Klein G y cols. EBNA size polymorphism can be used to trace Epstein-Barr virus spread within families. *J Virol* 1990; 64: 4703-8.
- Gu AD**, Mo HY, Xie YB y cols. Evaluation of a multianalyte profiling assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for serological examination of Epstein-

- Barr virus-specific antibody responses in diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1684-8.
- Gulley ML**, Raphael M, Lutz CT y cols. Epstein-Barr virus integration in human lymphomas and lymphoid cell lines. *Cancer* 1992; 70: 185-91.
- Gutiérrez J**, Sorlózano A, Soto MJ y cols. Microbiological diagnosis of infection by the Epstein-Barr virus: pathogenic basis. En: New developments in Epstein-Barr virus research. Columbus F (ed). Nova Biomedical Books. New York, USA. 2006.
- Gutiérrez J**, Vergara MJ, Guerrero M y cols. Multiple sclerosis and human herpesvirus 6. *Infection* 2002; 30: 145-9.
- Haahr S**, Höllsberg P. Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Viro* 2006; 16: 297-310.
- Haahr S**, Koch-Henriksen N, Moller-Larsen A y cols. Increased risk of multiple sclerosis after late Epstein-Barr virus infection: a historical prospective study. *Mult Scler* 1995; 1: 73-7.
- Haahr S**, Plesner AM, Vestergaard BF y cols. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2004; 109: 270-5.
- Haahr S**, Sommerlund M, Moller-Larsen A y cols. Is multiple sclerosis caused by a dual infection with retrovirus and Epstein-Barr virus?. *Neuroepidemiology* 1992; 11: 299-303.
- Haan KM**, Kwok WW, Longnecker R y cols. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol* 2000; 74: 2451-4.
- Haan KM**, Longnecker R. Coreceptor restriction within the HLA-DQ locus for Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9252-7.
- Haddad RS**, Hutt-Fletcher LM. Depletion of glycoprotein gp85 from virosomes made with Epstein-Barr virus proteins abolishes their ability to fuse with virus receptor-bearing cells. *J Virol* 1989; 63: 4998-5005.
- Haines JL**, Ter-Minassian M, Bazyk A y cols. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat Genet* 1996; 13: 469-71.
- Hartung HP**, Reiners K, Archelos JJ y cols. Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1995; 38: 186-193.

- Hasler P**, Zouali M. Subversion of B lymphocyte signaling by infectious agents. *Genes Immun* 2003; 4: 95–103.
- Hatzivassiliou E**, Miller WE, Raab-Traub N y cols. A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase. *J Immunol* 1998; 160: 1116–21.
- Häusler M**, Ramaekers VT, Doenges M y cols. Neurological complications of acute and persistent Epstein-Barr virus infection in paediatric patients. *J Med Virol* 2002; 68: 253–63.
- Hay KA**, Tenser RB. Leukotropic herpesviruses in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2000; 6: 66-8.
- Hayward SD**, Lazarowitz SG, Hayward GS. Organization of the Epstein-Barr virus DNA molecule. II. Fine mapping of the boundaries of the internal repeat cluster of B95-8 and identification of additional small tandem repeats adjacent to the HR-1 deletion. *J Virol* 1982; 43: 201–12.
- Heineman T**, Gong M, Sample J y cols. Identification of the Epstein-Barr virus gp85 gene. *J Virol* 1988; 62: 1101–7.
- Henderson AP**, Barnett MH, Parratt JD. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 2009; 66: 739-53.
- Henderson S**, Huen D, Rowe M y cols. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8479–83.
- Henderson S**, Rowe M, Gregory C y cols. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107–15.
- Henle G**, Henle W, Clifford P y cols. Antibodies to EB virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43: 1147–57.
- Henle G**, Henle W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1976; 17: 1–7.
- Henle W**, Henle G, Ho HG. Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms and control groups. *J Natl Cancer Inst* 1970; 44: 225–31.

- Hennessy K**, Wang F, Bushman EW y cols. Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5693-7.
- Hernán MA**, Zhang SM, Lipworth L y cols. Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology* 2001; 12: 301-6.
- Hickey WF**, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 1991a; 28: 254-60.
- Hickey WF**. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1991b; 1: 97-105.
- Hickey WF**. The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J Neuroimmunol* 1999; 98: 37-44.
- Higgins CD**, Swerdlow AJ, Macsween KF y cols. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J Infect Dis* 2007; 195: 474-82.
- Hilton DA**, Love S, Fletcher A y cols. Absence of Epstein-Barr virus RNA in multiple sclerosis as assessed by in situ hybridisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 975-6.
- Hiremath GS**, Cettomai D, Baynes M y cols. Vitamin D status and effect of low-dose cholecalciferol and high-dose ergocalciferol supplementation in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15: 735-40.
- Hockertz MK**, Paty DW, Beall SS. Susceptibility to relapsing-progressive multiple sclerosis is associated with inheritance of genes linked to the variable region of the TcR beta locus: use of affected family-based controls. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 373-85.
- Holley-Guthrie EA**, Quinlivan EB, Mar EC y cols. The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J Virol* 1990; 64: 3753-9.
- Höllsberg P**, Hansen HJ, Haahr S. Altered CD8+ T cell responses to selected Epstein-Barr virus immunodominant epitopes in patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 137-43.
- Höllsberg P**, Kusk M, Bech E y cols. Presence of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6B in multiple sclerosis patients: associations with clinical activity. *Acta Neurol Scand* 2005; 112: 395-402.

- Holmoy T**, Kvale EO, Vartdal F. Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *J Neurovirology* 2004; 10: 278-83.
- Holmøy T**, Moen SM, Gundersen TA y cols. 25-hydroxyvitamin D in cerebrospinal fluid during relapse and remission of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15: 1280-5.
- Holton RH**, Gentry GA. The Epstein-Barr virus genome encodes deoxythymidine kinase activity in a nested internal open reading frame. *Intervirology* 1996; 39: 270-4.
- Howe JG**, Steitz JA. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9006-10.
- Hsu DH**, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF y cols. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 1990; 250: 830-2.
- Huitinga I**, De Groot CJ, Van der Valk P y cols. Hypothalamic lesions in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 1208-18.
- Humme S**, Reisbach G, Feederle R y cols. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *PNAS* 2003; 100: 10989-94.
- Hurley EA**, Agger JA, McNeil JB y cols. When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates. *J Virol* 1991; 65: 1245-54.
- Hutt-Fletcher LM**, Lake CM. Two Epstein-Barr virus glycoprotein complexes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 258: 51-64.
- Ian MX**, Lan SZ, Cheng ZF y cols. Suppression of EBNA1 expression inhibits growth of EBV-positive NK/T cell lymphoma cells. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 1602-6.
- Iriarte J**, Subira ML, Castro P. Modalities of fatigue in multiple sclerosis: correlation with clinical and biological factors. *Mult Scler* 2000; 6: 124-30.
- Janz AM**, Oezel C, Kurzeder J y cols. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* 2000; 74: 10142-52.
- Jiménez-Ramírez C**, Brooks AJ, Forshell LP y cols. Epstein-Barr virus EBNA-3c is targeted to and regulates expression from the bidirectional LMP-1/2B promoter. *J Virol* 2006; 80: 11200-8.

- Johannsen E**, Luftig M, Chase MR y cols. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *PNAS* 2004, 101: 16286-91.
- Kallin BL**, Sternas AK, Saemundssen J y cols. Purification of Epstein-Barr virus DNA polymerase from P3HR-1 cells. *J Virol* 1985; 54: 561-8.
- Kang I**, Quan T, Nolasco H y cols. Defective control of latent Epstein-Barr virus infection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2004; 172: 1287-94.
- Kanwar JR**, Harrison JE, Wang D y cols. Beta7 integrins contribute to demyelinating disease of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 2000b; 103: 146-52.
- Kanwar JR**, Kanwar RK, Wang D y cols. Prevention of a chronic progressive form of experimental autoimmune encephalomyelitis by an antibody against mucosal addressin cell adhesion molecule-1, given early in the course of disease progression. *Immunol Cell Biol* 2000a; 78: 641-5.
- Katz DA**, Baumann RP, Sun R y cols. Viral proteins associated with the Epstein-Barr virus transactivator, ZEBRA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 378-82.
- Keirstead HS**, Blakemore WF. The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination. *Adv Exp Med Biol* 1999; 468: 183-97.
- Kempkes B**, Pich D, Zeidler R y cols. immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 1995; 69: 231-8.
- Kenney S**, Holley-Guthrie E, Mar EC y cols. The Epstein-Barr virus BMLF1 promoter contains an enhancer element that is responsive to the BZLF1 and BRLF1 transactivators. *J Virol* 1989; 63: 3878-83.
- Kent SJ**, Karlik SJ, Cannon C y cols. A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1995; 58: 1-10.
- Kerr BM**, Lear AL, Rowe M y cols. Three transcriptionally distinct forms of Epstein-Barr virus latency in somatic cell hybrids: Cell phenotype dependence of virus promoter usage. *Virology* 1992; 187: 189-201.
- Khan G**, Miyashita EM, Yang B y cols. Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* 1996; 5: 173-9.
- Khanna R**, Burrows SR, Kurilla MG y cols. Localisation of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: Implications for vaccine development. *J Exp Med* 1992; 176: 169-78.

- Kieff E**, Rickinson AB. Epstein-Barr virus and its replication. En: Fields virology. Knipe DM, Howley PM (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.
- Kilger E**, Kieser A, Baumann M y cols. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* 1998; 17: 1700-9.
- Kornek B**, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. *Brain Res Bull* 2003; 61: 321-6.
- Kragt J**, van Amerongen B, Killestein J y cols. Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. *Mult Scler* 2009; 15: 9-15.
- Krone B**, Oeffner F, Grange JM. Is the risk of multiple sclerosis related to the 'biography' of the immune system? *J Neurol* 2009; 256: 1052-60.
- Krone B**, Pohl D, Rostasy K y cols. Common infectious agents in multiple sclerosis: a case control study in children. *Mult Scler* 2008; 14: 136-9.
- Kuhlmann T**, Lingfeld G, Bitsch A y cols. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 2002; 125: 2202-12.
- Kuokkanen S**, Sundvall M, Terwilliger JD y cols. A putative vulnerability locus to multiple sclerosis maps to 5p14-p12 in a region syntenic to the murine locus Eae2. *Nat Genet* 1996; 13: 477-80.
- Kurtzke J**, Gudmundsson K, Bergmann S. Multiple sclerosis in Iceland: 1. Evidence of a post war epidemic. *Neurology* 1982; 32: 143-50.
- Kurtzke JF**, Hyllested K. Multiple sclerosis in the Feroe Islands. II. Clinical update, transmission, and the nature of MS. *Neurology* 1986; 36: 307-28.
- Kurtzke JF**. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 382-427.
- Kurtzke JF**. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand Suppl* 1995; 161: 23-33.
- Kutok JL**, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1: 375-404.
- Lang HL**, Jacobsen H, Ikemizu S y cols. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2002; 3: 940-3.

- Larsen PD**, Bloomer LC, Bray PF. Epstein-Barr nuclear and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology* 1985; 35: 435-8.
- Lassmann H**. Pathology of multiple sclerosis. En: Campston A, Ebers G, Lassman H, McDonald I, Matthews B, Weckerle H (eds). *McAlpine multiple sclerosis*. London: Churchill Livingstone. 1998.
- Laux GU**, Freese K, Bornkamm GW. Structure and evolution of two related transcription units of Epstein-Barr virus carrying small tandem repeats. *J Virol* 1985; 56: 987-95.
- Lee MA**, Diamond ME, Yates JL. Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J Virol* 1999; 73: 2974-82.
- Leibowitz U**, Antonovsky A, Medalie JM y cols. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1966; 29: 60-8.
- Lerner MR**, Andrews NC, Miller G y cols. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 805-9.
- Levin LI**, Munger KL, Rubertone MV y cols. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *JAMA* 2003; 289: 1533-6.
- Levin LI**, Munger KL, Rubertone MV y cols. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 2005; 293: 2496-500.
- Levitskaya J**, Coram M, Levitsky V y cols. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus antigen-1. *Nature* 1995; 375: 685-8.
- Levitskaya J**, Sharipo A, Leonchiks A y cols. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12616-21.
- Li D**, Qian L, Chen C y cols. Down-regulation of MHC class II expression through inhibition of CIITA transcription by lytic transactivator Zta during Epstein-Barr virus reactivation. *J Immunol* 2009; 182: 1799-809.
- Li LY**, Liu MY, Shih HM y cols. Human cellular protein VRK2 interacts specifically with Epstein-Barr virus BHRF1, a homologue of Bcl-2, and enhances cell survival. *J Gen Virol* 2006; 87: 2869-78.

- Li Q**, Spriggs MK, Kovats S y cols. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 1997; 71: 4657-62.
- Li Q**, Turk SM, Hutt-Fletcher LM. The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J Virol* 1995; 69: 3987-94.
- Liao G**, Huang J, Fixman ED y cols. The Epstein-Barr virus replication protein BBLF2/3 provides an origin-tethering function through interaction with the zinc finger DNA binding protein ZBRK1 and the KAP-1 corepressor. *J Virol* 2005; 79: 245-56.
- Liblau RS**, Fontaine B. Recent advances in immunology in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 1998; 11: 293-8.
- Liebowitz D**, Wang D, Kieff E. Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J Virol* 1986; 58: 233-7.
- Lindberg C**, Andersen O, Vahlne A y cols. Epidemiological investigation of the association between infectious mononucleosis and multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 1991; 10: 62-5.
- Lindert RB**, Haase CG, Brehm U y cols. Multiple sclerosis: Band T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Brain* 1999; 122: 2089-100.
- Lindsey JW**, Hatfield LM, Crawford MP y cols. Quantitative PCR for Epstein-Barr virus DNA and RNA in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15: 153-8.
- Littler E**, Halliburton IW, Powell KL y cols. Immunological conservation between Epstein-Barr virus and herpes simplex virus. *J Gen Virol* 1988; 69: 2021-31.
- Liu Y**, Malefyt RD, Briere F y cols. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol* 1997; 158: 604-13.
- Longnecker R**, Kieff E. A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J Virol* 1990; 64: 2319-26.
- Lu CC**, Huang HT, Wang JT y cols. Characterization of the uracil-DNA glycosylase activity of Epstein-Barr virus BKRF3 and its role in lytic viral DNA replication. *J Virol* 2007; 81: 1195-208.
- Lublin FD**, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory

- Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907-11.
- Lucas KG**, Small TN, Heller G y cols. The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87: 2594-603.
- Lucchinetti C**, Bruck W, Parisi J y cols. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707-17.
- Lucchinetti CF**, Bruck W, Rodriguez M y cols. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 1996; 6: 259-74.
- Lünemann JD**, Edwards N, Muraro PA y cols. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain* 2006; 129: 1493-506.
- Lünemann JD**, Jelčić I, Roberts S y cols. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med* 2008; 205: 1763-73.
- Lünemann JD**, Kamradt T, Martin R y cols. Epstein-Barr virus: Environmental trigger of Multiple Sclerosis? *J Virol* 2007; 81: 6777-84.
- Mackett M**, Conway MJ, Arrand JR y cols. Characterization and expression of a glycoprotein encoded by the Epstein-Barr virus BamHI I fragment. *J Virol* 1990; 64: 2545-52.
- Macsween KF**, Crawford DH. Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 131-40.
- Mancuso R**, Delbue S, Borghi E y cols. Increased prevalence of varicella zoster virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J Med Virol* 2007; 79: 192-9.
- Mannick JB**, Cohen JI, Birkenbach M y cols. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* 1991; 65: 6826-37.
- Marshall WL**, Yim C, Gustafson E y cols. Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J Virol* 1999; 73: 5181-5.

- Martin C**, Enbom M, Södertröm M y cols. Absence of seven human herpesviruses including HHV-6, by polymerasa chain reaction in CSF and blood from patients with multiple sclerosis and optic neuritis. *Acta Neurol Scand* 1997; 95: 280-3.
- Martin DR**, Yuryev A, Kalli KL y cols. Determination of the structural basis for selective binding of Epstein-Barr virus to human complement receptor type 2. *J Exp Med* 1991; 174: 1299-311.
- Martínez-Naves E**, Victoria-Gutiérrez M, Uria DF y cols. The germline repertoire of T cell receptor beta-chain genes in multiple sclerosis patients from Spain. *J Neuroimmunol* 1993; 47: 9-13.
- Martino G**, Furtan R, Poliani PL. El significado patogénico de la inflamación en la esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 2000; 29: 1213-7.
- Maruo S**, Wu Y, Ishikawa S y cols. Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C is required for cell cycle progression and growth maintenance of lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 19500-5.
- Mason D**. Genetic variation in the stress response: susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease. *Immunol Today* 1991; 12: 57-60.
- Matusali G**, De Leo A, Gavioli R y cols. Down-regulation of proteolytic complexes following EBV activation in BL cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 947-52.
- McGeoch DJ**, Dalrymple MA, Davison AJ y cols. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 1988; 69: 1531-74.
- Merrill JE**. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *J Immunother* 1992; 12: 167-70.
- Middeldorp JM**, Brink AA, van den Brule AJ y cols. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45: 1-36.
- Miller CL**, Burkhardt AL, Lee JH y cols. Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 1995; 2: 155-66.

- Miller CL**, Longnecker R, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *J Virol* 1993; 67: 3087-94.
- Miller N**, Hutt-Fletcher LM. A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus. *J Virol* 1988; 62: 2366-72.
- Milo R**, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev* 2010; 9: A387-94.
- Monteyne P**, Bureau JF, Brahic M. Viruses and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 1998; 11: 287-91.
- Moore MD**, Cannon MJ, Sewall A y cols. Inhibition of Epstein-Barr virus infection in vitro and in vivo by soluble CR2 (CD21) containing two short consensus repeats. *J Virol* 1991; 65: 3559-65.
- Morale C**, Brouwer J, Testa N y cols. Stress, glucocorticoids and the susceptibility to develop autoimmune disorders of the central nervous system. *Neurol Sci* 2001; 22: 159-62.
- Morré SA**, van Beek J, De Groot CJ y cols. Is Epstein-Barr virus present in the CNS of patients with MS? *Neurology* 2001; 56: 692.
- Morrison TE**, Mauser A, Wong A y cols. Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity* 2001; 15: 187-99.
- Mosialos G**, Birkenbach M, Yalamanchili R y cols. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signalling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 1995; 80: 389-99.
- Mueller N**, Evans A, Harris NL y cols. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus: altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 1989; 320: 689-95.
- Mullis K**, Faloona F, Scharf S y cols. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 263-73.
- Munch M**, Hvas J, Christensen T y cols. A single subtype of Epstein-Barr virus in members of multiple sclerosis clusters. *Acta Neurol Scand* 1998a; 98: 1-5.
- Munch M**, Rüsom K, Christensen T y cols. The significance of Epstein-Barr virus seropositivity in multiple sclerosis patients? *Acta Neurol Scand* 1998b; 97: 171-4.

- Munger KL**, Chitnis T, Ascherio A. Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology* 2009; 73: 1543-50.
- Munger KL**, Peeling RW, Hernan MA y cols. Infection with *Chlamydia pneumoniae* and risk of multiple sclerosis. *Epidemiology* 2003; 14: 141-7.
- Murray PG**, Young LS. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2001; 3: 1-20.
- Murray RJ**, Kurilla MG, Brooks JM y cols. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): Implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J Exp Med* 1992; 176: 157-68.
- Myhr KM**, Riise T, Barrett-Connor E y cols. Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 539-42.
- Nakagomi H**, Dolcetti R, Bejarano MT y cols. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer* 1994; 57: 240-4.
- Nakayama S**, Murata T, Murayama K y cols. Epstein-Barr virus polymerase processivity factor enhances BALF2 promoter transcription as a coactivator for the BZLF1 immediate-early protein. *J Biol Chem* 2009; 284: 21557-68.
- Nanbo A**, Takada K. The role of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in oncogenesis. *Rev Med Virol* 2002; 12: 321-6.
- Nemerow GR**, Mold C, Schwend VK y cols. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the BV/C3d receptor of B cells: Sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 1987; 61: 1416-20.
- Nemerow GR**, Mullen JJ 3rd, Dickson PW y cols. Soluble recombinant CR2 (CD21) inhibits Epstein-Barr virus infection. *J Virol* 1990; 64: 1348-52.
- Neuhierl B**, Delecluse HJ. The Epstein-Barr virus BMRF1 gene is essential for lytic virus replication. *J Virol* 2006; 80: 5078-81.
- Nielsen TR**, Rostgaard K, Askling J y cols. Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1*15 in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15: 431-6.

Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM y cols. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 2007; 64: 72-75.

Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods* 2001; 25: 419-29.

Nikoskelainen E, Nikoskelainen J, Salmi AA y cols. Virus antibody levels in the cerebrospinal fluid from patients with optic neuritis. *Acta Neurol Scandinav* 1975; 51: 347-64.

Niller HH, Wolf H, Minarovits J. Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2008; 41: 298-328.

Nonkwelo C, Henson EB, Sample J. Characterization of the Epstein-Barr virus Fp promoter. *Virology* 1995; 206: 183-95.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodríguez M y cols. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 938-52.

Nuebling CM, Mueller-Lantsch N. Identification and characterization of an Epstein-Barr virus early antigen that is encoded by the NotI repeats. *J Virol* 1989; 63: 4609-15.

Nystad TW, Myrmel H. Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis. *J Clin Virol* 2007; 38: 292-7.

Oba DE, Hutt-Fletcher LM. Induction of antibodies to the Epstein-Barr virus glycoprotein gp85 with a synthetic peptide corresponding to a sequence in the BXL2F2 open reading frame. *J Virol* 1988; 62: 1108-14.

Oertel S, Trappe RU, Zeidler K y cols. Epstein-Barr viral load in whole blood of adults with posttransplant lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation does not correlate with clinical course. *Ann Hematol* 2006; 85: 478-84.

Oger J. HTLV-1 infection and the viral etiology of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2007; 262: 100-4.

Oguro MO, Shimizu N, Ono Y y cols. Both the rightward and the leftward open reading frames within the BamHI M DNA fragment of Epstein-Barr virus act as trans-activators of gene expression. *J Virol* 1987; 61: 3310-3.

Ohga S, Nomura A, Takada H y cols. Immunological aspects of Epstein-Barr virus

infection. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 44: 203-15.

Okuda DT, Srinivasan R, Oksenberg JR y cols. Genotype-phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by 1HMR spectroscopy and MRI measures. *Brain* 2009; 132: 250-9.

Onciu M, Schlette E, Zhou Y y cols. Secondary chromosomal abnormalities predict outcome in pediatric and adult high-stage Burkitt lymphoma. *Cancer* 2006; 107: 1084-92.

O'Neil JD, Owen TJ, Wood VH y cols. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 modulates the AP-1 transcription factor pathway in nasopharyngeal carcinoma cells and enhances angiogenesis in vitro. *J Gen Virol* 2008; 89: 2833-42.

Operskalski EA, Visscher BR, Malmgren RM y cols. A case-control study of multiple sclerosis. *Neurology* 1989; 39: 825-9.

Opsahl ML, Kennedy PGE. An attempt to investigate the presence of Epstein Barr virus in multiple sclerosis and normal control brain tissue. *J Neurol* 2007; 254: 425-30.

Origgi L, Perego R, Hu C y cols. Anti-Epstein-Barr virus antibodies in systemic lupus erythematosus. *Boll Ist Sieroter Milan* 1988; 67: 116-22.

Ossevoort M, Zaldumbide A, te Velthuis AJ y cols. The nested open reading frame in the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 mRNA encodes a protein capable of inhibiting antigen presentation in cis. *Mol Immunol* 2007; 44: 3588-96.

Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM y cols. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 2007; 448: 474-9.

Pariente M, Bartolomé J, Lorente S y cols. Distribución por edad de los patrones serológicos de infección por el virus de Epstein-Barr: revisión de resultados de un laboratorio de diagnóstico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 108-10.

Pender MP. Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol* 2003; 24: 584-8.

Peterson JW, Bo L, Mork S y cols. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001; 50: 389-400.

Pierrot-Deseilligny C. Clinical implications of a possible role of vitamin D in multiple sclerosis. *J Neurol* 2009; 256: 1468-79.

- Pohl D**, Krone B, Rostasy K y cols. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology* 2006; 67: 2063-5.
- Pohl D**, Rostasy K, Jacobi C y cols. Intrathecal antibody production against Epstein-Barr and other neurotropic viruses in pediatric and adult onset multiple sclerosis. *J Neurol* 2010; 57: 212-6.
- Ponsonby AL**, van der Mei I, Dwyer T y cols. Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2005; 293: 463-9.
- Portal D**, Rosendorff A, Kieff E. Epstein-Barr nuclear antigen leader protein coactivates transcription through interaction with histone deacetylase 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 19278-83.
- Poser CM**, Paty DW, Scheinberg L y cols. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13: 227-31.
- Poser CM**. The environment and the nervous system. *J Neurol Sci* 2007; 262: 98-9.
- Puchhammer-Stöckl E**, Görzer I. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus subtypes- the search for clinical significance. *J Clin Virol* 2006; 36: 239-48.
- Qin Y**, Duquette P, Zhang Y y cols. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1045-50.
- Quinlivan EB**, Holley-Guthrie EA, Norris M y cols. Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1999-2007.
- Raab-Traub N**, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 1986; 47: 883-9.
- Ramagopalan SV**, Dymant DA, Guimond C y cols. No effect of parental age on risk of multiple sclerosis: a population-based study. *Neuroepidemiology* 2009; 34: 106-9.
- Rand KH**, Houck H, Denslow ND y cols. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) associated oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2000; 173: 32-9.
- Rao SM**, Leo GJ, Bernardin L y cols. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology* 1991; 41: 685-91.

- Rasmussen HB**, Perron H, Clausen J. Do endogenous retroviruses have etiological implications in inflammatory and degenerative nervous system diseases? *Acta Neurol Scand* 1993; 88: 190-8.
- Rechsteiner MP**, Berger C, Zauner L y cols. Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection. *J Virol* 2008; 82: 1739-47.
- Reiber H**, Davey B. Dessert-Storm-Syndrome and immunization. *Arch Intern Med* 1996; 156: 217.
- Reiber H**, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood-CSF barrier and the quantification of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987; 163: 319-28.
- Reiber H**, Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in the brain. *Clin Chem* 1991; 37: 1153-60.
- Reiber H**, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001; 184: 101-22.
- Reiber H**. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF): a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994; 122: 189-203.
- Reiber H**. The discrimination between different blood-CSF barrier dysfunction and inflammatory reaction of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of cerebrospinal fluid. *J Neurol* 1980; 224: 89-99.
- Rejda K**, Petzold A, Stelmasiak Z y cols. Cerebrospinal fluid brain specific proteins in relation to nitric oxide metabolites during relapse of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14: 59-66.
- Ressing ME**, van Leeuwen D, Verreck FA y cols. Epstein-Barr virus gp42 is posttranslationally modified to produce soluble gp42 that mediates HLA class II immune evasion. *J Virol* 2005; 79: 841-52.
- Rezk SA**, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated lympho-proliferative disorders. *Hum Pathol* 2007; 38: 1293-304.
- Rickinson AB**, Kieff E. Epstein-Barr virus. En: Knipe DM, Howley PM. (eds). *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, Pensilvania, EEUU. 2001.

- Rieckmann P**, Altenhofen B, Riegel A y cols. Correlation of soluble adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid with magnetic resonance imaging activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998; 4: 178-82.
- Rieckmann P**, Altenhofen B, Riegel A y cols. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1 and sICAM-1) in cerebrospinal fluid and serum correlate with MRI activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1997; 41: 326-33.
- Riise T**, Gronning M, Klauber MR y cols. Clustering of residence of multiple sclerosis patients at age 13 to 20 years in Hordaland, Norway. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 932-9.
- Risch N**. Corrections to "Linkage strategies for genetically complex traits. III. The effect of marker polymorphism on analysis of affected relative pairs". *Am J Hum Genet* 1992; 51: 673-5.
- Riverol M**, Sepulcre J, Fernández-Díez B y cols. Antibodies against Epstein-Barr virus and herpesvirus type 6 are associated with the early phases of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007; 192: 184-5.
- Roosendaal SD**, Moraal B, Pouwels PJ y cols. Accumulation of cortical lesions in MS: relation with cognitive impairment. *Mult Scler* 2009; 15: 708-14.
- Rovedo M**, Longnecker R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) modulates LMP2A activity. *J Virol* 2007; 81: 84-94.
- Ruggieri M**, Polizzi A, Pavone L y cols. Multiple sclerosis in children under 6 years of age. *Neurology* 1999; 53: 478-84.
- Sadovnick AD**, Armstrong H, Rice GP y cols. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 1993; 33: 281-5.
- Sadovnick AD**, Dyment D, Ebers GC. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Epidemiol Rev* 1997; 19: 99-106.
- Sadovnick AD**, Ebers GC, Dyment DA y cols. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 1996; 347: 1728-30.
- Salveti M**, Giovannoni G, Aloisi F. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2009; 22: 201-6.
- Sanders VJ**, Felisan S, Waddell A y cols. Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neuro Virol* 1996; 2: 249-58.

- Sargsyan SA**, Shearer AJ, Ritchie AM y cols. Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2010; 74: 1127-35.
- Sener AG**, Afsar I, Pinar E. Evaluation of Epstein-Barr virus antibodies, anti-VCA avidity by immunofluorescence and immunoblot assays for assessment of Epstein-Barr virus immunologic state. *J Virol Methods* 2009; 159: 300-2.
- Serafini B**, Rosicarelli B, Franciotta D y cols. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007; 204: 2899-912.
- Sharief MK**, Thompson EJ. Intrathecal immunoglobulin M synthesis in multiple sclerosis. Relationship with clinical and cerebrospinal fluid parameters. *Brain* 1991; 114: 184-95.
- Shirodaria PV**, Haire M, Fleming E y cols. Viral antibody titers. Comparison in patients with multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *Arch Neurol* 1987; 44: 1237-41.
- Sindic CJ**, Monteyne P, Laterre EC. The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1994; 54: 75-80.
- Skare J**, Farley J, Strominger JL y cols. Transformation by Epstein-Barr virus requires DNA sequences in the region of BamHI fragments Y and H. *J Virol* 1985; 55: 286-97.
- Sluder JA**, Newhouse P, Fain D. Pediatric and adolescent multiple sclerosis. *Adolesc Med* 2002; 13: 461-84.
- Sorem J**, Jardetzky TS, Longnecker R. Cleavage and secretion of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 promote membrane fusion with B lymphocytes. *J Virol* 2009; 83: 6664-72.
- Sorem J**, Longnecker R. Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells. *J Gen Virol* 2009; 90: 591-5.
- Sotelo J**, Ordóñez G, Pineda B. Varicella-Zoster virus at relapses of multiple sclerosis. *J Neurol* 2007; 254: 493-500.
- Spriggs MK**, Armitage RJ, Comeau MR y cols. The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds the HLA-DR beta chain and inhibits antigen presentation. *J Virol* 1996; 70: 5557-63.

- Steven NM**, Annels N, Kumar A y cols. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 1997; 185: 1605-17.
- Steven NM**, Leese AM, Annels N y cols. Epitope focusing in the primary cytotoxic T-cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T-cell memory. *J Exp Med* 1996; 184: 1801-13.
- Storch M**, Lassmann H. Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr Opin Neurol* 1997; 10: 186-92.
- Stuart AD**, Stewart JP, Arrand JR y cols. The Epstein-Barr virus encoded cytokine viral interleukin-10 enhances transformation of human B lymphocytes. *Oncogene* 1995; 11: 1711-9.
- Stumpf WE**, Sar M, Clark SA y cols. Brain target sites for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Science* 1982; 215: 1403-05.
- Sugden B**, Warren N. A promoter of Epstein-Barr virus that can function during latent infection can be transactivated by EBNA-1, a viral protein required for viral DNA replication during latent infection. *J Virol* 1989; 63: 2644-9.
- Sumaya CV**, Myers LW, Ellison GW y cols. Increased prevalence and titer of Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1985; 17: 371-7.
- Sumaya CV**, Myers LW, Ellison GW. Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Trans Am Neurol Assoc* 1976; 101: 300-2.
- Sumaya CV**, Myers LW, Ellison GW. Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1980; 37: 94-6.
- Sundstedt A**, O'Neill EJ, Nicolson KS y cols. Role for IL-10 in suppression mediated by peptide induced regulatory T cells in vivo. *J Immunol* 2003; 170: 330-6.
- Sundström P**, Juto P, Wadell G y cols. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004; 62: 2277-82.
- Sundström P**, Nyström L, Jidell E y cols. EBNA-1 reactivity and HLA DRB1*1501 as statistically independent risk factors for multiple sclerosis: a case-control study. *Mult Scler* 2008; 14: 1120-2.
- Sundström P**, Nyström L, Ruuth K y cols. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009; 215: 102-7.

- Sutkowski N**, Palkama T, Ciurli C y cols. An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J Exp Med* 1996; 184: 971-80.
- Swanson JW**. Multiple sclerosis, update in diagnosis and review of prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 577-86.
- Takaki K**, Polack A, Bornkamm GW. Expression of a nuclear and a cytoplasmic Epstein-Barr virus early antigen after DNA transfer: Cooperation of two distant parts of the genome for expression of the cytoplasmic antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1984; 81: 4568-72.
- Takeuchi S**, Takasato Y, Masaoka H y cols. Hemorrhagic encephalitis associated with Epstein-Barr virus infection. *J Clin Neurosci* 2010; 17: 153-4.
- Tanner J**, Weis J, Fearon D y cols. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 1987; 50: 203-13.
- Tanner J**, Whang Y, Sample J y cols. Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J Virol* 1988; 62: 4452-64.
- Tarbouriech N**, Ruggiero F, de Turenne-Tessier M y cols. Structure of the Epstein-Barr virus oncogene BARF1. *J Mol Biol* 2006; 359: 667-78.
- Thacker EL**, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: A meta-analysis. *Ann Neurol* 2006; 59: 499-503.
- Thijssen S**, Deege M. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *Expert Opin Med Diagn* 2008; 2: 21-31.
- Thorley-Lawson DA**, Allday MJ. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 913-24.
- Thorley-Lawson DA**, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004; 350: 1328-37.
- Thorley-Lawson DA**. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 75-82.
- Toczyski D**, Steitz PJ. The cellular RNA-binding protein EAP recognizes a conserved stem-loop in the Epstein-Barr virus small RNA EBER 1. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 703-10.

- Toda T**, Sugimoto M. Proteome analysis of Epstein-Barr virus-transformed B-lymphoblasts and the proteome database. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 787: 197-206.
- Todman DH**. Encephalitis in infectious mononucleosis. *Clin Exp Neurol* 1983; 19: 1-6.
- Tomkinson BE**, Maziarz R, Sullivan JL. Characterisation of the T cell-mediated cellular cytotoxicity during acute infectious mononucleosis. *J Immunol* 1989; 143: 660-70.
- Tomkinson B**, Kieff E. Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol* 1992; 66: 2893-903.
- Torkildsen O**, Stansberg C, Angelskår SM y cols. Upregulation of immunoglobulin-related genes in cortical sections from multiple sclerosis patients. *Brain Pathol* 2009; DOI: 10.1111/j.1750-3639.2009.00343.
- Tourtellotte WW**. On cerebrospinal fluid immunoglobulin-G (IgG) quotients in multiple sclerosis and other diseases. A review and a new formula to estimate the amount of IgG synthesized per day by the central nervous system. *J Neurol Sci* 1970; 10: 279-304.
- Tremlett H**, van der Mei IA, Pittas F y cols. Monthly ambient sunlight, infections and relapse rates in multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*. 2008; 31: 271-9.
- Trojano M**, Avolio C, Liuzzi GM y cols. Changes of serum sICAM-1 and MMP-9 induced by rIFNbeta-1b treatment in relapsing-remitting MS. *Neurology* 1999; 53: 1402-8.
- Tsurumi T**, Fujita M, Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 2005; 15: 3-15.
- Tsurumi T**, Kobayashi A, Tamai K y cols. Functional expression and characterization of the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit. *J Virol* 1993; 67: 4651-8.
- Uchida J**, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y y cols. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 1999; 286: 300-3.
- Urquiza M**, Suárez J, López R y cols. Identifying gp85-regions involved in Epstein-Barr virus binding to B-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319: 221-9.

- van Noort JM**, van Sechel AC, Bajramovic JJ y cols. The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* 1995; 375: 798-801.
- van Sechel AC**, Bajramovic JJ, van Noort JM. EBV-induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Immunol* 1999; 162: 129-35.
- Vanderlugt CL**, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 85-95.
- Varela FJ**, Coutinho A. Second generation immune networks. *Immunol Today* 1991; 12: 159-66.
- Vaughan JH**, Riise T, Rhodes GH y cols. An Epstein Barr virus-related cross reactive autoimmune response in multiple sclerosis in Norway. *J Neuroimmunol* 1996; 69: 95-102.
- Viglietta V**, Baecher-Allan C, Weiner HL y cols. Loss of functional suppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199: 971-9.
- Villoslada P**, Juste C, Tintore M y cols. The immune response against herpesvirus is more prominent in the early stages of MS. *Neurology* 2003; 60: 1944-8.
- Voskuhl RR**, Palaszynski K. Sex hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neuroscientist* 2001; 7: 258-70.
- Voskuhl RR**. Gender issues and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2002; 2: 277- 86.
- Vukusic S**, Hutchinson M, Hours M y cols. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMS study): clinical predictors of post-partum relapse. *Brain* 2004; 127: 1353-60.
- Vyse TJ**, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996; 85: 311-8.
- Wagner HJ**, Munger KL, Ascherio A. Plasma viral load of Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2004; 11: 833-4.
- Walsh MJ**, Tourtellotte WW. Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in multiple sclerosis. *J Exp Med* 1986; 163: 41-53.

- Wandinger KP**, Jabs W, Siekhaus A y cols. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 2000; 55: 178-84.
- Warner HB**, Carp RI. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Lancet* 1981; 318: 1290.
- Waubant E**, Goodkin DE, Gee L y cols. Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 1999; 53: 1397-401.
- Weigel R**, Fischer DK, Heston L y cols. Constitutive expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs and nuclear antigen during latency and after induction of Epstein-Barr virus replication. *J Virol* 1985; 53: 254-9.
- Weinschecker BG**, Rodríguez M. Epidemiology of multiple sclerosis. En: Handbook of neuroepidemiology. Neurological disease and therapy. Gorelick PB, Alter M (eds). Marcel Dekker. New York 1994.
- Weinshenker BG**. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 1996; 14: 291-308.
- Wells GA**, Shea B, O'Connell D y cols. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. 2004. En: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm
- Whitacre CC**. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 777-80.
- White CA**, Cross SM, Kurilla MG y cols. Recruitment during infectious mononucleosis of CD3+ CD4+ CD8+ virus-specific cytotoxic T cells which recognise Epstein-Barr virus lytic antigen BHRF1. *Virology* 1996; 219: 489-92.
- Willis SN**, Stadelmann C, Rodig SJ y cols. Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain* 2009; 132: 3318-28.
- Wingerchuk DM**, Weinshenker BG. Multiple sclerosis: epidemiology, genetics, classification, natural history, and clinical outcome measures. *Neuroimaging Clin N Am* 2000; 10: 611-24.
- Wolf H**, zur Hausen H, Becker V. EB viral genome in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nat New Biol* 1973; 244: 245-7.
- Wood NW**, Sawcer S, Kellar Wood H y cols. The Tcell receptor beta-locus and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology* 1995; 45: 1859-63.
- Woyciechowska JL**, Dambrozia J, Leinikki P y cols. Viral antibodies in twins with multiple sclerosis. *Neurology* 1985; 35: 1176-80.

- Wucherpfennig KW**, Catz I, Hausmann S y cols. Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes. *J Clin Invest* 1997; 100: 1114-22.
- Wucherpfennig KW**, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; 80: 695-705.
- Yao QY**, Rickinson AB, Gaston JSH y cols. In vitro analysis of the Epstein-Barr virus: host balance in long-term renal allograft recipients. *Int J Cancer* 1985; 35: 43-9.
- Yao QY**, Tierney RJ, Croom-Carter D y cols. Frequency of multiple Epstein-Barr virus infections in T cell-immunocompromised individuals. *J Virol* 1996; 70: 4884-94.
- Yaswen LR**, Stephens EB, Davenport LC y cols. Epstein-Barr virus glycoprotein gp85 associates with the BKRF2 gene product and is incompletely processed as a recombinant protein. *Virology* 1993; 195: 387-96.
- Yates J**, Warren N, Reisman D y cols. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3806-10.
- Yednock TA**, Cannon C, Fritz LC y cols. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992; 356: 63-6.
- Yeh EA**, Chitnis T, Krupp L y cols. Pediatric multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2009; 5: 621-31.
- Yeh EA**, Collins A, Cohen ME y cols. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* 2004; 113: 73-6.
- Yokoyama N**, Fujii K, Hirata M y cols. Assembly of the Epstein-Barr virus BBLF4, BSLF1 and BBLF2/3 proteins and their interactive properties. *J Gen Virol* 1999; 80: 2879-87.
- Young KA**, Herbert AP, Barlow PN y cols. Molecular basis of the interaction between complement receptor type 2 (CR2/CD21) and Epstein-Barr virus glycoprotein gp350. *J Virol* 2008; 82: 11217-27.

- Zandman-Goddard G**, Berkun Y, Barzilai O y cols. Exposure to Epstein-Barr virus infection is associated with mild systemic lupus erythematosus disease. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 658-63.
- Zeidler R**, Eissner G, Meissner P y cols. Down-regulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin 10. *Blood* 1997; 90: 2390-7.
- Zeng Y**. Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma in China. *Adv Cancer Res* 1985; 44: 121-38.
- Zeytinoglu A**, Altuglu I, Karatas E y cols. Comparison of immunofluorescence assay and multiplexed microparticle-based immunoassay for detecting Epstein-Barr virus viral capsid antigen antibodies. *J Virol Methods* 2008; 148: 300-2.
- Zhang Q**, Hong Y, Dorsky D y cols. Functional and physical interactions between the Epstein-Barr virus (EBV) proteins BZLF1 and BMRF1: Effects on EBV transcription and lytic replication. *J Virol* 1996; 70: 5131-42.
- Ziegler JL**, Drew WL, Miner RC y cols. Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. *Lancet* 1982; 2: 631-33.
- Zipoli V**, Hakiki B, Portaccio E y cols. The contribution of cerebrospinal fluid oligoclonal bands to the early diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15: 472-8.
- Zivadinov R**, Nasuelli D, Tommasi MA y cols. Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurol Res* 2006; 28: 262-9.

8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Relation between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: analytic study of scientific production

O. Santiago · J. Gutierrez · A. Sorlozano ·
J. de Dios Luna · E. Villegas · O. Fernandez

Received: 22 November 2009 / Accepted: 3 April 2010 / Published online: 29 April 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Numerous studies have been carried out to determine whether infection by the Epstein-Barr virus (EBV) can be considered as a risk factor for multiple sclerosis (MS). This work is a meta-analysis of case-control observational studies published before January 2009 aimed at assessing the degree of association between EBV and MS infections. A Medline electronic database search was carried out using “Epstein-Barr virus” and “multiple sclerosis” as keywords, from which we selected 30 published studies that met our methodology criteria. We found an association between MS and an exposure to EBV, studied by determining the anti-VCA IgG antibodies (odds ratio [OR]=5.5; 95% confidence interval [CI]=3.37–8.81; $p<0.0001$), anti-complex EBNA IgG (OR=5.4; 95% CI=2.94–9.76; $p<0.0001$) and anti-EBNA-1 IgG (OR=12.1; 95% CI=3.13–46.89; $p<0.0001$). No significant association could be found when studying anti-EA IgG (OR=1.3; 95% CI=0.68–2.35; $p=0.457$), EBV DNA in serum (OR=1.8; 95% CI=0.99–3.36; $p=0.051$) and DNA in brain tissues and in cerebrospinal fluid (CSF) (OR=0.9; 95%

CI=0.38–2.01; $p=0.768$). This meta-analysis detected an association between infection by EBV and MS through the investigation of antibodies, mainly anti-EBNA-1, anti-complex EBNA and anti-VCA IgG.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a central nervous system (CNS) disease characterised by inflammation, demyelination, axonal degeneration and gliosis. Epidemiology studies show that it appears in genetically prone patients, in whom an unknown environmental factor would affect and trigger an alteration of the immune processes [1]. Infections caused by the Epstein-Barr virus (EBV) may be amongst such environmental factors. This virus is widely spread amongst the population, causing latent infections with continuous exacerbations and, finally, it shows immune-modulating activity [2]. The epidemiology of infectious mononucleosis (IM) and MS [3] are also very parallel, and it has been observed that individuals who have suffered late IM present a higher risk of developing MS [4–7] and the event is preceded by an increase in the specific antibodies many years before [8–10]. A recent study found evidence of EBV infection in a substantial proportion of brain-infiltrating B cells and plasma cells in nearly 100% of the MS cases examined. Ectopic B cell follicles forming in the cerebral meninges of some cases were identified as major sites of EBV persistence [11]. However, the debate over whether the association between EBV infection and MS is a coincidence or if, on the contrary, there is a causal relationship, single or multiple, is open. In spite of all the research carried out, most of the studies do not allow definite conclusions if they are individually considered.

O. Santiago · J. Gutierrez (✉) · A. Sorlozano · E. Villegas
Department of Microbiology, School of Medicine,
University of Granada,
Avenida de Madrid, 11,
18012 Granada, Spain
e-mail: josegf@ugr.es

J. de Dios Luna
Department of Statistics and Operation Research,
University of Granada,
Granada, Spain

O. Fernandez
Neurology Service, Hospital Carlos Haya,
Málaga, Spain

Ascherio and Munch [8] performed a systematic review of case-control studies comparing EBV serology in MS patients and controls. This study has consistently shown that the EBV seropositivity rate in MS patients is higher than in controls. Other meta-analysis concludes that EBV infection manifesting as IM in adolescents and young adults is a risk factor for MS [12]. Ascherio and Munger [13] found that MS risk is about 10-fold higher among individuals who experienced an undiagnosed EBV infection during childhood, and at least 20-fold greater among individuals who developed IM. The work of Holmøy [14] concluded that vitamin D deficiency and EBV infection are both very common population-wide events, and could be involved in MS pathogenesis. Finally, other authors [5, 15] in two well-designed cohort studies found increased relative risks of MS in subjects with IM, but the results from other studies were unconvincing [16].

Based on all of the above, this study located all international publications dated before January 2009 that analysed the relationship between EBV infection and MS, and they described a material and a well-defined method for each serologic or molecular determination. A meta-analysis and a quality study was carried out on the results obtained, so as to arrive at overall conclusions available to the date indicated, on the relationship between the virus and the disease.

Method

The Medline database was used to select the articles and an open search was carried out using “Epstein-Barr virus” or “EBV” or “human herpesvirus 4” or “HHV-4” or “infectious mononucleosis” or “environmental risk factors” and “multiple sclerosis” or “MS” as keywords. Thus, 251 studies were reliable, which were published before January 2009. Reviews were not considered. We selected only papers published in Spanish or English to analyse the relationship between the EBV and MS using a material and a well-described methodology. Not considered were those papers that did not show correct and explicit account of the results. Finally, we selected 30 studies [4, 10, 17–44] out of the 251 publications (see Table 1). As an additional measure to avoid possible losses, we also examined the bibliography of each paper, but we did not find any more studies in addition to the 30 papers initially selected.

The meta-analysis has a qualitative and a quantitative component. The former is an epidemiologic description of the papers, considering the individual studies as the research subject. For each serologic or molecular determination in each publication, both individually and in total, the following data were obtained: the odds ratio

(OR), confidence interval (CI) of the OR at 95%, statistical significance of the analysis and weight of the publication.

We used the DerSimonian and Laird [45] method to calculate the total, because it allows total estimates that are less affected by heterogeneity in the studies. The heterogeneity of the studies was determined using Cochran’s Q statistic method. Additionally, a measure of the variability of the total OR was employed, due to the heterogeneity of the studies: Higgins I^2 . We considered that no relationship existed between EBV exposure and the presence of MS when the CI at 95% included the unit [46].

Finally, we analysed the quality of the publications. We used the Newcastle-Ottawa [47] case and control point scale (NOS). To get to know whether there was any relationship between the quality of the article in the above-mentioned scale and its OR calculation, a meta-regression was carried out using the restricted maximum likelihood (REML) method in those cases in which the number of publications analysed was equal to or more than 3.

Data obtained from the various studies were analysed using the STATA Release 10.1 statistical package.

Results

Anti-VCA IgG determination

Among a total of 13 studies evaluating the anti-VCA IgG (Table 2), there was a single study in which such determination was made on cerebrospinal fluid (CSF) [23] and all of the remaining investigations were in serum [10, 17–19, 22, 24, 34–38, 43]. The percentage of cases positive for this determination (99–100%) was greater than among controls (81–98%), except in the study of Bray et al. [23]. In work performed among paediatric subjects, there was also a higher percentage of positive cases, but with differences more accentuated than in adults [17–19]. The study performed by Zivadinov et al. [43] was the only one in which the proportion of positive results was higher in controls than in cases. The study with the highest OR was published by Pohl et al. [19] and that with highest weight was published by Bray et al. [23], both of which indicate the existence of an association between the virus and the disease.

Comparing the ORs of the studies, we obtained $\chi_{\text{exp}}^2 = 19.74$, 12 g.l., $p = 0.072$, which indicates a trend towards difference, although not significantly. The global OR was 5.5 (95% CI = 3.37–8.81; $p < 0.0001$), indicating significant association between MS and exposure to the virus.

Individually considered, the studies with the highest quality were those by Myhr et al. [34], which stated a

Table 1 List of studies included in the meta-analysis

| Study | Cases | | | Controls | | | Sample/Test |
|-----------------------------------|---|--|---------------------|--------------------------------|--|---------------|-----------------------------------|
| | Diagnostic | Age Mean (SD) and/or range | F/M ratio | Diagnostic | Age Mean (SD) and/or range | F/M ratio | |
| Alotaibi et al. 2004 [17] | 30 MS | 13.4 (±3.63) | 1.31:1 | 90 healthy subjects | 13.37 (±3.62) | 1.57:1 | SR/ELISA |
| Alvarez et al. 2000 [20] | 102 RRMS-NAE | Female: 34.75 (21–57) Male: 36.34 (22–63) | 70/32 | 53 bone marrow donors | 10.30 (±3.78) | 0.66:1 | MC/PCR and n-PCR |
| Alvarez-Lafuente et al. 2008 [21] | 48 MS | 32.6 | 34/14 | 102 haemotherapy | Female: 34.75 (21–57) Male: 36.34 (22–63) | 70/32 | MC/PCR and n-PCR |
| Ascherio et al. 2001 [22] | 144 MS | – | 144/0 | 23 ONIND | 43.7 | 15/8 | CSF/RT-PCR |
| Banwell et al. 2007 [18] | 131 RRMS 5 SPMS 1 Marburg variant | 14.1 (2.2–19.6) | 1.54:1 | 21 ONIND | 39.4 | 14/7 | SR/IF |
| Bray et al. 1992 [23] | 266 MS | – | – | 288 healthy subjects | – | 288/0 | SR/ELISA |
| Bray et al. 1983 [24] | 313 MS | 16–>45 | – | 47 healthy subjects | – | – | SR/ELISA, IF and Western blot |
| Buljevac et al. 2005 [25] | 54 RRMS | 39.3 | – | 49 ONDND | – | – | SR/IF |
| Denne et al. 2007 [26] | 6 MS | 13.3 (±2.6) (10–17) | 5/1 | 406 healthy subjects and ONDND | – | – | PS/ELISA |
| Ferrante et al. 2000 [27] | 26 RRMS-AE | 31 (20–46) | 17/9 | 52 healthy subjects | 9.2 (±5.1) | 30/27 | CSF/PCR |
| Haahr et al. 2004 [4] | 53 MS 100 newly diagnosed MS | 28.3 (21–32) 27.7 (20–34) | 49/4 73/27 | 57 OND | – | – | MC/n-PCR |
| Hay and Tenser 2000 [28] | 17 RRMS 12 SPMS | – | – | 18 healthy subjects | – | – | SR/ELISA |
| Höllsberg et al. 2005 [29] | 33 MS (16 TT: valaciclovir) | 33.7–38.83 | 22/11 | 7 healthy subjects | – | – | MC/PCR |
| Mancuso et al. 2007 [32] | 23 RRMS 15 chronic progressive | 34 (±10) 43 (±12) | 16/7 8/7 | 18 healthy subjects | – | – | PS/RT-PCR |
| Martin et al. 1997 [33] | 6 RRMS-AE 8 RRMS-NAE 6 SPMS | 36 (16–59) (MS patients) | 17/19 (MS patients) | 28 OND 19 NND | 43 (±16) 70 (±10) | 16/12 2/17 | CSF/n-PCR |
| Mýhr et al. 1998 [34] | 8 RRMS (TT: aciclovir) 3 RRMS 19 ON | 31 (20–46) (ON patients) | 15/4 (ON patients) | 20 OND | 52 (19–83) | 13/7 | CSF/n-PCR |
| Morré et al. 2001 [30] | 144 MS 10 MS (postmortem) | 39.2 (17–66) 53 (34–81) | 83/61 10/0 | 170 NND 46 NND | 40 (18–77) 19–97 | 93/77 – | SR/ELISA and IF CSF and TC/PCR |

Table 1 (continued)

| Study | Cases | | | Controls | | | Sample/Test |
|-----------------------------|-------------------|----------------------------|-----------|--|----------------------------|-----------|-----------------|
| | Diagnostic | Age Mean (SD) and/or range | F/M ratio | Diagnostic | Age Mean (SD) and/or range | F/M ratio | |
| | 9 MS (postmortem) | – | – | | | | |
| | 18 MS | 38 (24–56) | 14/4 | | | | |
| Munch et al. 1998 [31] | 138 MS | 43 (22–72) | 81/57 | 138 healthy subjects | – | – | SR/ELISA |
| Pohl et al. 2006 [19] | 144 RRMS | 12.31 (±13.13) | 98/49 | 47 adrenoleukodystrophy or neuroblastoma | – | – | SR/ELISA |
| | 2 PPMS | (4.04–15.99) | | 100 ONDD | | | |
| | 1 SPMS | | | 272 healthy subjects | 43.6 (±9.2) | 184/88 | SR/ELISA |
| Ponsonby et al. 2005 [36] | 89 RRMS | 43.5 (±9.3) | 92/44 | | | | |
| | 35 SPMS | | | | | | |
| | 10 PPMS | | | | | | |
| Riverol et al. 2007 [44] | 22 ICS | 39 ± 9 | 106/66 | 85 healthy subjects | – | – | SR/ELISA |
| | 92 RRMS | | | | | | |
| | 32 SPMS | | | | | | |
| | 17 PPMS | | | | | | |
| | 9 PRMS | | | | | | |
| Sanders et al. 1996 [39] | 37 MS | 51.01 (±11.73) | 19/18 | 24 OND | 74.28 (±8.07) | 9/28 | TC/PCR |
| | | (31–70) | | 13 OND | (48–84) | | |
| Shirodaria et al. 1987 [35] | 26 MS | 51.9 (28–74) | 17/9 | 26 healthy subjects | 52 (27–74) | 17/9 | SR/IF |
| Sotelo et al. 2007 [40] | 131 RRMS-NAE | 33 (±2) | 82/49 | 60 healthy subjects | 36 (±8) | 14/46 | MC/PCR |
| | 40 RRMS-NAE | 32 (±2) | 30/10 | 70 OND and NND | 37 (±9) | 46/24 | |
| Sundström et al. 2004 [10] | 197 RRMS/SP | 17–68 | 192/2 | 702 healthy subjects | – | – | SR/IF and ELISA |
| | 24 PPMS | | | | | | |
| | 8 PRMS | | | | | | |
| | 5 NC | | | | | | |
| Sumaya et al. 1980 [37] | 157 MS | 41.42 (±12.46) | 92/65 | 81 healthy subjects | 40.68 (±13.97) | 45/36 | SR/IF |
| | | (11–>60) | | | (11–>60) | | |
| Sumaya et al. 1976 [38] | 142 MS | – | – | 74 healthy subjects | – | – | SR/IF |
| Wagner et al. 2004 [41] | 31 MS | – | 31/0 | 62 healthy subjects | – | – | SR/PCR |
| Wandinger et al. 2000 [42] | 58 RRMS-AE | 37.9 (±10.3) | 67/41 | 163 NND | 36.2 (±11.8) | 89/74 | SR/ELISA |
| | 50 RRMS-NAE | (20–57) | | | (19–56) | | |
| Zivadinov et al. 2006 [43] | 140 RRMS | 42.1 (±10.09) | 90/50 | 131 healthy subjects | – | – | SR/ELISA |

MS: multiple sclerosis; RRMS: remitting recurrent multiple sclerosis; PPMS: primary progressive multiple sclerosis; SPMS: secondary progressive multiple sclerosis; PRMS: progressive recurring multiple sclerosis; ICS: isolated demyelinating clinical syndromes; ON: optical neuritis; NC: not classified; NAE: no acute exacerbation; AE: acute exacerbation; TT: treatment; OND: other neurological diseases; ONDD: other non-demyelinating neurological diseases; NND: non-neurological disease; ONDD: other non-demyelinating disease; ONND: other inflammatory neurological diseases; ONIND: other non-inflammatory neurological diseases; SR: serum; PS: plasma; MC: mononuclear cells; IF: immunofluorescence; n-PCR: nested-PCR; RT-PCR: real time-PCR; F: females; M: male

Table 2 Analysis and evaluation of the quality of the studies detecting anti-VCA IgG

| Study | Descriptive statistics | | | | | | Inferential statistics | | | Quality (points) | | |
|-----------------------------|------------------------|----------|------------|----------|----------|------------|---------------------------------|-------------|------------|------------------|----|-----|
| | Cases | | | Controls | | | OR | 95% CI | Weight (%) | S | C | E |
| | Positive | Negative | Positive % | Positive | Negative | Positive % | | | | | | |
| Alotaibi et al. 2004 [17] | 25 | 5 | 83.3 | 81 | 62 | 56.7 | 3.8 | 1.38–10.56 | 11.50 | *** | * | ** |
| Ascherio et al. 2001 [22] | 143 | 1 | 99.3 | 269 | 19 | 93.4 | 10.1 | 1.33–76.22 | 4.56 | ** | ** | * |
| Banwell et al. 2007 [18] | 108 | 18 | 85.7 | 61 | 35 | 63.5 | 3.4 | 1.79–6.59 | 16.53 | * | ** | * |
| Bray et al. 1992 [23] | 56 | 41 | 57.7 | 26 | 79 | 24.8 | 4.2 | 2.28–7.55 | 17.31 | ** | | * |
| Bray et al. 1983 [24] | 309 | 4 | 98.7 | 363 | 43 | 89.4 | 9.2 | 3.24–25.77 | 11.27 | * | ** | *** |
| Myhr et al. 1998 [34] | 141 | 3 | 97.9 | 138 | 32 | 81.1 | 10.9 | 3.26–36.42 | 9.49 | ** | ** | *** |
| Pohl et al. 2006 [19] | 145 | 2 | 98.6 | 106 | 41 | 72.1 | 28.0 | 6.63–118.05 | 7.56 | ** | ** | ** |
| Ponsonby et al. 2005 [36] | 136 | 0 | 100 | 252 | 9 | 96.5 | 10.3 | 0.59–177.82 | 2.53 | ** | ** | ** |
| Shirodaria et al. 1987 [35] | 26 | 0 | 100 | 24 | 2 | 92.3 | 5.4 | 0.24–118.34 | 2.20 | * | ** | *** |
| Sundström et al. 2004 [10] | 234 | 0 | 100 | 693 | 9 | 98.7 | 6.4 | 0.37–110.80 | 2.54 | ** | ** | *** |
| Sumaya et al. 1980 [37] | 155 | 2 | 98.7 | 76 | 5 | 93.8 | 5.1 | 0.96–26.88 | 6.17 | ** | | *** |
| Sumaya et al. 1976 [38] | 140 | 2 | 98.6 | 70 | 4 | 94.6 | 4.0 | 0.71–22.37 | 5.85 | ** | | *** |
| Zivadinov et al. 2006 [43] | 133 | 7 | 95 | 131 | 0 | 100 | 0.0 | 0.004–1.19 | 2.50 | **** | ** | *** |
| Total | 1,751 | 85 | – | 2,290 | 340 | – | OR 5.5 | | | | | |
| Event rate (%) | 95.37 | 4.62 | – | 87.07 | 12.92 | – | (95% CI=3.37–8.81; $p<0.0001$) | | | | | |

OR: odds ratio; CI: confidence interval; S: selection; C: comparability; E: exposure

significant association between EBV and MS, and those by Sundström et al. [10] and Zivadinov et al. [43], which did not find any significant association. After a meta-regression to understand the relationship between the quality of the study and the corresponding OR, the said relationship was found to be significant ($p=0.017$). Since the coefficient was positive, we were able to affirm that the higher the quality of the study, higher the OR. When studying the overall OR of the articles with the highest quality, the results were similar to the initial situation, in which quality was not controlled.

Anti-EBNA complex IgG determination

In these studies [17, 22, 34, 35, 44], all of which the determination was made in serum (Table 3), the proportion of seropositive patients was higher in cases (97–100%) than in controls (88–94%). The research performed by Alotaibi et al. [17] showed the least percentage of positive cases and yet still, it was twice that of the controls; it was carried out in serum obtained from children and it was the weightiest study of the set. The study of Shirodaria et al. [35] is the only one that showed no association between the virus and the disease, while Myhr et al. [34] was the study with the highest OR supporting that association. The ORs of the studies were very homogeneous ($\chi_{exp}^2=0.70$; 3 g.l.; $p=0.874$; $I^2=0\%$). A high global OR was obtained, being 5.4 (95% CI=2.94–9.76; $p<0.0001$). The studies of

the highest quality were those by Alotaibi et al. [17] and Myhr et al. [34].

Anti-EBNA-1 IgG determination

Of these studies (Table 4), Bray et al. [23] was the only one in which the measurement was in CSF, with a very significant difference in the proportion of seropositivity in cases (79.7%) and controls (14.5%). In addition, its weight was the highest among the set. All remaining studies used serum samples [4, 10, 19, 31, 42] and the proportion of seropositive patients was also higher in cases than in controls, except for the study by Banwell et al. [18], which was carried out in children, and with an OR that failed to indicate any association between the virus and MS. The article with the highest OR was that by Haahr et al. [4].

The overall OR was the highest of all the measurements, being 12.1 (95% CI=3.13–46.89; $p<0.0001$), in spite of the great variability amongst the studies ($\chi_{exp}^2=65.76$; 6 g.l.; $p<0.0001$; $I^2=90.9\%$).

According to the data, there was significant association ($p<0.0001$) between the EBV and MS, although, due to the high variability amongst the studies, this result should be treated with caution. The studies with the highest quality were those by Haahr et al. [4] and Sundström et al. [10]. A meta-regression was carried out to study the relationship between the quality of the article and the corresponding OR, and this relation was significant ($p=0.026$) and, since

Table 3 Analysis and evaluation of the quality of the studies detecting anti-EBNA complex IgG

| Study | Descriptive statistics | | | | | | Inferential statistics | | | Quality (points) | | |
|-----------------------------|------------------------|----------|------------|----------|----------|------------|---------------------------------|-------------|------------|------------------|----|-----|
| | Cases | | | Controls | | | OR | 95% CI | Weight (%) | S | C | E |
| | Positive | Negative | Positive % | Positive | Negative | Positive % | | | | | | |
| Alotaibi et al. 2004 [17] | 25 | 5 | 83.3 | 60 | 83 | 41.9 | 6.9 | 2.50–19.10 | 49.03 | *** | * | ** |
| Ascherio et al. 2001 [22] | 141 | 3 | 97.9 | 266 | 22 | 92.4 | 3.9 | 1.14–13.21 | 33.82 | ** | ** | * |
| Myhr et al. 1998 [34] | 143 | 1 | 99.3 | 160 | 10 | 94.1 | 8.9 | 1.13–70.68 | 11.84 | ** | ** | *** |
| Shirodaria et al. 1987 [35] | 26 | 0 | 100 | 24 | 2 | 92.3 | 5.4 | 0.24–118.34 | 5.32 | * | ** | *** |
| Riverol et al. 2007 [44] | 167 | 5 | 97.1 | 75 | 10 | 88.2 | 4.5 | 1.47–13.48 | 29.21 | ** | | *** |
| Total | 502 | 14 | – | 585 | 127 | – | OR 5.4 | | | | | |
| Event rate (%) | 97.28 | 2.71 | – | 82.16 | 17.83 | – | (95% CI=2.94–9.76; $p<0.0001$) | | | | | |

OR: odds ratio; CI: confidence interval; S: selection; C: comparability; E: exposure

the coefficient was positive, we can state that the higher the quality of the article, the higher the OR. Random-effects meta-analysis of seven studies of the association between anti-EBNA1 IgG and MS is expressed in Fig. 1.

Anti-EA IgG determination

In general, these studies (Table 5) had low seropositive percentages, both in the group of cases and controls, especially in those in which both groups were constituted by child-aged subjects [17, 19]. In three of the studies, the positive proportion of positive cases was less than in controls [17, 31, 42]. The Myhr et al. [34] study showed the highest percentage of seropositivity among the cases. Only the Buljevac et al. [25] and Myhr et al. [34] studies showed a significant relationship between the virus and the disease.

The overall OR was 1.3 (95% CI=0.68–2.35; $p=0.457$) and we found no association between EBV and MS. The ORs were not homogeneous ($\chi_{\text{exp}}^2=20.30$; 5 g.l.; $p=0.001$;

$I^2=75.4\%$). The articles of the highest quality were those by Myhr et al. [34] and Wandinger et al. [42].

EBV DNA detection

Studies performed for the detection of the EBV DNA used a great variety of samples, from CSF to brain tissue biopsies, including the different components of blood. The meta-analysis was carried out using all studies that amplified the EBV DNA. In all, there was no association between EBV infection and MS ($p=0.051$). The studies were not too homogeneous, as shown by the Chi-square statistic ($\chi_{\text{exp}}^2=15.99$; 12 g.l.; $p=0.192$; $I^2=25\%$).

Detection of EBV DNA in blood

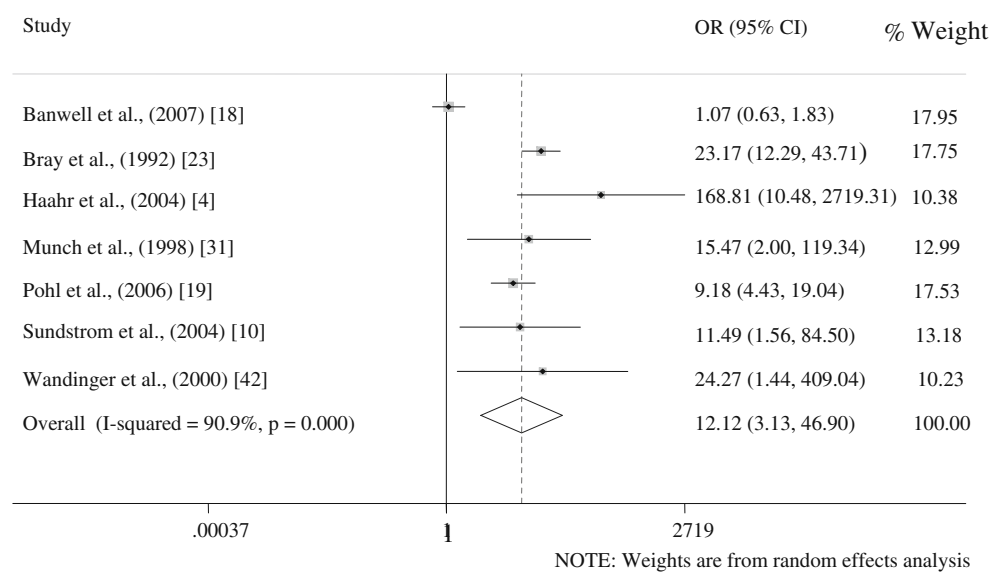
Studies based on the detection of EBV DNA in serum [41], plasma [29] and mononuclear cells [20, 27, 28, 40] (Table 6) found DNA, both in cases and in controls, but only showed

Table 4 Analysis and evaluation of the quality of the studies detecting anti-EBNA-1 IgG

| Study | Descriptive statistics | | | | | | Inferential statistics | | | Quality (points) | | |
|----------------------------|------------------------|----------|------------|----------|----------|------------|----------------------------------|---------------|------------|------------------|----|-----|
| | Cases | | | Controls | | | OR | 95% CI | Weight (%) | S | C | E |
| | Positive | Negative | Positive % | Positive | Negative | Positive % | | | | | | |
| Banwell et al. 2007 [18] | 73 | 53 | 57.9 | 54 | 42 | 56.2 | 1.1 | 0.63–1.83 | 17.95 | * | ** | * |
| Bray et al. 1992 [23] | 114 | 29 | 79.7 | 19 | 112 | 14.5 | 23.2 | 12.29–43.71 | 17.75 | ** | | * |
| Haahr et al. 2004 [4] | 153 | 0 | 100 | 646 | 355 | 64.5 | 168.8 | 10.48–2,719.3 | 10.38 | **** | ** | *** |
| Munch et al. 1998 [31] | 137 | 1 | 99.2 | 124 | 14 | 89.8 | 15.5 | 2.01–119.34 | 12.99 | | ** | *** |
| Pohl et al. 2006 [19] | 124 | 10 | 92.5 | 77 | 57 | 57.4 | 9.2 | 4.44–19.04 | 17.53 | ** | ** | ** |
| Sundström et al. 2004 [10] | 233 | 1 | 99.6 | 669 | 33 | 95.3 | 11.5 | 1.56–84.50 | 13.18 | ** | ** | *** |
| Wandinger et al. 2000 [42] | 108 | 0 | 100 | 147 | 16 | 90.2 | 24.3 | 1.44–409.04 | 10.23 | **** | | *** |
| Total | 942 | 94 | – | 1,736 | 629 | – | OR 12.1 | | | | | |
| Event rate (%) | 90.92 | 9.07 | – | 73.40 | 26.60 | – | (95% CI=3.13–46.89; $p<0.0001$) | | | | | |

OR: odds ratio; CI: confidence interval; S: selection; C: comparability; E: exposure

Fig. 1 Random-effects meta-analysis of seven studies of the association between anti-EBNA-1 IgG and MS



a significant association between the virus and the disease in the study by Sotelo et al. [40]. The study by Hay and Tenser [28] should be highlighted, with 100% positive results in both cases and controls.

The whole set of studies obtained an overall OR of 1.8 (95% CI=0.99–3.36; $p=0.051$). It could, therefore, be affirmed that no significant association was found between the virus and the disease, although the value of p was close to being significant. The ORs of the articles were homogeneous, though very close to heterogeneity ($\chi_{exp}^2=10.34$; 5 g.l.; $p=0.066$; $I^2=51.6\%$). The articles with the highest quality were those by Alvarez et al. [20] and Wagner et al. [41].

Detection of EBV DNA in brain tissue and in CSF

Studies that detected EBV DNA in brain tissue [30, 39] and CSF [21, 26, 30, 32, 33] (Table 7) failed to prove the

association between the virus and the disease. Only the results of the following studies were positive: Alvarez-Lafuente et al. [21], Mancuso et al. [32] and Sanders et al. [39]. The Sanders et al. [39] study also showed the percentage of positive results as being greater in controls than in cases. When all studies were combined, an estimated OR of 0.9 (95% CI=0.38–2.01; $p=0.768$) was obtained. The studies were rather homogeneous ($\chi_{exp}^2=3.26$; 6 g.l.; $p=0.776$; $I^2=0\%$). The article with the highest quality was that by Alvarez-Lafuente et al. [21].

Discussion

Up until now, the meta-analyses studying the possible association between EBV and MS were based on determining the OR amongst the groups made up of cases against the control groups [8], seronegative versus seropositive

Table 5 Analysis and evaluation of the quality of the studies detecting anti-EA IgG

| Study | Descriptive statistics | | | | | | Inferential statistics | | | Quality (points) | | |
|----------------------------|------------------------|----------|------------|----------|----------|------------|--------------------------------|-----------|------------|------------------|----|-----|
| | Cases | | | Controls | | | OR | 95% CI | Weight (%) | S | C | E |
| | Positive | Negative | Positive % | Positive | Negative | Positive % | | | | | | |
| Alotaibi et al. 2004 [17] | 0 | 30 | 0 | 21 | 122 | 14.7 | 0.1 | 0.01–1.59 | 4.01 | *** | * | ** |
| Buljevac et al. 2005 [25] | 26 | 28 | 48.1 | 13 | 39 | 25 | 2.8 | 1.22–6.35 | 17.47 | * | | ** |
| Myhr et al. 1998 [34] | 99 | 45 | 68.7 | 79 | 91 | 46.5 | 2.5 | 1.59–4.03 | 22.17 | ** | ** | *** |
| Munch et al. 1998 [31] | 50 | 88 | 36.2 | 57 | 81 | 41.3 | 0.8 | 0.5–1.31 | 21.92 | | ** | *** |
| Pohl et al. 2006 [19] | 9 | 138 | 6.1 | 7 | 140 | 4.7 | 1.3 | 0.47–3.6 | 15.05 | ** | ** | ** |
| Wandinger et al. 2000 [42] | 15 | 93 | 13.8 | 28 | 135 | 17.1 | 0.8 | 0.39–1.54 | 19.38 | **** | | *** |
| Total | 199 | 422 | – | 205 | 608 | – | OR 1.3 | | | | | |
| Event rate (%) | 32.04 | 67.95 | – | 25.21 | 74.78 | – | (95% CI=0.68–2.35; $p=0.457$) | | | | | |

OR: odds ratio; CI: confidence interval; S: selection; C: comparability; E: exposure

Table 6 Analysis and evaluation of the quality of the studies detecting DNA in mononuclear cells and serum

| Study | Sample | Descriptive statistics | | | | | | Inferential statistics | | | Quality (points) | | |
|----------------------------|--------|------------------------|----------|------------|----------|----------|------------|--------------------------------|-------------|------------|------------------|----|-----|
| | | Cases | | | Controls | | | OR | 95% CI | Weight (%) | S | C | E |
| | | Positive | Negative | Positive % | Positive | Negative | Positive % | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| Alvarez et al. 2000 [20] | MC | 33 | 69 | 32.2 | 36 | 66 | 35.3 | 0.9 | 0.49–1.57 | 28.6 | ** | ** | *** |
| Ferrante et al. 2000 [27] | MC | 13 | 13 | 50 | 7 | 11 | 38.9 | 1.6 | 0.46–5.32 | 15.11 | * | | ** |
| Hay and Tenser 2000 [28] | MC | 29 | 0 | 100 | 7 | 0 | 100 | 3.9 | 0.07–214.97 | 2.18 | | | *** |
| Höllsberg et al. 2005 [29] | PS | 5 | 28 | 15.2 | 1 | 17 | 5.5 | 3.0 | 0.33–28.23 | 6.23 | * | | ** |
| Sotelo et al. 2007 [40] | MC | 144 | 27 | 84.2 | 82 | 48 | 63.1 | 3.1 | 1.81–5.38 | 29.54 | | | *** |
| Wagner et al. 2004 [41] | PS | 9 | 22 | 29 | 10 | 52 | 16.1 | 2.1 | 0.76–5.95 | 18.34 | ** | ** | ** |
| Total | | 233 | 159 | – | 143 | 194 | – | OR 1.8 | | | | | |
| Event rate (%) | | 59.43 | 40.56 | – | 42.43 | 57.57 | – | (95% CI=0.99–3.36; $p=0.051$) | | | | | |

MC: mononuclear cells; PS: plasma; OR: odds ratio; CI: confidence interval; S: selection; C: comparability; E: exposure

patients [15] and studies linking IM with MS [14]. However, this meta-analysis tried to study the relation between all EBV infection markers to MS.

According to our study, an important increase of anti-EBNA IgG and anti-EBNA-1 IgG was found in MS patients, significantly so when compared with patients free of that disease. Other authors have highlighted the same behaviours in MS patients; it is, however, different from that found in infected immunosuppressed patients and in chronic IM, because both cases show increased anti-EBNA-2 IgG and, to a lesser degree, anti-EBNA-1 IgG [48].

This increase in EBNA complex and EBNA-1 antibodies in MS occurs between 5 and 20 years before the first symptoms of the disease appear, and continues afterwards [9, 10]. Although the cause of the high levels of antibodies is unknown, a possible explanation may be that the co-infection by other herpes viruses alters the immune control of the host on the latent EBV reactivating it, or otherwise as a consequence of a new infection by new EBV strains [49].

In addition, an autoimmune component may exist, since Cepok et al. [50] have already identified two proteins of the virus (BRRF2 and EBNA-1) that share epitope(s) with myelin basic proteins [23, 51] and against antibodies that appear in the CSF and the serum of MS patients.

Although heterogeneously, the presence of anti-VCA IgG was linked to MS, since works on the CSF determination were included [23] and using different laboratory techniques.

On the contrary, anti-EA IgG did not have a relationship to the disease, probably because the primary infection may participate in the initial stage of MS but not in the reactivation of the virus without excluding a possible autoimmune mechanism. However, in a study on 19 patients with MS exacerbation, Wandinger et al. [42] found 72.7% positivity of anti-EA IgM and IgG, the same as Buljevac et al. [25], who found an increase of anti-EA IgG in a subgroup of patients with the disease in an active phase, studied through magnetic resonance. Then, it could

Table 7 Analysis and evaluation of the quality of the studies detecting DNA in brain tissue and CSF

| Study | Sample | Descriptive statistics | | | | | | Inferential statistics | | | Quality (points) | | |
|-----------------------------------|--------|------------------------|----------|------------|----------|----------|------------|--------------------------------|-------------|------------|------------------|---|-----|
| | | Cases | | | Controls | | | OR | 95% CI | Weight (%) | S | C | E |
| | | Positive | Negative | Positive % | Positive | Negative | Positive % | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| Alvarez-Lafuente et al. 2008 [21] | CSF | 1 | 47 | 2.1 | 0 | 44 | 0 | 2.8 | 0.99–2.49 | 6.50 | ** | | *** |
| Denne et al. 2007 [26] | CSF | 0 | 6 | 0 | 0 | 57 | 0 | 8.9 | 0.16–484.41 | 4.22 | | | *** |
| Mancuso et al. 2007 [32] | CSF | 1 | 37 | 2.5 | 0 | 47 | 0 | 3.8 | 0.15–95.98 | 6.49 | ** | | *** |
| Martin et al. 1997 [33] | CSF | 0 | 45 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0.4 | 0.01–23.5 | 4.33 | * | | *** |
| Morré et al. 2001 [30] | BT | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 1.0 | 0.02–55.27 | 4.20 | | | *** |
| Morré et al. 2001 [30] | CSF | 0 | 27 | 0 | 0 | 36 | 0 | 1.3 | 0.03–69.01 | 4.33 | | | *** |
| Sanders et al. 1996 [39] | BT | 10 | 27 | 27 | 14 | 23 | 37.8 | 0.6 | 0.23–1.63 | 69.92 | | | *** |
| Total | | 12 | 199 | – | 14 | 237 | – | OR 0.9 | | | | | |
| Event rate (%) | | 5.69 | 94.31 | – | 5.57 | 94.42 | – | (95% CI=0.38–2.01; $p=0.768$) | | | | | |

CSF: cerebrospinal fluid; BT: brain tissue; OR: odds ratio; CI: confidence interval; S: selection; C: comparability; E: exposure

be possible that the prime infection participates at the start of MS and that the reactivation of the virus is also associated to clinic exacerbations of the disease.

In spite of all the above, the relationship between the infection and MS based on serum determinations may be masked by problems in the immune detection of the herpes viruses [49] and by false-negative results in the controls [8].

When the presence of the virus DNA in total blood, cells, plasma, CSF or brain biopsy was analysed, only one of the studies found a relationship between the infection and the disease [40]. On the other hand, it is known that EBV DNA in serum is present in most patients in the acute phase of MS, as a consequence of the virus replication; however, during the latency stage, its detection in plasma or CSF is more difficult, although the higher viral load will be found in B lymphocytes [49]. In addition, Sanders et al. [39] found a small proportion of positive cases in the brain tissue, with no differences between patients with active and inactive demyelinating plaques. Neither were there any differences when remittent or recurrent patients were considered [27, 40]. However, lytic and latent infection markers have recently been found in the CSF of MS patients, in ectopic follicles [11]. This finding suggests a new concept of the disease pathogen, where B lymphocytes would be chronically infected and become the virus carriers in the CSF.

Although the deep mechanism linking the EBV to MS is unknown, according to the above, it is possible that T and B lymphocytes generate an abnormal self-response due to cross-reaction with its own antigens that belong to the brain tissue [52]. Thus, it has been described that exposure to infectious agents induces the expression of alpha B crystalline in lymphoid cells. The immune system mistakes self alpha B crystalline for a microbial antigen and generates CD4+ T lymphocytes against it [53]. In addition, Pender [54] proposed that MS may be due to a defect in the elimination of infected B lymphocytes by CD8+ T cytotoxic lymphocytes, which may lead to their accumulation in the CNS [55].

Finally, the quality of the studies reviewed in this meta-analysis has been acceptable. Because most of our studies are not epidemiological exactly but are instead comparisons between selected individuals with MS and people without the disease, so the scale expresses lower scores in the “Comparability (C)” and “Selection (S)”. However, most articles have an average level of quality and it is acceptable. In almost all of the articles, the group of cases was selected taking into account a second medical or technical validation of the disease; however, selection was not random or consecutive, and was, thus, biased in most of the studies. For controls, in most of the articles, the selection was conducted among hospitalised patients, but MS was fully discarded in very few. On the aspect of comparison between cases and controls, almost all articles considered at least one factor: age or sex. To check for exposure to the virus, most authors employed the

high predictive value methods (serology, molecular diagnosis), using the same test for cases and controls. Specifically, on the aspect of antibody study, articles of the highest quality were those by Zivadinov et al. [43], Haahr et al. [4], Myhr et al. [34], Sundström et al. [10] and Wandinger et al. [42]. However, we may note the scarcity of comparison between cases and controls in the majority of the articles with molecular studies. In this regard, the study with the highest quality was that by Alvarez et al. [20].

In conclusion, the relationship between EBV and MS is unclear to the present date, but the virus may play an important role in the development of MS: EBV infection may be an environmental factor which, together with other environmental or endogenous factors, may alter the normal function of the immune system, in the form of autoimmunity, inflammation and demyelination. The important relationship found between the disease and anti-EBNA-1 antibodies may suggest the potential value of these antibodies as markers for early diagnostic and for follow up of MS. However, the literature analysed lacks a prospective, comparative cohort study that may determine the levels of antibodies years before the appearance of MS symptoms, so that we can obtain a definite conclusion.

References

1. Fernández O, Guerrero M, Fernández VE (2005) Esclerosis múltiple. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid
2. Haahr S, Höllsberg P (2006) Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Virol* 16:297–310
3. Salvetti M, Giovannoni G, Aloisi F (2009) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 22:201–206
4. Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF et al (2004) A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 109:270–275
5. Haahr S, Koch-Henriksen N, Møller-Larsen A et al (1995) Increased risk of multiple sclerosis after late Epstein-Barr virus infection: a historical prospective study. *Mult Scler* 1:73–77
6. Hernán MA, Zhang SM, Lipworth L et al (2001) Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology* 12:301–306
7. Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM et al (2007) Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 64:72–75
8. Ascherio A, Munch M (2000) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 11:220–224
9. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET et al (2006) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol* 63:839–844
10. Sundström P, Juto P, Wadell G et al (2004) An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 62:2277–2282
11. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D et al (2007) Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204:2899–2912
12. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A (2006) Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* 59:499–503

13. Ascherio A, Munger KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 61:288–299
14. Holmøy T (2008) Vitamin D status modulates the immune response to Epstein Barr virus: synergistic effect of risk factors in multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 70:66–69
15. Lindberg C, Andersen O, Vahlne A et al (1991) Epidemiological investigation of the association between infectious mononucleosis and multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 10:62–65
16. Marrie RA, Wolfson C (2002) Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Can J Infect Dis* 13:111–118
17. Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R et al (2004) Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA* 291:1875–1879
18. Banwell B, Krupp L, Kennedy J et al (2007) Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 6:773–781
19. Pohl D, Krone B, Rostasy K et al (2006) High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology* 67:2063–2065
20. Alvarez R, Cour I, Kanaan A et al (2000) Detection of viral genomes of the Herpesviridae family in multiple sclerosis patients by means of the polymerase chain reaction (PCR). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 18:223–228
21. Alvarez-Lafuente R, Garcia-Montojo M, De Las Heras V et al (2008) Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 14:595–601
22. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET et al (2001) Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 286:3083–3088
23. Bray PF, Luka J, Bray PF et al (1992) Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology* 42:1798–1804
24. Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC et al (1983) Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 40:406–408
25. Buljevac D, van Doornum GJ, Flach HZ et al (2005) Epstein-Barr virus and disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1377–1381
26. Denne C, Kleines M, Dieckhöfer A et al (2007) Intrathecal synthesis of anti-viral antibodies in pediatric patients. *Eur J Paediatr Neurol* 11:29–34
27. Ferrante P, Mancuso R, Pagani E et al (2000) Molecular evidences for a role of HSV-1 in multiple sclerosis clinical acute attack. *J Neurovirol* 6(Suppl 2):S109–S114
28. Hay KA, Tenser RB (2000) Leukotropic herpesviruses in multiple sclerosis. *Mult Scler* 6:66–68
29. Höllsberg P, Kusk M, Bech E et al (2005) Presence of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6B DNA in multiple sclerosis patients: associations with disease activity. *Acta Neurol Scand* 112:395–402
30. Morré SA, van Beek J, De Groot CJ et al (2001) Is Epstein-Barr virus present in the CNS of patients with MS. *Neurology* 56:692
31. Munch M, Riisom K, Christensen T et al (1998) The significance of Epstein-Barr virus seropositivity in multiple sclerosis patients? *Acta Neurol Scand* 97:171–174
32. Mancuso R, Delbue S, Borghi E et al (2007) Increased prevalence of varicella zoster virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J Med Virol* 79:192–199
33. Martin C, Enbom M, Söderström M et al (1997) Absence of seven human herpesviruses, including HHV-6, by polymerase chain reaction in CSF and blood from patients with multiple sclerosis and optic neuritis. *Acta Neurol Scand* 95:280–283
34. Myhr KM, Riise T, Barrett-Connor E et al (1998) Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64:539–542
35. Shirodaria PV, Haire M, Fleming E et al (1987) Viral antibody titers. Comparison in patients with multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *Arch Neurol* 44:1237–1241
36. Ponsoby AL, van der Mei I, Dwyer T et al (2005) Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 293:463–469
37. Sumaya CV, Myers LW, Ellison GW (1980) Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 37:94–96
38. Sumaya CV, Myers LW, Ellison GW (1976) Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Trans Am Neurol Assoc* 101:300–302
39. Sanders VJ, Felisan S, Waddell A et al (1996) Detection of Herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neurovirol* 2:249–258
40. Sotelo J, Ordoñez G, Pineda B (2007) Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis. *J Neurol* 254:493–500
41. Wagner HJ, Munger KL, Ascherio A (2004) Plasma viral load of Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 11:833–834
42. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A et al (2000) Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 55:178–184
43. Zivadinov R, Nasuelli D, Tommasi MA et al (2006) Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurol Res* 28:262–269
44. Riverol M, Sepulcre J, Fernandez-Diez B et al (2007) Antibodies against Epstein-Barr virus and herpesvirus type 6 are associated with the early phases of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 192:184–185
45. DerSimonian R, Laird N (1986) Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 7:177–188
46. Egger M, Smith GD, Altman D (1995) Systematic reviews in health care: meta-analysis in context. *BMJ Books*, London
47. Wells GA, Shea B, O'Connell D et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. Available online at: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm
48. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV et al (2005) Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 293:2496–2500
49. Gutiérrez J, Sorlózano A, Soto MJ et al (2006) Microbiological diagnosis of infection by the Epstein-Barr virus: pathogenic basis. In: Umar CS (ed) New developments in Epstein-Barr virus research. Nova Science Publishers, New York, pp 277–299
50. Cepok S, Zhou D, Srivastava R et al (2005) Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 115:1352–1360
51. Lünemann JD, Edwards N, Muraro PA et al (2006) Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain* 129:1493–1506
52. Holmøy T, Kvale EØ, Vartdal F (2004) Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *J Neurovirol* 10:278–283
53. van Noort JM, Bajramovic JJ, Plomp AC et al (2000) Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 105:46–57
54. Pender MP (2003) Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol* 24:584–588
55. Pender MP, Csurhes PA, Lenarczyk A et al (2009) Decreased T cell reactivity to Epstein-Barr virus infected lymphoblastoid cell lines in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:498–505

Epstein-Barr Virus: Novel Patented Therapeutics

E. Villegas¹, O. Santiago¹, A. Sorlózano¹ and J. Gutierrez^{*1,2}

¹Department of Microbiology, School of Medicine, University of Granada, Spain

²Service of Microbiology, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

Abstract: Epstein-Barr virus (EBV) is a virus present all throughout the world that causes infectious mononucleosis (IM) and is highly associated with certain malignancies. This study is a review of current knowledge concerning the pathogenic mechanisms of EBV in tumor and auto-immune diseases and the different new strategies to treat EBV associated pathologies.

Phenomena surrounding the proliferation and immortalization of B lymphocytes, the mechanisms of immune escape and the role of CD8+ and CD4+ T cells in the infection by EBV are explained.

An analysis is made of the role of EBV proteins during the biological events that take place in primary infection, persistent chronic infection together with an update of the approaches of novel patented therapeutics.

Currently there is no vaccine protecting against EBV-associated disorders and no treatment that may inhibit or eliminate their progression. Thus, it is crucial to obtain additional information on the function and importance of genes that play a role in the development of those diseases with which they are associated, as well as on the humoral and cellular immune processes involved in them.

Keywords: Epstein-Barr virus, multiple sclerosis, prevention, treatment.

1. INTRODUCTION

Epstein-Barr virus (EBV) is a gammaherpesvirus that ubiquitously infects humans—over 90% of the world's adult population is infected—and persists for the whole lifetime of the person [1]. At present, it is thought that primary EBV-infection occurs in the oropharynx *via* exchange of cell-free virus or productively infected cells in saliva but the finding of individuals who do not have EBV specific memory cytotoxic T lymphocyte (CTL) response, indicates that B lymphocytes, and not oropharyngeal epithelial cells, are required for primary EBV infection [2]. The virus mainly binds to B cells, through interaction of the gp350/220 present in the envelope of the virus with cell receptor CD21, this interaction fosters infection. Later the EBV is able to produce a latent infection, mainly in B cells, although latent forms of the virus may also be hosted by the nasopharyngeal epithelial cells and some T type cells [3].

In vitro, latent infected cells may express three types of latency depending on the genes that are expressed and on the differentiation status of the infected B cell [4]. Thus, naïve B cells express latent EBV nuclear antigens (EBNA) EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, -LP, latent membrane protein 1 (LMP1), LMP2A and LMP2B, known as growth program (latency III). Germinal centre cells and memory B cells express EBNA1, LMP1 and LMP2A, known as default program (latency II) and, lastly, EBNA1 is the only protein expressed in peripheral blood B cells, known as latency program (latency

I) [5]. Only EBNA1 is expressed in all EBV-positive proliferating cells in healthy EBV carriers [4] and in all EBV-associated malignancies [6].

EBV infection of B cells is mainly controlled by CD8+ CTL, in addition to natural killer (NK) cells. CD4+ T cell response is probably also important at this time as a source either of effector cells or of cytokine help for the massive CD8+ T cell [7]. However, immune response is not always enough to control the infection, thus resulting in an active chronic infection by EBV [8]. In a smaller number of patients, the proliferation of cells infected by the virus is associated with the development of lymphoproliferative processes, epithelial neoplasias and autoimmune diseases [9-11].

2. REPLICATIVE CYCLE

The virus penetrates the cell wall (Fig. 1) and migrates to the nucleus, where replication occurs. The genome is transcribed in three different phases, each of which depends upon reading the genes in the previous phase.

The initial, or immediate phase begins after the entry of the virus and leads to the synthesis of primary or regulatory proteins, which are necessary for the later synthesis of nucleic acids and structural proteins. They are located in the nucleus of the cell, are antigenic and are present throughout the viral cycle. These proteins are encoded by the EBV-BZLF-1 open reading frame.

In the second, or early phase, early and late-early genes are transcribed, giving rise to specific proteins such as phosphorylases and polymerase DNA for the synthesis of viral DNA. Antigen proteins are also synthesised. These regulate the subsequent phases and are located initially in the cell

*Address correspondence to this author at the Department of Microbiology, School of Medicine, University of Granada, Avd. de Madrid, 11, E-18012, Granada, Spain; Tel: (0034)958242017; Fax: (0034)958246119; E-mail: josegf@ugr.es

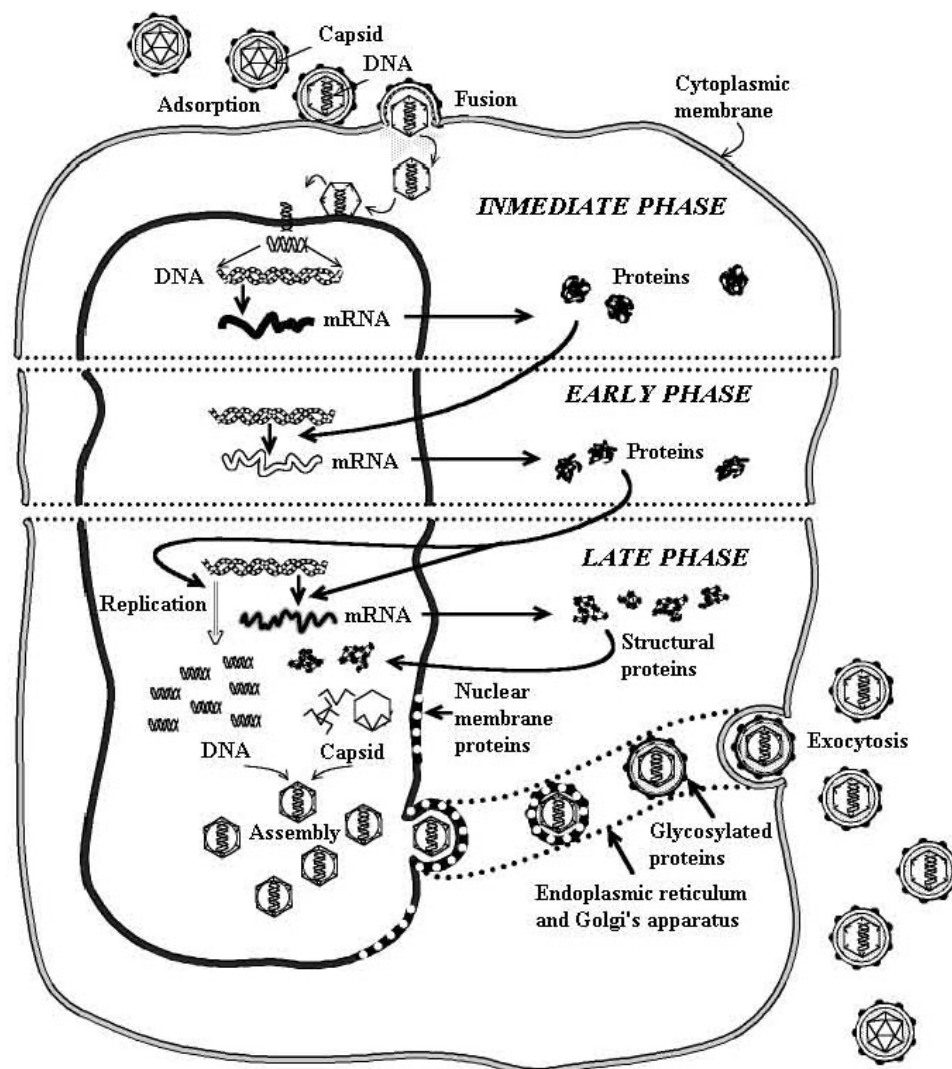


Fig. (1). Replicative EBV phases.

membrane and diffused throughout the cytoplasm, later to become restricted to the nucleus.

During the third, late phase, most of the late genes of the virus are transcribed and structural proteins are synthesised such as those of the capsid [viral capsid antigens (VCAs), a very specific one of 18 kDa and others of 40 and 135 kDa], and those of the envelope [late membrane antigens (LMAs)]. Capsids, which then incorporate the DNA, and glycoproteins, located initially in the nuclear membrane and Golgi's apparatus, are generated. The capsids approach the glycoproteins to create new complete particles.

Once formed, the virus leaves the cell, first emerging slowly through the Golgi apparatus and then lysing the cell due to its massive exit. Empty extracellular capsids and protein macromolecules, all of them antigenic, are frequently present during this process. These phases are successive and may coexist in the same cell.

3. EBV-ASSOCIATED DISEASES

EBV primary infection normally occurs during childhood and it is generally asymptomatic, although in half of the

cases, it appears as infectious mononucleosis (IM) during adolescence. IM is a self-limited lymphoproliferative disease which may be considered an immune pathology with general symptoms caused by pro-inflammatory cytokines produced by T cells infiltrated in tissues throughout the whole body [12]. When the immune system is unable to control the infection, the patient suffers active chronic EBV infection [8].

3.1. EBV-Associated Tumors

EBV has been linked to various lymphoproliferative processes and epithelial neoplasias in immunodepressed and immunocompetent persons. Amongst them we may note posttransplantation lymphoproliferative disorder (PTLD) patients, which suffer a complication occurring in receptors of organ transplants that have been treated with immunosuppressors [13]; HIV-associated lymphomas, where HIV-induced immunodeficiency may increase the traffic of EBV-infected B cells that would lead to a wide variety of AIDS-related lymphomas [14]; Burkitt's lymphoma (BL), a pathological entity initially described in Africa, is the most common childhood lymphoma in western countries and represents approximately 5% of all adults lymphomas [15,16];

Hodgkin's lymphoma (HL) in which a malignant population of Reed-Sternberg mononuclear and multinuclear cells is produced, in addition to reactive inflammatory cells [17], and nasopharyngeal carcinoma (NPC), a nasopharynx lymphoepithelioma that is extremely common in Southeast Asia and in Africa [18].

EBV-associated tumors are characterized by mRNA transcription of a restricted number of EBV genome regions in all cell tumors. The pattern of gene transcription is different for different types of tumors (Fig. 2).

There are different cell lines established from BL biopsies *in vitro*, at first they show the original biopsy cell phenotype (group I), on serial passage, some BL lines show appearance of lymphoblastoid cells (group II) or a group III cells with phenotype indistinguishable from that of *in vitro*-transformed LCLs. Those cellular changes are associated with a change in the form of viral latency. The BL line, group I cells, express only the viral genome maintenance protein EBNA1, together with EBERs and BARTs (latency I) [19,20]. *In vitro*-transformed LCLs cells, group III cells, express the full spectrum of viral antigens that are found in LCLs (latency III). This group III express all six EBNA species. [20].

EBERs, EBNA1, BARTs and LMP1, LMP2A and LMP2B (latency II) have been detected in NPC [21] as well as in HL [22]. However, there are important quantitative differences between NPC and HL. NPC is best classified as displaying a latency I/II form of infection, immediate between those displayed by BL (latency I) and HL (latency II) [20]. In NPC, the latent viral gene EBNA1 and the EBER genes are expressed in all EBV-positive cases and LMP2A and LMP2B transcripts are amplifiable in most tumors. In HL, EBV is present in the multinuclear Reed-Sternberg cells, is characterized by expression of the latency II [23].

BL, HL, and NPC all develop over much longer latent periods, more typical of tumors with a complex multistage pathogenesis while the PTL-like lymphomas have relatively short latency periods (Fig. 2). The genetic pattern expressed in PTL is EBERs, EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, -LP, BARTs, LMP1, LMP2A and LMP2B (latency III) [24,25] (Table 1). PTLD may be initiated when a type of B cell becomes infected and expresses the latency III program, these cells cannot exit the latency III program, and they continue to proliferate owing to the absence of effective T-cell immunity [26]. The fact that most EBV-positive malignancies other than PTLD show highly restricted latent antigen ex-

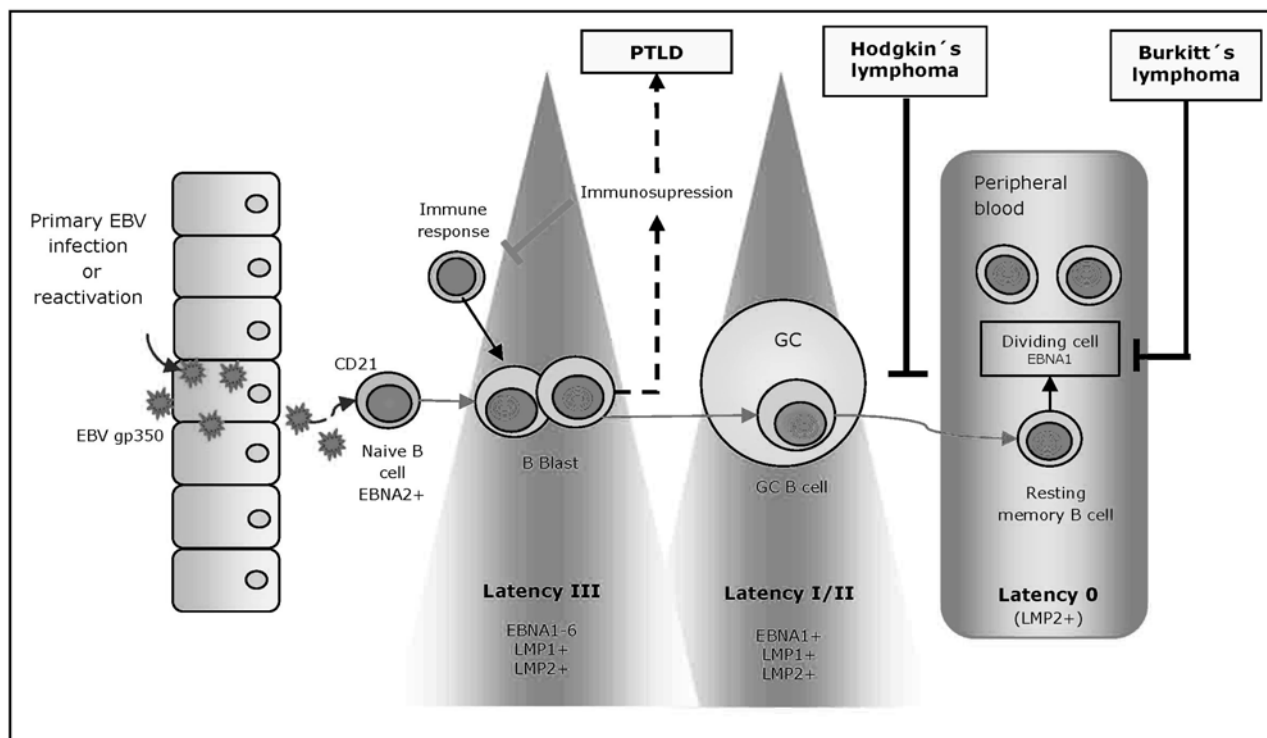


Fig. (2). Schematic representation of viral genes expression in the EBV life cycle and the EBV associated lymphomas.

Naive B cells are infected by EB-virions that enter the oropharyngeal lymph nodes by crossing epithelial barriers. Under influence of EBNA2-driven transcription program, naive B-cells differentiate into B blasts that express the full set of latent EBV genes and which are probably controlled by anti-EBV cytotoxic T-cell responses. The B blast further differentiates through the germinal center, and this cell types express the latent membrane proteins LMP1 and LMP2, which provide them survival signals and growth in absence of antigen. Memory cells exit the cell cycle and enter the peripheral circulation. This memory cells are generally silent for all protein-encoding genes but may occasionally express LMP2. Memory B cells occasionally divide and express EBNA1 alone, which is essential for maintenance of the viral genome in the host cell. Hodgkin's lymphoma arises from a virus-infected cell that is blocked at the GC stage, which results in constitutive expression of the latency II. Burkitt's lymphoma arises from a GC that is entering the memory compartment. The cell expresses EBNA1 only. If the CTL response is suppressed, the blasts can lead to PTLD.

Table 1. EBV Latent Gene Expression Patterns in EBV Associated Disorders

| | BL | NHL | HL | NPC | PTLD | IM |
|---------|----|-----|----|-------|------|-----|
| EBNA1 | + | + | + | + | + | + |
| EBNA2 | - | - | - | - | + | + |
| EBNA3A | - | - | - | - | + | + |
| EBNA3B | - | - | - | - | + | + |
| EBNA3C | - | - | - | - | + | + |
| EBNALP | - | - | - | - | + | + |
| LMP1 | - | + | + | + | + | + |
| LMP2A | - | + | + | + | + | + |
| LMP2B | - | + | + | + | + | + |
| BARTs | + | + | + | + | + | + |
| EBERs | + | + | + | + | + | + |
| OTHERS | | | | BARF1 | | |
| LATENCY | I | II | II | II | III | III |

BL: Burkitt's lymphoma; NHL: non-Hodgkin lymphomas; HL: Hodgkin's lymphoma; NPC: nasopharyngeal carcinoma; PTLD: posttransplant lymphoproliferative disorders; IM: infectious mononucleosis.

pression, with loss in particular of the immunodominant EBNA3A, 3B, 3C proteins, emphasizes the difficulties inherent in trying to target these tumors by immunologic means [27,28].

3.2. EBV-Associated Autoimmune Diseases

EBV has recently been depicted as a possible triggering factor of some autoimmune diseases [11]. Amongst them we may highlight systemic lupus erythematosus (SLE), an autoimmune chronic inflammatory disease that generates a multisystemic rheumatic disorder which ultimately causes organ failure [29]; rheumatoid arthritis (RA), a widespread systemic autoimmune disease with infiltration of CD4+ T cells and NK cells into the *synovia* of the joints [30] and multiple sclerosis (MS), a neurology disease characterized by chronic inflammation and demyelination within the central nervous system (CNS) [31].

Epidemiology and serology studies show a clear relation between MS and EBV [32-34]. The role of EBV in MS is unknown, but there are some theories relating the immunopathology of the disease with the virus infection. One of these theories is based on the homology between the virus proteins and myelin proteins [35]; thus, MS would be the result of combining a hereditary predisposition and an unknown environmental factor that may maintain the auto-reactivity of T cells through "molecular mimicry" [36,37].

During the study of auto-reactive CD4+ T cells in MS, Wucherpfenning and Strominger [38] characterized a DNA polymerase-derived epitope (BALF5) of EBV with a strong cross-reactivity with the myelin basic protein (MBP). Lünemman *et al.* [39] showed that the repertoire of specific anti-EBV T cells in MS patients is mainly composed of specific anti-EBNA1 CD4+ T cells and that the frequency was

twice as much in cases than in controls. However, the frequency of EBNA1-specific CD8+ T cells was lower both in cases and in controls. These results show that EBNA1-mediated immunological control of latent EBV infection is deregulated at T cell level in patients with MS [39].

Another possible role of EBV in MS is based on EBV's capacity to induce α -B-crystallin protein on the surface of B cells through their infection, an event which would provoke a response of CD4+ T cells against it. This protein is identified as the major autoantigen abnormally expressed in the oligodendrocytes of the brains of MS patients [40]. We may also add that EBV infection of B cells produces retrovirus particles in active MS patients [41]; these endogenous retroviruses may transcribe a gene that codifies a protein of the retrovirus envelope with potential superantigen activity [42]. These superantigens may activate polyclonal T cells specific against myelinic antigens [43].

Cross-reaction of specific IgG against EBNA1 with autoantigen epitopes of Ro and Sm ribonucleoproteins [44] was found in systemic lupus erythematosus (SLE). EBNA1 is the only protein expressed in all latent infected cells, in all virus-associated tumors [10] and in autoimmune diseases associated with EBV (MS, RA and SLE) [11].

Both SLE and RA are characterized by high titres of anti-EBV antibodies and impaired T-cell responses to EBV antigens. These autoimmune diseases are both associated with an increased risk of lymphoma with a potential role for EBV [45].

The EBV load in the peripheral blood of patients with RA has been investigated in two studies both of which showed that EBV load was about 10-fold higher in RA patients than in controls [46,47].

4. PROTEINS INVOLVED IN EBV PATHOGENESIS

The most plausible pathogenetic mechanism of EBV in autoimmune diseases and specifically in MS is the above-mentioned “molecular mimicry”. The pathogenetic mechanism that may explain this theory implies both genes able to produce immortalization and proliferation of infected cells and genes involved in immune evasion, which are also essential to produce neoplasias.

4.1. Cell Proliferation and Immortalization

EBV infection gives infected cells the capacity to differentiate and to clonally expand through the LMP1 protein, which morphologically transforms B cells reducing the response to normal differentiation signals and promoting proliferation [48,49], as well as LMP2A [4]. LMP1, which is a ligand-independent cell-surface signalling molecule, provides a surrogate T-helper cell signal. LMP1 mimics the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily receptors by using their intracellular signaling factors TRAF and TRAD. CD40 (TNFR superfamily receptor), is a key receptor on germinal center B cells, which can deliver a survival signal. LMP1 is a functional homologue of CD40. *Via* their interaction with these factors and by mechanisms not yet fully understood LMP1 triggers two phosphorylation pathways that lead to the activation of transcription factors NF- κ B and AP1. The result of signalling from both CD40 and LMP1 is to rescue B cells from apoptosis and drive their proliferation [4].

LMP2A can maintain these cells in absence of a competent B cell antigen receptor (BCR) that may translate signals. It has been observed in *in vitro* infected B cells that the LMP2A N-terminal cytoplasmic domain blocks the signal translating BCR, thus preventing the change from latent to lytic cycle, and maintaining latency [50]. This domain interacts *via* multiple phosphotyrosines arranged in ITAM- and SH2-protein binding motifs with the tyrosine kinases Lyn and Syk, as with BCR. This interaction diminishes Syk and Lyn from binding to the cytoplasmic B-cell, that would result in induction of the lytic cycle. LMP2A signalling does not cause B cells to grow, but delivers the tonic signal that is essential for the survival of all B cells [4,10]. LMP2A function is influenced and negatively regulated by LMP2B [51].

EBNA2 mainly acts as a transcription factor of cellular genes (*c-fgr*, *c-myc*), B cell activation markers such as CD23 and CD21, but also of other viral genes, including LMP1 and LMP2A [9,52]. EBNA2 interacts with transcription factor RBP-J κ to promote conversion of resting B lymphocytes into lymphoblastoid B cells [53]. It has also been related to loss of somatic hypermutation of germinal centre B cells and, therefore, it is related to the differentiation and transformation of B cells [54].

Additionally, this proliferation, transformation and immortalization of B cells would have influence on another protein such as EBNA-LP, acts in the expression of cell genes essential for B cell outgrowth [55] in addition to increasing the ability of EBNA2 to transactivate the LMP1 gene [56].

EBNA 3A and 3C nuclear proteins are essential for EBV-mediated immortalization, but not EBNA 3B [10]. EBNA

3A-C regulate the expression of certain cell genes and bind to a variety of host proteins including different isoforms of the cellular transcription factor RBP J κ [57]. The EBNA-3s compete for RBP-J κ with EBNA-2 and Notch, and limit EBNA-2 strong up-regulation through RBP-J κ [58,59]. Thus, EBNA2 and EBNA3 proteins work together to precisely control RBP-J κ activity, thereby regulating the expression of cellular and viral promoters containing cognate J κ sequence. EBNA3C acts as a regulating complex increasing the expression of LMP1, promoted by EBNA2 [60]. *In vitro*, EBNA3B has shown that it is not required for B cell immortalization, but that it is a highly maintained gene, such that it seems important for the infection of the host. It also mediates the regulation of CXCR4 chemokine, which may be an important strategy for the alteration of B cell homing in the infected host. The deletion of EBNA3B implies a reduction of the expression of EBNA3C and a lesser growth [61].

Lastly, EBNA1 protein has the ability to induce an increase in the expression of RAG1 and 2, which contribute to the reordering and recombination of immunoglobulin genes and of T cell receptor genes during the V(D)J recombination process, essential for the regeneration of mature T and B cells [62]. EBNA1 is a protein expressed both during the latent and the lytic phases, transcribed through various promoters (Wp, Cp, Qp or Fp) depending on the virus phase [10]. Amongst its functions, it is believed to play an important role in replication and mainly in the maintenance of the episome through interaction with chromosome proteins (HMG-1 and H1) [63]. This binding also guarantees the segregation of episomes in the progeny.

4.2. Immune Response Evasion

In IM there large numbers of “atypical mononuclear” cells in the blood, predominantly T lymphoblasts of the CD8+ subset but include some CD4+ T cells and also activated natural killer (NK)-like cells.

In vitro studies have demonstrated that NK cells can inhibit the EBV-induced transformation of resting B cells if added within a few days of infection [64]. But the innate immune responses are of limited value, at least in the control of latent growth-transforming infections. EBV has not yet revealed any NK immune evasion strategy [65].

There are a highly expanded CD8+ T cell response and this issue has long been debated. CD8+ T cell response to latent cycle antigens, are markedly focused on immunodominant epitopes drawn from the EBNA3A, 3B, 3C family proteins, and less often from EBNA2, EBNA-LP, or LMP1 and apparently never from EBNA1 [28]. Although the CD8+ T lymphocyte response to latently infected cells is well characterized, very little is known about T cell controls over lytic infection. The primary CD8+ T cell response to EBV in IM patients contains multiple lytic antigen-specific reactivities, epitopes from immediate early (BZLF1, BRLF1) and several early (BMLF1, BMRF1, BALF2 and BALF5) proteins, at levels at least as high as those seen against latent antigens [66,67].

CD4+ T cell responses are induced against a range of epitopes within latent cycle antigens. The responses to the immediate early protein BZLF1 were more common than

responses to BMLF1 [68]. EBV infection therefore induces CD4+ T cell responses to multiple latent cycle epitopes, with the greatest concentration of epitopes being in the C-terminal half of EBNA1. The C-terminal half of the EBNA1 is a particularly rich source of CD4 epitopes for a range of different HLA class II alleles in Caucasian donors [69-71].

Additionally, it has been observed that the protein codified by the BGLF5 gene of the lytic cycle reduces the synthesis of host proteins in such a way that it may reduce the surface presentation of HLA molecules for recognition by T cells [72]. Lytic-phase BZLF1 or ZEBRA protein may also interfere in abrogation of IFN γ -induced MHC-II upregulation and contribute to the immune escape [73].

Besides all these mechanisms to avoid recognition by T-lymphocytes, the immune response during EBV infection may be suppressed by the virus through the expression of the lytic phase BCRF1 gene, the product of which is homologous with human IL-10 (vIL-10), which would act by suppressing Th1 cell response [74]. The expression of BARF1, a CSF-1 homologue, also interferes with cytokine production, something that may negatively alter the immune response [75].

B cells which, in normal conditions, are eliminated through apoptosis may increase their survival after EBV infection. BHRF1 is a prosurvival molecule from EBV that has a high degree of homology with bcl-2, a family of proteins that inhibits apoptosis [76,77].

The LMP1 protein through intracellular signalling also rescues B cells from signalling for apoptosis and drives them towards proliferation [78]. The LMP1 is a potent activator of NF κ B, and the activation of NF κ B is an important step for EBV-induced B cell immortalization.

Infected B cells may escape detection by CD8+ T cells through EBNA1. EBNA-1 is not presented properly to T cell since the glycine and alanine repeat domain (GAR) of EBNA-1 interferes with processing. There are evidences suggesting that the repetitive domain interferes with ubiquitin proteasome-dependent degradation and may thereby prevent the presentation of MHC-I-associated antigenic peptides [79]. While, the isolation of CD4+ or CD8+ EBNA1-specific CTL from healthy carriers implies the processing and presentation of EBNA1 epitopes *via* a proteasome-independent cross-priming pathway [80].

EBERs genes codify two small nuclear RNAs which seem to also participate in blocking apoptosis [81].

5. PROPHYLAXIS AND TREATMENT

5.1. Prophylaxis

Strategies based on simple or EBV-combined peptides and on peptides from T-cell immune response (Table 2) have been employed in the development of vaccines.

5.1.1. Peptide Vaccines

Amongst the vaccines developed with viral proteins we may highlight that developed by Medimmune [108] and GlaxoSmithKline [109] with structural protein gp350. This vaccine was developed with the idea of preventing infection

by EBV. Phase I/II clinical studies have shown that this recombinant glycoprotein [108,109] may elicit neutralizing antibodies [82]. This glycoprotein had proven effective in preventing the development of EBV-induced IM, but it had no efficacy in preventing asymptomatic EBV infection [83], although many cases of EBV-associated tumors and MS [84] may be prevented by a suitable vaccine that protects against EBV infection.

Two vaccines for EBNA1 have been developed within the possible vaccines that use EBNA1 antigens, one patented by Akzo Nobel [110] and the other by Affinium Pharm [111]. There is another patent registered for EBNA2 [112], the aim of which is to apply it in PTDL prophylaxis. Two patents have been developed codifying peptide antigens of the BHRF1 region, such as p17 (EA-R) and p50 (EA-D) [113] for the prevention of IM and NPC [114]. Diatech PTY [115] developed vaccines based on mimotypes, molecules antigenically mimicking EBV determinants from VCA, EBNA and EA homologous sequences. This patent indicates that antibodies produced from these mimotypes may also recognize gp125 (BALF4) and p18 (VCA) [115].

Another group of patented polypeptides are EBNA1, LMP1 and LMP2 synthesized segments. The indications of this patent are mainly aimed against NPC, HL and PTLD [116]. There is another patent with very immunogenic peptides encoded within the EBV BFRF3 and BDRF1 open reading frames, expressing VCA-p18 or VCA-p40 capsid proteins, developed by Akzo Nobel [117]. Middeldorp [118] developed a vaccine using LMP1, LMP2 and BARF1 sequences, proteins which are expressed in the nuclear membranes of infected cells. The peptide that is present in all EBV-associated tumors and autoimmune diseases is EBNA1; thus, a possible vaccine would include EBNA1 added to another latent or lytic gene [119]. EBV infection is associated with autoimmune diseases and vaccine development has been suggested to try to prevent them. Harley *et al.* [120] tried to develop another form of immunization by using homologous peptides related with autoimmune diseases. The peptide used enclose homologues of an antigenic sequence identified in the EBV and it may reduce the amount of circulating antibodies with particular specificity in addition to re-inducing tolerance due to treatment with the antigen. Huber *et al.*, [121] developed an immunization through peptides, specifically against the HERV-K18 superantigen induced by EBV when transactivating human endogenous retroviruses [42], since this superantigen may stimulate a great amount of T cells. This would protect against diseases such as IM, EBV-induced lymphomas, and EBV-associated autoimmune diseases such as SLE, RA, Sjogren's syndrome and MS.

5.1.2. CD8+ and CD4+ Lymphocyte Epitopes

Another type of vaccine is that based on CD8+ and CD4+ T cells specific response peptides. In this context, Elliot *et al.* [85] used a not yet patented vaccine with only one CD8+ T cell epitope to generate immunity against IM. In phase I trial, they observed it produced a response specific T cells, but the number of subjects studied was too small for any conclusion to be reached. One vaccine that has recently been patented by Queensland Inst Med Res [122] is based on

Table 2. Patented Vaccines Against EBV

| PATENTED VACCINES | PUBLICATION NUMBER | APPLICANT PATENTS | PATENTS |
|--|--------------------|--|---------|
| gp350 | US2007202122 | Medimmune INC | [108] |
| gp350 | WO03094962 | GlaxoSmithKline Biolog SA | [109] |
| EBNA1 | WO9406912 | Akzo Nobel NV | [110] |
| EBNA1 | WO2004007536 | Affinium Pharm INC | [111] |
| EBNA2 | US2006257356 | Foundation for Medical Educati | [112] |
| BHRF1 | US2008175849 | Ortho diagnostic systems INC | [113] |
| BHRF1 | WO9311267 | Cancer Res Inst | [114] |
| VCA, EBNA, EA | WO2007022557 | Diatech PTY LTD | [115] |
| EBNA1, LMP1, LMP2 | WO2007065215 | Savine Therapeutics PTY LTD | [116] |
| VCA-p18 VCA-p40 | US6365717 | Akzo Nobel NV | [117] |
| LMP1 + LMP2 + BARF1 | AU2002235884 | Cyto Barr BV | [118] |
| EBNA1 + lytic or latent gene | WO2007097820 | Univ. Ohio State Res Found | [119] |
| Peptide for autoantibodies | WO0158481 | Oklahoma Med Res Found | [120] |
| HERV-K18 superantigen | WO0247720 | Univ. Tufts | [121] |
| CD8+ T cell epitopes of EBV type A and B | WO 9745444 | Queensland Inst Med Res; Commw Scient Ind Res Org; Univ. Melbourne; Inst Medical W & E Hall; Csl Ltd | [122] |
| CD8+ T cell epitopes of LMP1 | WO2004041849 | Queensland Inst Med Res; Commw Scient Ind Res Org; Univ. Melbourne; Inst Medical W & E Hall; Csl Ltd | [123] |
| CD8+ T cell epitopes of gp85 or gp350 and LMP1 or LMP2 | WO9902550 | Queensland Inst Med Res; Commw Scient Ind Res Org, Univ. Melbourne, Inst Medical W & E Hall; Csl Ltd | [124] |
| CD4+ T cell epitopes of EBNA1, LMP1 and LMP2 | US2009130134 | Pancre, Auriault | [125] |
| Dendritic cells EBNA1 | WO0112215 | Univ. Rockefeller | [126] |
| APC EBNA1 + LMP1 | WO2007049737 | Medical and Biolog Lab Co LTD; Aichi Prefecture | [127] |
| Ad5F35-LMP2 recombinant adenovirus | CN1907493 | Zeng YI | [128] |
| EBNA1 recombinant adenovirus | WO03047634 | Univ. Health Network | [129] |

the development of CD8+ T cell epitopes against both EBV subtypes, which are distinguished through their differences in the genes codifying EBNA2, 3B and 3C. As indicated, the vaccination may be able to protect 90% of the Caucasian population. This same institution has also developed two vaccines based on LMP-1 or LMP-2 and gp85 or gp350 epitopes recognized by CD8+ T cells [123,124].

The study of latent antigen-specific CD4+ T cell responses has been motivated by the fact that most EBV-associated tumors are HLA class II-positive, even tumors such as Burkitt's lymphoma (BL), which is globally deficient in HLA class I antigen processing but retains class II processing function [86]. Pancre *et al.* [125] developed immunogenic peptides derived from EBV type I and II latency antigens comprising at least one CD4+ T cells epitope which can be recognized by the majority of individuals in the Cau-

casian population, the use of which may stimulate a strong response against CD4+ T cells in the immunotherapy of tumor pathologies associated with types I and II latency phases [87].

EBNA1, the only viral protein expressed in most BLs, shown that CD4+ T cell clones to at least some EBNA1 epitopes can recognize and kill appropriately HLA-matched LCLs and also EBNA1-positive BL lines [71,86]. Hence, CD4+ T cells could be useful therapeutically if they were able to recognize HLA class II-positive cells endogenously expressing the relevant latent protein [65].

It has been recently observed that the use of antigen presenting cells (APC) T-cell immunization strategies may obtain a more efficient immunization than the one obtained with lymphoblastoid cell lines (LCLs) [88]. Specifically, a vaccine based on this concept has been patented which elicits

a strong CD4⁺ T cell response using dendritic cells (DCs) charged with EBNA1 [126].

It was found that an APC having mRNA of LMP1 and EBNA1 introduced therein can induce an EBV-specific cytotoxic T cell, which would eliminate an EBV-infected NK lymphoma [127]. These vaccines can confer a protective response to CD4⁺ and CD8⁺ T cells against EBV transformed B cells *in vitro* [89]. It has been observed and patented that lymphocyte production by DCs that are infected with recombinant adenovirus codifying LMP2 may be able to kill CNF cells [90,128]. CD4⁺ T cells specific for EBNA1 and CD8⁺ T cells specific for LMP2 may be generated [91] by infecting DCs with recombinant modified vaccinia Ankara virus (MVA). Following the same line of research, Liu *et al.* [129] tried to develop, *in vitro* and *in vivo*, a specific response of CD4⁺ and CD8⁺ T cells against EBNA1 for the treatment of cancer with an adenoviral SE1 vector, which would limit the cellular growth of the tumor and/or cause its death. This patent may also prove useful in MS in eliminating self-reactive B and T cells.

5.2. Treatment

Strategies based on chemical products, lymphocyte transfer and gene therapies have been developed for the treatment of EBV infection (Table 3).

5.2.1. Chemical Treatments

Antiviral agents, such as acyclovir [92] and valacyclovir [93], DNA polymerase inhibitors, are the most used in the treatment of EBV infection, but the efficacy of both is limited because they only act if the virus uses its own DNA polymerase, therefore being effective only in lytic-phase but not in latent-phase cells. A study that assessed the efficacy of valganciclovir showed that in 47 liver transplantation children with a high viral load of EBV treated with valganciclovir, PTLD was suspected in only one child and a long valganciclovir treatment achieved undetectable EBV-DNA in 47% of patients [94]. Other antiviral agent, ganciclovir, showed that a treatment during 30 days decreased in 38% the risk of PTLD during the first year post-transplant in renal patients [95]. This study indicated that ganciclovir could be more potent than acyclovir. Anti-viral therapy appears to play an important role in reducing the risk of PTLD in post-transplant patients.

The use of an agent to induce virus-specific genes codifying kinases (thymidine kinase, BGLF4) that, when expressed, phosphorylate the nucleoside analogue, ganciclovir, and transform it into its active form has been studied for some time [96]. Sodium butyrate and radiation, and arginine butyrate selectively activate the EBV thymidine kinase gene in latently infected EBV-positive tumor cells [97,98].

Table 3. Patented Treatments Against EBV

| PATENTED TREATMENTS | PUBLICATION NUMBER | APPLICANT PATENTS | PATENTS |
|--|--------------------|---------------------------------------|---------|
| Geldanamycin (Hsp90-ATPase modulator) | WO2009014759 | Trustees of the Univ. of Columbia | [130] |
| Lipophilic phosphonoacid/ nucleoside + antiviral | WO9838202 | Univ. California (San Diego) | [131] |
| L-nucleoside (L-FMAU) | WO9520595 | Univ. Georgia; Univ. Yale | [132] |
| Simvastatin | WO2005042710 | US Government | [133] |
| 1-(2-Fluoro-4-thio-ss-D-arabinofuranosyl)-5-methyluracil | WO2009034945 | Yamasa CORP; Univ. Kyoto | [134] |
| 5-substituted uracil-nucleoside | US2007197462 | Univ. Emory | [135] |
| Inducing agents | EP1886677 | Perrine SP, Faller DV, White BF | [136] |
| EBNA1 specific lymphocytes transfer | WO0112215 | Univ Rockefeller | [126] |
| EBNA1 specific lymphocytes transfer | US2006188520 | The Rockefeller University | [137] |
| Ad5F35-LMP2 recombinant adenovirus | CN1907493 | Zeng YI | [128] |
| EBNA1 recombinant adenovirus | WO03047634 | Univ. Health Network | [129] |
| Proteasome inhibitors | WO2004004749 | Univ. Charite | [138] |
| ITAM inhibitors through LMP2A | US2007110760 | Monroe <i>et al.</i> | [139] |
| RBP-J-EBNA2 mutant | WO02098918 | GSF Forschungszentrum Umwelt | [140] |
| RNAi (EBERs) | US 2007202082 | Jin <i>et al.</i> | [141] |
| gp42 | US2009074719 | Univ. Northwestern | [142] |
| EBNA3C-TAT peptide | WO2008005506 | Trustees of the Univ. of Pennsylvania | [143] |
| CtxB or EtxB/ LMP1 or LMP2 complex | WO0247727 | Univ. Bristol | [144] |

A proposed and patented chemical compound that may inhibit EBV replication in the host is a host chaperone protein activity modulator (Hsp90-ATPase), an ansamycin antibiotic, specifically, geldanamycin (17-dimethylaminoethyl-amino-17-demethoxy-geldanamycin). This Hsp90 activity modulator is an inhibitor of the expression of bcl2-associated anathogene 3 (BAG3) [130].

Another compound that has recently been proposed and patented is the combination of an antiviral and a lipophilic phosphonacid/nucleoside conjugate with high antiviral activity. The compound includes a phosphonacid/nucleoside conjugate in which the carboxyl group and phosphonyl groups of phosphonacid are sterified, such that the compound is comprised of at least a lipophilic group and a nucleoside group [131].

Another chemical compound indicated for the treatment of the hepatitis B virus and of the EBV is an L-nucleoside in which the R group is occupied by a purine or pyrimidine base. The active substance is 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyluridine, also referred to as L-FMAU [132]. Simvastatin, which belongs to the family of drugs that inhibit the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, binds specifically to a domain of lymphocyte function-associated antigen 1, (LFA-1) thus inhibiting its function [133]. This domain of cell adhesion is highly expressed in tumors with extranodal localization such as those that appear in immunocompromised patients with EBV-associated immunoblastic lymphoma in areas such as the brain, the lungs or the gastrointestinal tract. The administration of Simvastatin together with LCLs in immunodeficiency mice (SCID) has been observed to produce a delay in the development of EBV associated lymphomas and to prolong survival [133]. Other patented chemical compounds that may currently be used are 1-(2-Fluoro-4-thio-ss-D-arabinofuranosyl)-5-methyluracil [134], patented by Yamasa CORP and 5-substituted uracil-nucleoside, which acts as a thymidylate synthetase inhibitor. The latter is patented by Schinazi *et al.* [135] and may be used in cancer treatment. Inducing agents, such as the patent developed by Perrine [136], are also registered.

Anti-B lymphocyte chemical treatments, such as Rituximab, have also been observed to obtain a very good response, since B cells found in the meninges of MS patients may be acting as APC for T cells and therefore contributing to the propagation of local disease-relevant immune responses [99].

5.2.2. Lymphocyte Transfer

A proposed treatment approach is to try to increase the response of the immune system against the target organism. The predominant immunologic response in viral infections is carried out through CTL. This response, mediated by MHC-I, is directed against EBNA3A, 3B and 3C antigens and, with less frequency, against EBNA2, EBNA-LP, LMP1 and LMP2, in the case of EBV. Considering this, infusions of donor leukocytes containing CTL presensitized to EBV, were transferred to patients developing PTLTD for the treatment of the disease, showing regression in some cases [100]. This method was refined through the transfusion of EBV-specific CTL lines and used at the moment of development of a tu-

mor or as prophylaxis [101]. It has been suggested that to make the cell response more specific for solid organs transplant, all CTL that react with the host MHC may be selected from the donor for their transplant [102].

It has also been observed and patented that DCs may present EBNA1 to CD4+ T cells [103]. Thus, CTL have the ability to efficiently recognize and destroy tumor cells that express EBNA1 [126,137] although this statement is not in agreement with other authors [79].

Unfortunately, in NPC, HL and NHL, this therapy is difficult partly due to the fact that the stimulation of LCLs mainly occurs towards immunodominant T cells specific against EBNA3, which is not expressed in these tumors.

5.2.3. Gene Therapy

Gene therapy has been developed for EBV-related lymphomas expressing a suicide gene which was driven by EBNA2 dependent regulatory elements in cells latently infected with EBV [104].

Zeng Yi [128] and Liu *et al.* [129] carried out, and patented, *in vitro* studies focused on the treatment and prevention of EBV-positive cancers by administering a nucleic acid molecule comprising an LMP2 [128] or EBNA1-responsive promoter region [129] operatively linked to a gene necessary for viral replication, preferably in adenovirus replication, and optionally one or more heterologous genes [105, 106].

5.2.4. Other Therapies

Another possible therapy for EBV infection and for lymphoproliferative diseases is the use of proteasome inhibitors, such as PS-1 and PS-2 inhibitors, reversible inhibitors of chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex 20S proteasome, which has shown to prevent NF- κ B factor transcription activation in response to TNF- α and to prevent NF- κ B activation through the blockage of I κ B β decay and I κ B β protein [138]. A recently patented strategy has been the use of peptide homologues (synthetic ITAM analogues) that inhibit the interaction of proteins and immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) of viral proteins. This invention showed that blocking association of the LMP2A ITAM with cellular molecules and blocking LMP2A ITAM-mediated signalling are effective strategies for treatment and prevention of metastases of EBV-induced malignancies. It is stated that this treatment may result in inhibition of BCR-induced proliferation [139].

Another form of treatment, patented by Kempkes [140] is a DNA-binding protein mutant, RBP-J κ , able to bind to the Notch protein but unable to bind to EBNA2, since it presents an aminoacidic sequence with at least one mutation in the EBNA2 binding domain, thus preventing immortalization.

Such as stated by Mei *et al.* [107], a form of therapy that should be developed further is the use of drugs with latent proteins as targets, mainly proteins expressed in tumors, such as LMP1, LMP2A or EBNA1, essential for immortalization, for cell proliferation and for evading immune responses. This may be manifested with the use of small interfering RNA targeting the LMP1 gene, thus reducing LMP1 expression and inducing apoptosis in EBV-infected LCLs. EBV

codifies small RNAs, known as EBERs, which are abundant in infected cells. Using a vector system, based on the EBV promoter that codifies these EBERs, the interference RNA (RNAi) may be used as cytoplasmic or nuclear targets to silence genes and block the different RNAs levels. This new therapy is patented by Jin *et al.* [141].

As regards peptide-based treatments, Kirschner *et al.* [142] have recently created and patented peptide-based compounds (peptides, peptidomimetics, and other small molecules) to inhibit EBV-mediated membrane fusion with epithelial cells, B-cells, or both. The peptides are based on the EBV fusion protein gp42. These may have one or more functional or biological activities associated with gp42. This patent may be formulated for treating and preventing diseases associated with EBV infection, such as acute IM, B-cell lymphomas, other lymphoproliferative diseases associated with EBV.

Another patented treatment is the use of EBNA3C blended with a protein transduction domain (TAT) which may block the proliferation of the infected cell and the overgrowth of the transformed B cell, since this protein, which inhibits the action of EBNA3C induces the degradation of retinoblastoma proteins by inhibiting the translation of EBNA3C mRNA [143]. Morgan *et al.* [144] developed a fusion complex made up of a toxin and a viral antigen as treatment against EBV infection. Toxins used are a protein homologous to subunit B of *E. coli* heat-labile enterotoxin (EtxB) or a *Vibrio cholera* toxin (CtxB), which are able to bind to receptor GM1 of the cell plasmatic membrane and a second protein homologous to a viral antigen expressed in the surface as LMP1 or LMP2, which allow the internalization in the cell and the alteration of the antigen processing pattern of the viral presentation and/or tumor antigens. This patent was developed to be applied in neoplasias.

CONCLUSIONS

Up to now some important achievements have been made to inhibit IM progress, but the same does not hold true for asymptomatic EBV infection, which is the one involved in lymphoproliferative and autoimmune diseases.

The development of an effective prophylactic vaccine needs to bear in mind that neutralizing antibodies on their own or their combination with cell-mediated immune response against a single peptide component does not offer long-lasting sterile immunity against EBV, such as the case with gp350 envelope vaccine. However, the reduction of the viral load may be enough to prevent the development of diseases such as IM or PTLD during the primary infection, in addition to other diseases associated to the virus latent phase, such as autoimmune diseases and other malignant diseases. Thus, the development of vaccines based on stimulating T cell response, mainly CD8+ T cells, requires the aid of virus-specific CD4+ T cells *in vivo* and, therefore, CD4+ T cell stimulation needs to be taken into account when developing a vaccine.

CTL *in vitro* stimulation against proteins expressed in tumors may render this therapy very specific for this type of patients. Thus, this immunotherapy based on epitope-specific CTL clones reactivated and expanded *in vitro*, and the in-

crease in the immune response through the vaccination with epitopes may be very useful against EBV-associated neoplasias. According to the patents developed up till now, the conclusion seems to be that EBNA1, as a promising CD4+ T cell antigen, should be combined with LMP1 and LMP2 for CD8+ T cell stimulation in such a vaccine for both prevention of symptomatic EBV infection as well as immunotherapy against EBV-associated malignancies.

Although the most effective targets to prevent or inhibit EBV infection are genes, we may prevent the development of tumors and other autoimmune diseases associated to B and T cell immortalization, such as MS, by developing gene therapies against genes that are important for cell immortalization and differentiation, such as EBNA1, EBNA2 or LMP1. The development of small interfering RNA targeting this type of genes may also be effective in reducing their expression. Thus, LMP1 or EBNA1 would be of great importance, since it may induce B-cell apoptosis.

For preventing and treating autoimmune diseases, it may also be useful to develop specific antibodies against autoantibodies that by molecular mimicry seems to play an important role in the development of such diseases.

Finally, the ideal strategy would be to develop a vaccine that obtain long-lasting protective immunity by studying the key proteins that contribute to the development of the diseases associated with the virus, contributing both to cellular and tumor immunity.

DECLARATION OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare and no fee has been received for preparation of this manuscript.

REFERENCES

- [1] Bornkamm, G.W.; Hammerschmidt, W. Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.*, **2001**, *356*, 437-459.
- [2] Faulkner, G.C.; Burrows, S.R.; Khanna, R.; Moss, D.J.; Bird, A.G.; Crawford D.H. X-linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implication for the biology of the virus. *J. Virol.*, **1999**, *73*, 1555-1564.
- [3] Young, K.A.; Chen, X.S.; Holers, V.M.; Hannan, J.P. Isolating the Epstein-Barr virus gp350/220 binding site on complement receptor type 2 (CR2/CD21). *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 36614-36625.
- [4] Thorley-Lawson, D.A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, **2001**, *1*, 75-82.
- [5] Babcock, G.J.; Hochberg, D.; Thorley-Lawson, A.D. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes *in vivo* is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity*, **2000**, *13*, 497-506.
- [6] Throley-Lawson, D.A.; Gross, A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.*, **2004**, *350*, 1328-1337.
- [7] Rickinson, A.B.; Moss, D.J. Human cytotoxic T lymphocytes response to Epstein-Barr virus infection. *Ann. Rev. Immunol.*, **1997**, *15*, 405-431.
- [8] Schwarzmann, F.; von Baehr, R.; Jager, M.; Prang, N.; Böhm, S.; Reischl, U.; Wolf, H.; Bieger, W.P. A case of severe chronic active infection with Epstein-Barr virus: Immunologic deficiencies associated with a lytic virus strain. *Clin. Infect. Dis.*, **1999**, *29*, 626-631.
- [9] Kutok, J.L.; Wang, F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, **2006**, *1*, 375-404.
- [10] Middeldorp, J.M.; Brink, A.A.; van der Brule, A.J.; Meijer, C.J. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2003**, *45*, 1-36.

- [11] Niller, H.H.; Wolf, H.; Minarovits, J. Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity*, **2008**, *41*, 298-328.
- [12] Vetsika, E.K.; Callan, M. Infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus. *Expert Rev Mol. Med.*, **2004**, *6*, 1-16.
- [13] Nalesnik, M.A. Clinical and pathological features of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD). *Springer Semin. Immunopathol.*, **1998**, *20*, 325-342.
- [14] Beral, V.; Peterman, T.; Berkelman, R.L.; Jaffe, H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, **1991**, *337*, 805-809.
- [15] Thorley-Lawson, D.A.; Allday, M.J. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2008**, *6*, 913-924.
- [16] Bouffet, E.; Frappaz, D.; Pinkerton, R.; Favrot, M.; Phillip, T. Burkitt's lymphoma: a model for clinical oncology. *Eur. J. Cancer*, **1991**, *27*, 504-509.
- [17] Hjalgrim, H.; Smedby, K.E.; Rostgaard, K.; Molin, D.; Hamilton-Dutoit, S.; Chang, E.T.; Ralfkiaer, E.; Sundström, C.; Adami, H.O.; Glimelius, B.; Melbye, M. Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.*, **2007**, *67*, 2382-2388.
- [18] Zheng, H.; Li, L.L.; Hu, D.S.; Deng, X.Y.; Cao, Y. Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cell Mol. Immunol.*, **2007**, *4*, 185-196.
- [19] Niedobitek, G.; Agathangelou, A.; Rowe, M.; Jones, E.L.; Jones, D.B.; Turyaguma, P.; Orlyema, J.; Wright, D.H.; Young, L.S. Heterogenous expression of Epstein-Barr virus latent protein in endemic Burkitt's lymphoma. *Blood*, **1995**, *86*, 659-665.
- [20] Rickinson, A.; Kieff, E. In: *Fields Virology*, Fields, B.; Knipe, D.; Howley, P. Ed.; Lippincott-Raven: Philadelphia, **2001**; Vol. 1, pp. 2511-2573.
- [21] Brooks, L.; Yao, Q.Y.; Rickinson, A.B.; Young, L.S. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J. Virol.*, **1992**, *66*, 2689-2697.
- [22] Pallesen, G.; Hamilton-Dutoit, S.J.; Rowe, M.; Young, L.S. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumor cells of Hodgkin's disease. *Lancet*, **1991**, *337*, 320-322.
- [23] Deacon, E.M.; Pallesen, G.; Niedobitek, G.; Crocker, J.; Brooks, L.; Rickinson, A.B.; Young, L.S. Epstein-Barr virus and Hodgkin's: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J. Exp. Med.*, **1993**, *177*, 339-349.
- [24] Knowles, D.M. Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. *Mod. Pathol.*, **1999**, *12*, 200-217.
- [25] Young, L.; Alfieri, C.; Hennessy, K.; Evans, H.; O'Hara, C.; Anderson, K.C.; Ritz, J.; Shapiro, R.S.; Rickinson, A.; Kieff, E. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N. Engl. J. Med.*, **1989**, *321*, 1080-1085.
- [26] Thorley-Lawson, D.A.; Gross, A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.*, **2004**, *350*, 1328-1337.
- [27] Steven, N.M.; Leese, A.M.; Annels, N.E.; Lee, S.P.; Rickinson, A.B. Epitope focusing in the primary cytotoxic T-cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T-cell memory. *J. Exp. Med.*, **1996**, *184*, 1801-1813.
- [28] Murray, R.J.; Kurilla, M.G.; Brooks, J.M.; Thomas, W.A.; Rowe, M.; Kieff, E.; Rickinson, A.B. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J. Exp. Med.*, **1992**, *176*, 157-168.
- [29] James, J.A.; Harley, J.B.; Scofield, R.H. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.*, **2006**, *18*, 462-467.
- [30] Sawada, S.; Takei, M. Epstein-Barr virus etiology in rheumatoid synovitis. *Autoimmun. Rev.*, **2005**, *4*, 106-110.
- [31] Lassmann, H. Recent neuropathological findings in MS-implications for diagnosis and therapy. *J. Neurol.*, **2004**, *251*, IV2-IV5.
- [32] Ascherio, A.; Munger, K.L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann. Neurol.*, **2007**, *61*, 288-299.
- [33] Phol, D.; Krone, B.; Rostasy, K.; Kahler, E.; Lehnert, M.; Wagner, H.J.; Gärtner, J.; Hanefeld, F. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology*, **2006**, *67*, 2063-2065.
- [34] Lünemann, J.D.; Huppke, P.; Roberts, S.; Brück, W.; Gärtner, J.; Münz, C. Broadened and elevated humoral immune response to EBNA1 in pediatric multiple sclerosis. *Neurology*, **2008**, *71*, 1033-1035.
- [35] Bray, P.F.; Luka, J.; Bray, P.F.; Culp, K.W.; Schlight, J.P. Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology*, **1992**, *42*, 1798-1804.
- [36] Gran, B.; Hemmer, B.; Vergelli, M.; McFarland, H.F.; Martin, R. Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann. Neurol.*, **1999**, *45*, 559-567.
- [37] Lünemann, J.D.; Jelčić, I.; Roberts, S.; Lutterotti, A.; Tackenberg, B.; Martin, R.; Münz, C. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J. Exp. Med.*, **2008**, *205*, 1763-1773.
- [38] Wucherpfennig, K.W.; Strominger, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*, **1995**, *80*, 695-705.
- [39] Lünemann, J.D.; Edwards, N.; Muraro, P.A.; Hayashi, S.; Cohen, J.I.; Münz, C.; Martin, R. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain*, **2006**, *129*, 1493-1506.
- [40] Van Sechel, A.C.; Bajramovic, J.J.; van Noort, J.M. EBV-induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J. Immunol.*, **1999**, *162*, 129-135.
- [41] Haahr, S.; Munch, M. The association between multiple sclerosis and infection with Epstein-Barr virus and retrovirus. *J. Neurovirol.*, **2000**, *6*, S76-S79.
- [42] Sutkowski, N.; Conrad, B.; Thorley-Lawson, D.A.; Huber, B.T. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunol.*, **2001**, *15*, 579-589.
- [43] Sutkowski, N.; Palkama, T.; Ciurli, C.; Sekaly, R.P.; Thorley-Lawson, D.A.; Huber, B.T. An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J. Exp. Med.*, **1996**, *184*, 971-980.
- [44] McClain, M.T.; Heinlen, L.D.; Dennis, G.J.; Roebuck, J.; Harley, J.B.; James, J.A. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat. Med.*, **2005**, *11*, 85-89.
- [45] Toussirot, E.; Roudier, J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, **2008**, *22*, 883-896.
- [46] Saal, J.G.; Krimmel, M.; Steidle, M.; Gerneth, F.; Wagner, S.; Fritz, P.; Koch, S.; Zacher, J.; Sell, S.; Einsele, H.; Müller, C.A. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis and Rheumatism.*, **1999**, *42*, 1485-1496.
- [47] Balandraud, N.; Meynard, J.B.; Auger, I.; Sovran, H.; Mugnier, B.; Reviron, D.; Roudier, J.; Roudier, C. Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. Accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis and Rheumatism.*, **2003**, *48*, 1223-1228.
- [48] Kilger, E.; Kieser, A.; Baumann, M.; Hammerschmidt, W. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J.*, **1998**, *17*, 1700-1709.
- [49] Chuang, H.C.; Lay, J.D.; Chuang, S.E.; Hsieh, W.C.; Chang, Y.; Su, I.J. Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 down-regulates tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor-1 and confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in T cells: implication for the progression to T-cell lymphoma in EBV-associated hemophagocytic syndrome. *Am. J. Pathol.*, **2007**, *170*, 1607-1617.
- [50] Caldwell, R.G.; Wilson, J.B.; Anderson, S.J.; Longnecker, R. Epstein-Barr virus LMP2a drives B-cell development and survival in the absence of normal B-cell receptor signals. *Immunity*, **1998**, *9*, 405-411.
- [51] Rechsteiner, M.P.; Berger, C.; Zauner, L.; Sigrist, J.A.; Weber, M.; Longnecker, R.; Bernasconi, M.; Nadal, D. Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection. *J. Virol.*, **2008**, *82*, 1739-1747.

- [52] Cordier, M.; Calender, A.; Billaud, M.; Zimmer, U.; Rousset, G.; Pavlish, O.; Banchereau, J.; Tursz, T.; Bornkamm, G.; Lenoir, G.M. Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J. Virol.*, **1990**, *64*, 1002-1013.
- [53] Yalamanchili, R.; Tong, X.; Grossman, S.; Johannsen, E.; Mosialos, G.; Kieff, E. Genetic and biochemical evidence that EBNA 2 interaction with a 63-kDa cellular GTG-binding protein is essential for B lymphocyte growth transformation by EBV. *Virol.*, **1994**, *204*, 634-641.
- [54] Boccellato, F.; Anastasiadou, E.; Rosato, P.; Kempkes, B.; Frati, L.; Faggioni, A.; Trivedi, P. EBNA2 interferes with the germinal center phenotype by downregulating BCL6 and TCL1 in non-Hodgkin's lymphoma cells. *J. Virol.*, **2007**, *81*, 2274-2282.
- [55] McCann, E.M.; Kelly, G.L.; Rickinson, A.B.; Bell, A.I. Genetic analysis of the Epstein-Barr virus-coded leader protein EBNA-LP as a co-activator of EBNA2 function. *J. Gen. Virol.*, **2001**, *82*, 3067-3079.
- [56] Peng, R.; Moses, S.C.; Tan, J.; Kremmer, E.; Ling, P.D. The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *J. Virol.*, **2005**, *79*, 4492-4505.
- [57] Krauer, K.G.; Kienzle, N.; Young, D.B.; Sculley, T.B. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3 and 4 interact with RBP-2N, a major isoform of RBP J kappa in B lymphocytes. *Virol.*, **1996**, *226*, 346-353.
- [58] Johannsen, E.; Miller, C.L.; Grossman, S.R.; Kieff, E. EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J. Virol.*, **1996**, *70*, 4179-4183.
- [59] Waltzer, L.; Perricaudet, M.; Sergeant, A.; Manet, E. Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J. Virol.*, **1996**, *70*, 5909-5915.
- [60] Marshall, D.; Sample, C. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a transcriptional regulator. *J. Virol.*, **1995**, *69*, 3624-3630.
- [61] Chen, A.; Zhao, B.; Kieff, E.; Aster, J.C.; Wang, F. EBNA-3B- and EBNA-3C-regulated cellular genes in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.*, **2006**, *80*, 10139-10150.
- [62] Srinivas, S.; Sixbey, J.W. Epstein-Barr virus induction of recombinase-activating genes RAG1 y 2. *J. Virol.*, **1995**, *69*, 8155-8158.
- [63] Humme, S.; Reisbach, G.; Feederle, R.; Delecluse, H.J.; Bousset, K.; Hammerschmidt, W.; Schepers, A. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *PNAS*, **2003**, *100*, 10989-10994.
- [64] Lotz, M.; Tsoukas, C.D.; Fong, S.; Carson, D.A.; Vaughan, J.H. Regulation of Epstein-Barr virus infection by recombinant interferons. Selected sensitivity to interferon- γ . *Eur. J. Immunol.*, **1985**, *15*, 520-525.
- [65] Hislop, A.D.; Taylor, G.S.; Sauce, D.; Rickinson, A.B. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu. Rev. Immunol.*, **2007**, *25*, 587-617.
- [66] Steven, N.M.; Annel, N.E.; Kumar, A.; Leese, A.M.; Kurilla, M.G.; Rickinson, A.B. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J. Exp. Med.*, **1997**, *185*, 1605-1617.
- [67] Pudney, V.A.; Leese, A.M.; Rickinson, A.B.; Hislop, A. D. CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J. Exp. Med.*, **2005**, *201*, 349-360.
- [68] Precopio, M.L.; Sullivan, J.L.; Willard, C.; Somasundaran, M.; Luzuriaga, K. Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. *J. Immunol.*, **2003**, *170*, 2590-2598.
- [69] Bickham, K.; Munz, C.; Tsang, M.L.; Larsson, M.; Fonteneau, J.F.; Bhardwaj, N.; Steinman, R. EBNA1-specific CD4+ T cells in healthy carriers of Epstein-Barr virus are primarily Th1 in function. *J. Clin. Invest.*, **2001**, *107*, 121-130.
- [70] Leen, A.; Meij, P.; Redchenko, I.; Middeldorp, J.; Bloemena, E.; Rickinson, A.; Blake, N. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4+ T-helper 1 responses. *J. Virol.*, **2001**, *75*, 8649-8659.
- [71] Voo, K.S.; Fu, T.; Heslop, H.E.; Brenner, M.K.; Rooney, C.M.; Wang, R.F. Identification of HLA-DP3-restricted peptides from EBNA1 recognized by CD4+ T cells. *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 7195-7199.
- [72] Rowe, M.; Glaunsinger, B.; van Leeuwen, D.; Zuo, J.; Sweetman, D.; Ganem, D.; Middeldorp, J.; Wiertz, E.J.; Rensing, M.E. Host shutoff during productive Epstein-Barr virus infection is mediated by BGLF5 and may contribute to immune evasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 3366-3371.
- [73] Morrison, T.E.; Mauser, A.; Wong, A.; Ting, J.P.; Kenney, S.C. Inhibition of IFN-gamma signalling by an Epstein-Barr virus immediate early protein. *Immunity*, **2001**, *15*, 787-789.
- [74] Moore, K.W.; Vieira, P.; Fiorentino, D.F.; Trounstein, M.L.; Khan, T.A.; Mosmann T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*, **1990**, *248*, 1230-1234.
- [75] Strockbine, L.D.; Cohen, J.I.; Farrah, T.; Lymann, S.D.; Wagener, F.; DuBose, R.F.; Armitage, R.J.; Spriggs, M.K. The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J. Virol.*, **1998**, *72*, 4015-4021.
- [76] Desbien, A.L.; Kappler, J.W.; Marrack, P. The Epstein-Barr virus Bcl-2 homolog, BHRF1, blocks apoptosis by binding to a limited amount of Bim. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 5663-5668.
- [77] Henderson, S.; Huen, D.; Rowe, M.; Dawson, C.; Croom-Carter, D.; Rowe, M. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2 protects human B-cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 8479-8483.
- [78] Uchida, J.; Yasui, T.; Takaoka-Shichijo, Y.; Muraoka, M.; Kulwichit, W.; Raab-Traub, N.; Kikutani, H. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*, **1999**, *286*, 300-303.
- [79] Levitskaya, J.; Sharipo, A.; Leonchiks, A.; Ciechanover, A.; Matusci, M.G. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 12616-12621.
- [80] Ohga, S.; Nomura, A.; Takada, H.; Hara, T. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2002**, *44*, 203-215.
- [81] Ruf, I.K.; Lackey, K.A.; Warudkar, S.; Sample, J.T. Protection from interferon-induced apoptosis by Epstein-Barr virus small RNAs is not mediated by inhibition of PKR. *J. Virol.*, **2005**, *79*, 14562-14569.
- [82] Moutschen, M.; Léonard, P.; Sokal, E.M.; Smets, F.; Haumont, M.; Mazza, P.; Bollen, A.; Denamur, F.; Peeters, P.; Dubin, G.; Denis, M. Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein-Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine*, **2007**, *25*, 4697-4705.
- [83] Sokal, E.M.; Hoppenbrouwers, K.; Vandermeulen, C.; Moutschen, M.; Léonard, P.; Moreels, A.; Haumont, M.; Bollen, A.; Smets, F.; Denis, M. Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J. Infect. Dis.*, **2007**, *196*, 1749-1753.
- [84] Thacker, E.L.; Mirzaei, F.; Ascherio, A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann. Neurol.*, **2006**, *59*, 499-503.
- [85] Elliott, S.L.; Suhrbier, A.; Miles, J.J.; Lawrence, G.; Pye, S. J.; Le, T.T.; Rosenstengel, A.; Nguyen, T.; Allworth, A.; Burrows, S.R.; Cox, J.; Pye, D.; Moss, D.J.; Bhardwaj, M. Phase I trial of a CD8+ T-cell peptide epitope-based vaccine for infectious mononucleosis. *J. Virol.*, **2008**, *82*, 1448-1457.
- [86] Khanna, R.; Burrows, S.R.; Thomson, S.A.; Moss, D.J.; Cresswell, P.; Poulsen, L.M.; Cooper, L. Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognised efficiently by CD4+ EBV specific CTLs. *J. Immunol.*, **1997**, *158*, 3619-3625.
- [87] Nikiforow, S.; Bottomly, K.; Miller, G.; Münz, C. Cytolytic CD4+ T-cell clones reactive to EBNA1 inhibit Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation. *J. Virol.*, **2003**, *77*, 12088-12104.
- [88] Subklewe, M.; Sebelin, K.; Block, A.; Meier, A.; Roukens, A.; Paludan, C.; Fonteneau, J.F.; Steinman, R.M.; Münz, C. Dendritic cells expand Epstein Barr virus specific CD8+ T cell responses more efficiently than EBV transformed B cells. *Hum. Immunol.*, **2005**, *66*, 938-949.

- [89] Bickham, K.; Goodman, K.; Paludan, C.; Nikiforow, S.; Tsang, M.L.; Steinman, R.M.; Münz, C. Dendritic cells initiate immune control of Epstein-Barr virus transformation of B lymphocytes in vitro. *J. Exp. Med.*, **2003**, *198*, 1653-1663.
- [90] Pan, S.H.; Tai, C.C.; Lin, C.S.; Hsu, W.B.; Chou, S.F.; Lai, C.C.; Chen, J.Y.; Tien, H.F.; Lee, F.Y.; Wang, W.B. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 disrupts mitotic checkpoint and causes chromosomal instability. *Carcinogenesis*, **2009**, *30*, 366-375.
- [91] Leen, A.; Meij, P.; Redchenko, I.; Middeldorp, J.; Bloemena, E.; Rickinson, A.; Blake, N. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4⁺ T-helper 1 responses. *J. Virol.*, **2001**, *75*, 8649-8659.
- [92] Lycke, J.; Svennerholm, B.; Hjelmquist, E.; Frisé, L.; Badr, G.; Andersson, M.; Vahlne, A.; Andersen, O. Acyclovir treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *J. Neurol.*, **1996**, *243*, 214-224.
- [93] Bech, E.; Lycke, J.; Gadeberg, P.; Hansen, H.J.; Malmström, C.; Anderson, O.; Christensen, T.; Ekholm, S.; Haahr, S.; Höllsberg, P.; Bergström, T.; Svennerholm, B.; Jakobsen, J. A randomized, double-blind placebo-controlled MRI study of anti-herpes virus therapy in MS. *Neurology*, **2002**, *58*, 31-36.
- [94] Hierro, L.; Díez-Dorado, R.; Díaz, C.; De la Vega, A.; Frauca, E.; Camarena, C.; Muñoz-Bartolo, G.; González de Zárate, A.; López Santamaría, M.; Jara, P. Efficacy and safety of valganciclovir in liver-transplanted children infected with Epstein-Barr virus. *Liver Transpl.*, **2008**, *14*, 1185-1193.
- [95] Funch, D.P.; Walkeer, A.M.; Schneider, G.; Zivadeh, N.J.; Pescovitz, M.D. Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.*, **2005**, *5*, 2894-2900.
- [96] Moore, S.M.; Cannon, J.S.; Tanhehco, Y.C.; Hamzeh, F.M.; Ambinder, R.F. Induction of Epstein-Barr virus kinases to sensitize tumor cells to nucleoside analogues. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **2001**, *45*, 2082-2091.
- [97] Westphal, E.M.; Blackstock, W.; Feng, W.; Israel, B.; Kenney, S.C. Activation of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection by radiation and sodium butyrate in vitro and in vivo: a potential method for treating EBV-positive malignancies. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 5781-5788.
- [98] Faller, D.V.; Mentzer, S.J.; Perrine, S.P. Induction of the Epstein-Barr virus thymidine kinase gene with concomitant nucleoside antivirals as a therapeutic strategy for Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Curr. Opin. Oncol.*, **2001**, *13*, 360-367.
- [99] Hauser, S.L.; Waubant, E.; Arnold, D.L.; Vollmer, T.; Antel, J.; Fox, R.J.; Bar-Or, A.; Panzara, M.; Sarkar, N.; Agarwal, S.; Smith, C.H. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **2008**, *358*, 676-688.
- [100] Papadopoulos, E.B.; Ladanyi, M.; Emanuel, D.; Mackinnon, S.; Boulad, F.; Carabasi, M.H.; Castro-Malaspina, H.; Childs, B.H.; Gillio, A.P.; Small, T.N. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*, **1994**, *330*, 1185-1191.
- [101] Rooney, C.M.; Roskrow, M.A.; Smith, C.A.; Brenner, M.K.; Heslop, H.E. Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated cancers. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **1998**, *23*, 89-93.
- [102] Hopwood, P.; Crawford, D.H. The role of EBV in post-transplant malignancies: a review. *J. Clin. Pathol.*, **2000**, *53*, 248-254.
- [103] Münz, C.; Bickham, K.L.; Subklewe, M.; Tsang, M.L.; Chahroudi, A.; Kurilla, M.G.; Zhang, D.; O'Donnell, M.; Steinman, R.M. Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J. Exp. Med.*, **2000**, *191*, 1649-1660.
- [104] Franken, M.; Estabrooks, A.; Cavacini, L.; Sherburne, B.; Wang, F.; Scadden, D.T. Epstein-Barr virus-driven gene therapy for EBV-related lymphomas. *Nat. Med.*, **1996**, *2*, 1379-1382.
- [105] Duraiswamy, J.; Bharadwaj, M.; Tellam, J.; Connolly, G.; Cooper, L.; Moss, D.; Thomson, S.; Yotnda, P.; Khanna, R. Induction of therapeutic T-cell responses to subdominant tumor-associated viral oncogene after immunization with replication-incompetent polyepitope adenovirus vaccine. *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 1483-1489.
- [106] Duraiswamy, J.; Sherritt, M.; Thomson, S.; Tellam, J.; Cooper, L.; Connolly, G.; Bharadwaj, M.; Khanna, R. Therapeutic LMP1 polyepitope vaccine for EBV-associated Hodgkin disease and nasopharyngeal carcinoma. *Blood* **2003**, *101*, 3150-3156.
- [107] Mei, Y.P.; Zhu, X.F.; Zhou, J.M.; Huang, H.; Deng, R.; Zeng, Y.X. siRNA targeting LMP1-induced apoptosis in EBV-positive lymphoma cells is associated with inhibition of telomerase activity and expression. *Cancer Lett.*, **2006**, *232*, 189-198.

PATENTS

- [108] Spaete, R.; Winthrop, J. Non-splicing variants of gp350/220. US2007202122, 2007.
- [109] Denis MJ. Novel vaccination. WO03094962, 2003.
- [110] Middeldorp, J.M. Epstein-Barr virus peptide and antibody against peptide thereof. WO9406912, 2008.
- [111] Frappier, L.; Holowaty, M.; Greenblatt, J.; Zeghouf, M. Novel interactions of the Epstein-Barr virus protein EBNA1, and compositions and methods related thereto. WO2004007536, 2004.
- [112] Celis, E. Epstein-Barr virus-specific immunization. US2006257356, 2006.
- [113] Smith, R.S.; Pearson, G.R.; Parks, D.E.; Varghese, S.P. Immunoreactive peptides from Epstein-barr virus. US2008175849, 2008.
- [114] Hickish, T.; Cunningham, D. Antiviral agent comprising antisense oligonucleotides complementary to the BHRF1 gene of Epstein-Barr virus. WO9311267, 1993.
- [115] Foley, M.; Casey, J.L.; Coley, A.M.; Devine, P.L. Mimotopes of Epstein-barr virus (EBV) epitopes. WO2007022557, 2007.
- [116] Thomson, S.A.; Duraiswamy, J.K.; Moss, D.J. Treatment of Epstein-Barr virus-associated diseases. WO2007065215, 2008.
- [117] Middeldorp, J.M.; Van Grunsven, W.M.J. Peptides and nucleic acid sequences related to the Epstein Barr virus. US6365717, 2002.
- [118] Middeldorp, J.M. Method for the identification of extracellular domains of the Epstein barr virus (EBV), tumor-associated latent membrane proteins and for the selection of antibody reagents reactive therewith. AU2002235884, 2002.
- [119] Caligiuri, M.A.; Baiocchi, R.A. Viral gene products and methods for vaccination to prevent viral associated diseases. WO2007097820, 2007.
- [120] Harley, J.B.; James, J.A.; Kaufman, K.M. Diagnostics and therapy of Epstein-Barr virus in autoimmune disorders. WO158481, 2007.
- [121] Huber, B.T.; Thorley-Lawson, D.A.; Sutkowski, N. Treatment and prevention of EBV infection and EBV-associated disorders. WO247720, 2002.
- [122] Khanna, R.; Kerr, B.M.; Misko, I.S.; Moss, D.J.; Burrows, S.R. EBV CTL epitopes. WO9745444, 2008.
- [123] Khanna, R.; Duraiswamy, J. Epstein Barr virus peptide epitopes, polyepitopes and delivery system therefore. WO2004041849, 2004.
- [124] Burrows, S.; Khanna, R. CTL epitopes from EBV. WO9902550, 2009.
- [125] Pancre, V.; Aurialt, C. T CD4+ Epitopes of Type I and II Latency Antigens of the Epstein-Barr Virus, Which Can Be Recognized by the majority of individuals in the caucasian populations and applications thereof. US2009130134, 2009.
- [126] Steinman, R.M.; Muenz, C. Protective antigen of Epstein-Barr virus. WO0112215, 2008.
- [127] Kuzushima, K.; Ito, Y.; Okamura, A.; Akatsuma, Y.; Morishima, Y. Citotoxic T-cell epitope peptide capable of specifically attacking cell infected with Epstein-Barr virus and use thereof. WO2007049737, 2007.
- [128] Zeng, Y.Z. Ad5F35-LMP2 recombinant adenovirus vaccine comprising Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 gene. CN1907493, 2007.
- [129] Liu, F.F.; Klamut, H.J.; Chia, M.; Li, J.H. Nucleic acids and methods for treating EBV-positive cancers. WO03047634, 2003.
- [130] Silverstein, S.J.; Kyratsous, C. Methods of inhibiting VZV replication and related compositions. WO2009014759, 2009.
- [131] Hostetler, K.; Kini, G.; Beadle, J.R. Phosphonate ester antiviral compounds. WO9838202, 2008.
- [132] Chu, C.K.; Cheng, Y.C.; Pai, B.S.; Yao, G. Q. L-Nucleosides for the treatment of hepatitis B-virus and Epstein-Barr virus. WO9520595, 2006.
- [133] Cohen, J.I.; Pesnicak, L.; Katano, H. Use of statin to kill EBV-transformed B cells. WO2005042710, 2005.
- [134] Kodama, E.; Matsuoka, M.; Ashida, N. Medicinal agent for disease associated with Epstein-barr virus, and method for screening of the medicinal agent. WO2009034945, 2009.

- [135] Schinazi, R.F.; Shi, J.; Gustafson, E.; Fingerth, J.D. Treatment of EBV and KHSV infection and associated abnormal cellular proliferation. US2007197462, 2007.
- [136] Perrine, S.P.; Faller, D.V.; White, B.F. Use of an inducing agent for the treatment of blood, viral and cellular disorders. EP1886677, 2008.
- [137] Steinman, R.M.; Muenz, C. Protective antigen of epstein barr virus. US2006188520, 2006.
- [138] Proesch, S.; Volk, H.D.; Krueger, D. Proteasome inhibitors for the treatment of herpesviridae infected individuals. WO2004004749, 2007.
- [139] Monroe, J.G.; Katz, E.; Murali, R. Methods and compositions targeting viral and cellular ITAM motifs, and use of same in identifying compounds with therapeutic activity. US2007110760, 2007.
- [140] Kempkes, B. Novel targets for a therapeutic intervention in EBV related diseases. WO02098918, 2002.
- [141] Jin, D.Y.; Choy, E.; Kok, K.H. Promoters for RNA interference. US2007202082, 2007.
- [142] Kirschner, A.N.; Omerovic, J.; Longnecker, R.; Jardetzky, T.S. Peptides, peptidomimetics and small molecule inhibitors of the Epstein-Barr virus mediated fusion and entry process. US2009074719, 2009.
- [143] Robertson, E.S. An EBV inhibitor and methods of making an using the same. WO2008005506, 2008.
- [144] Morgan, A.J.; Wilson, A.D.; Wong, K.W. Therapeutic agent comprising a B-subunit of a protein toxin in conjunction with EBV latent membrane protein useful for the treatment of diseases associated with the Epstein Barr Virus and neoplasias WO0247727, 2005.