



Sociedad Neurológica Argentina
Filial de la Federación Mundial
de Neurología

Neurología Argentina

www.elsevier.es/neurolarg



CrossMark

Artículo original

Relación de infección por virus de Epstein-Barr (EBV) en pacientes con esclerosis múltiple (EM), en México

Victor Bermudez-Morales^a, Carlos Hernández-Girón^{b,*}, José Flores^c,
Adolfo González-Carranza^a, Vicente Madrid Marina^c,
Mario Flores-Aldana^d y Teresa Corona^c

^a Profesor Investigador, Centro de Investigación sobre enfermedades infecciosas (CISEI), Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México

^b Profesor Investigador, Centro de Investigación en Salud Poblacional (CISP), Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México

^c Médico, Laboratorio clínico de Enfermedades neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México D.F., México

^d Profesor Investigador, Centro de Investigación en Nutrición y salud (CINys), Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 16 de diciembre de 2015

Aceptado el 29 de enero de 2016

On-line el 4 de abril de 2016

Palabras clave:

Esclerosis múltiple

Virus Epstein Barr

Carga viral

R E S U M E N

Introducción: La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante, crónica que condiciona discapacidad no traumática en adultos jóvenes, y afecta principalmente a mujeres (3:1). El objetivo del presente estudio fue analizar la posible asociación entre la infección de VEB y la EM en pacientes mexicanos.

Métodos: Este análisis incluyó un estudio epidemiológico, donde se consideró una muestra de 141 casos y 189 controles, pareados por edad y sexo, colectados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en la ciudad de México en los últimos 5 años. Para el proceso de purificación de ADN total a partir de muestras de sueros de pacientes con EM, se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, 51106). La detección del genoma del VEB se realizó por PCR en tiempo real con el kit de cuantificación del virus herpes humano tipo 4, Epstein-Barr (Genesig).

Resultados: Se analizó información de un total de 330 sujetos, correspondiendo 141 a casos y 189 a controles sanos. El promedio de edad fue de 33 y 32 años para casos y controles respectivamente; aproximadamente el 68% en los casos (96/141) y controles (130/189) correspondió al sexo femenino. El VEB se detectó en 3 de las 189 muestras de los controles (1,5%) con CT de (31,36; 31,11; 32,89) y en 2 muestras de los 141 casos EM (2/141; 1,3%) con CT de (33,21; 34,05).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: chernand@insp.mx (C. Hernández-Girón).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2016.01.007>

1853-0028/© 2016 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Conclusión: En este estudio de casos y controles no encontramos diferencia en la presencia de ADN de VEB (en pacientes con EM).

© 2016 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Lack of association between Epstein-Barr virus DNA detection in serum and multiple sclerosis in the Mexican population

A B S T R A C T

Keywords:

Multiple sclerosis

Epstein-Barr virus

Viral load

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory, chronic demyelinating disease that causes non-traumatic disability in young adults, and affects mainly women (M:F 3:1). The aim of the present study was to analyze the potential association between the EBV infection and MS in Mexican patients.

Methods: This analysis included an epidemiological study, with a sample of 141 cases and 189 controls matched by age and sex, collected at the National Institute of Neurology and Neurosurgery in Mexico City in last 5 years. To purify total DNA from MS patient serum samples, we used the commercial kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, 51106). The detection of the EBV genome was made by real-time PCR with the quantification kit for type 4 human herpes, Epstein-Barr (Genesig).

Results: We analyzed the information of a total of 330 individuals, with 141 cases and 189 healthy controls. The mean age was 33 and 32 years for cases and controls, respectively; approximately 68% of the cases (96/141) and controls (130/189) were women. The EBV was detected in 3 of 189 controls (1.5%) by Cts of (31.36, 31.11, 32.89) and in 2 of 141 MS patients (2/141, 1.3%).

Conclusion: In the present cases-and-controls study, we did not find any difference in terms of the detection of DNA of EBV [in MS patients].

© 2016 Sociedad Neurológica Argentina. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante, crónica del sistema nervioso central, afecta principalmente a adultos jóvenes con mayor frecuencia a mujeres que a hombres (3:1), y es la principal causa de discapacidad no traumática en este grupo etario. En el mundo se estima que la enfermedad afecta a 2,5 millones de personas^{1,2}.

Con relación a aspectos epidemiológicos, en EE. UU. actualmente la EM afecta a 350.000 personas. En México, la incidencia de la enfermedad no ha sido completamente determinada, sin embargo, la prevalencia ha cambiado: en los años 70 se determinaron menos de 2 casos por 100.000 habitantes y actualmente se establece en un rango entre 13-15/100.000 habitantes, lo que sitúa a México como un país de baja prevalencia^{3,4}.

Referente a aspectos clínicos, la etiología de la EM es desconocida, pero es referida como la aparición de lesiones desmielinizantes, neurodegenerativas, crónicas del sistema nervioso central y periférico. La EM es acompañada de desórdenes de la respuesta inmune que dependen del reclutamiento de linfocitos T reactivos al sistema nervioso central, por lo cual es considerada como una enfermedad autoinmune⁵. Por otra parte, los estudios epidemiológicos han implicado a agentes infecciosos como posibles factores asociados a la EM, como la

vulnerabilidad inmunológica durante la infancia y que posteriormente favorece el desarrollo de la enfermedad^{3,6,7}.

Particularmente, las infecciones de parotiditis, sarampión y virus de Epstein Barr (VEB) aumentan el riesgo del desarrollo de la EM. Hay una mayor correlación entre el VEB con la EM cuando existe una infección primaria durante la adolescencia o la adultez temprana.

Este estudio explora la posible asociación entre la infección de VEB y la EM en una muestra obtenida de pacientes con EM captados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) durante 2010 y 2012.

Métodos

El proyecto estuvo anidado al proyecto madre titulado *Factores de riesgo asociados a la esclerosis múltiple en México: estudio multicéntrico*, el cual es un estudio epidemiológico transversal, en donde se consideraron 300 casos confirmados de EM, y por cada caso se seleccionó a 2 controles, pareado por edad y sexo con respecto a los casos; estos fueron colectados en el INNN en la ciudad de México en los últimos 5 años (Conacyt: Salud 2008 CO1-87366). Para el presente estudio se consideró un submuestra de 141 casos y 189 controles recolectados en el primer año del estudio madre, considerando los mismos parámetros de selección.

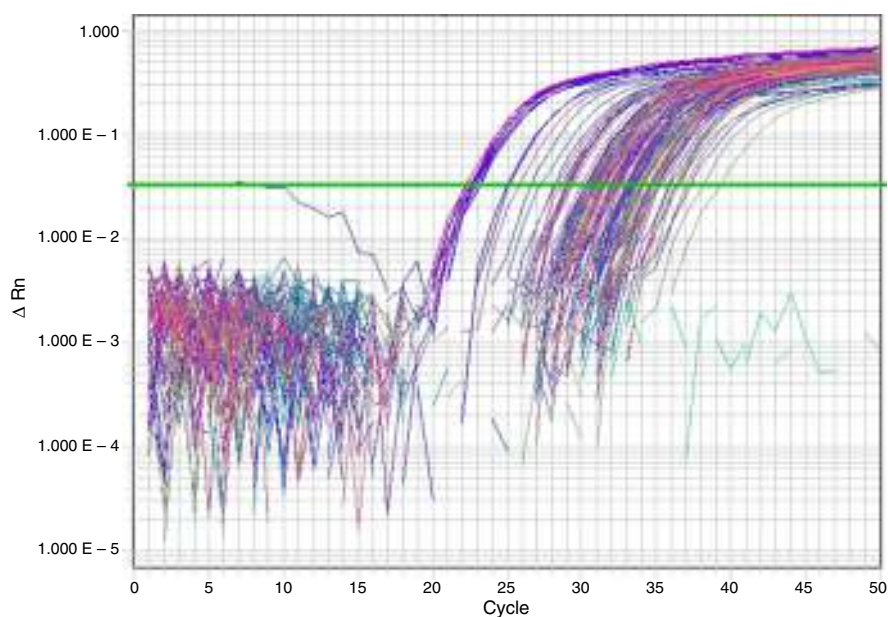


Figura 1 – Curva de amplificación del gen endógeno β -actina, en pacientes con EM. Hospital Nacional de Neurología. México D.F. 2012.

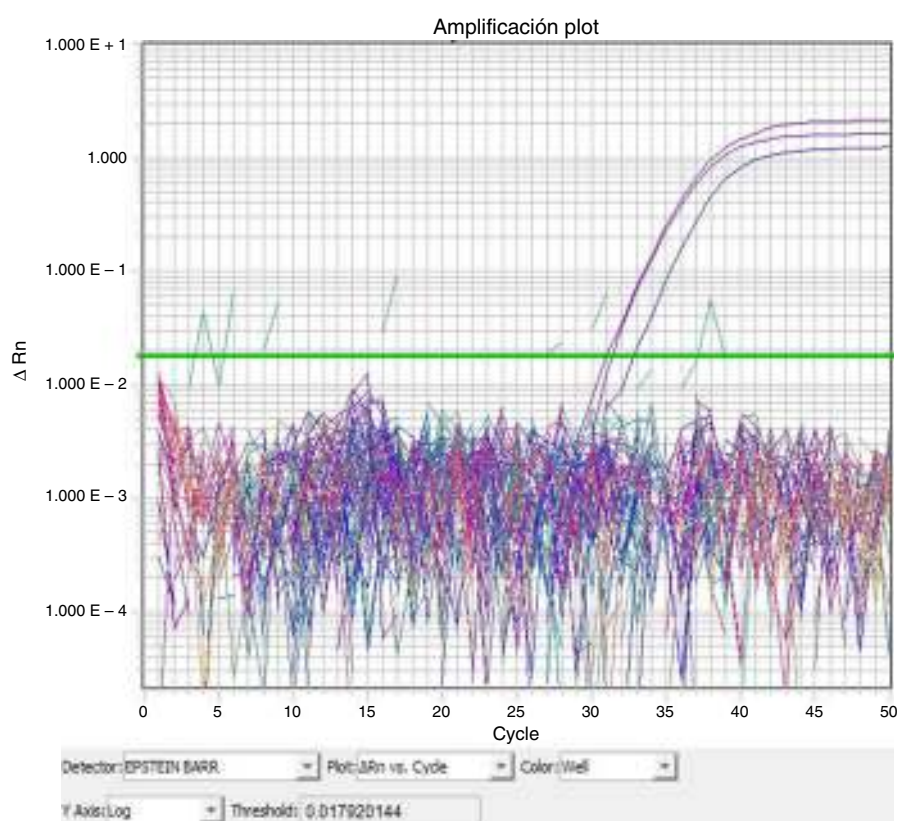


Figura 2 – Curva de amplificación de virus Epstein-Barr en controles. Hospital Nacional de Neurología. México D.F. 2012.

Tabla 1 – Escala de discapacidad (EDSS), según tipo de esclerosis múltiple, en pacientes con esclerosis múltiple. Hospital Nacional de Neurología. México D.F. 2012

Escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) ^a					
Tipo de esclerosis múltiple	0 (0/1,5 pts)	1 (2/3,5 pts)	2 (4/5,5 pts)	3 (6/8 pts)	Total
Brote remisión	31	52	15	22	120
Primaria progresiva	1	1	0	4	6
Secundaria progresiva	1	3	1	8	13
Total	33	56	16	34	139

^a Escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS). De 0 (ausencia de discapacidad) hasta 10 (muerte relacionada con esclerosis múltiple).
Fuente: Proyecto: Factores de riesgo para Esclerosis múltiple en México: INNN-INSP. 2012.

La definición de caso de EM fue aquel paciente que cumpliera con los criterios de McDonald (2001), en la consulta externa de la clínica de enfermedades desmielinizantes del INNN⁸.

La definición de control se aplicó para los familiares de otros pacientes que acudieron al hospital y se les invitó a participar en el estudio (control poblacional). Ambos grupos (casos y controles) firmaron la carta de consentimiento informado; adicionalmente se les tomó una muestra sanguínea para posteriormente obtener suero total y generar un banco de sueros.

Para la detección del VEB se purificó ADN total a partir de muestras de sueros de pacientes con EM, se utilizó el kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, 51106), siguiendo los pasos del protocolo. La cuantificación de las alícuotas obtenidas de ADN se hizo mediante nanodrop lite (Thermoscientific), para formar una base de datos con las concentraciones obtenidas de ADN total⁹. Posteriormente la detección del genoma del VEB en ADN total, obtenido de sueros de pacientes con EM y controles, se realizó por PCR en tiempo real con el kit de cuantificación del virus herpes humano tipo 4, Epstein-Barr (Genesig). La reacción de PCR se llevó a cabo en un equipo ABI-PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Previamente se preparó una placa maestra de 96 pozos conteniendo el ADN obtenido de los pacientes a una concentración de 5 ng/μl, a partir de la cual se tomó el ADN total para realizar la detección del gen de β-actina y del genoma del VEB¹⁰.

Las reacciones de PCR tiempo real se llevaron a cabo usando 1 μl de cada dilución, 5 μl de Faststart universal probe Master mix (Roche), 0,5 μl de mezcla de oligos específicos y sondas Taqman para la amplificación del VEB y ajustadas a un volumen de 10 μl con agua. Las mezclas de reacción se colocaron en placas de 96 pozos y se taparon con un film óptico. Las reacciones se realizaron con el equipo ABI-PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los parámetros de amplificación fueron: 95 °C durante 15 min, seguido de 50 ciclos, 95 °C durante 10 seg y 60 °C durante 1 min para cada terminación. Para el análisis de la carga viral, se realizó una regresión lineal logarítmica, graficando los valores del número de copias de cada dilución (eje de las X) y los valores de CT (Cycle Threshold) de cada dilución (eje de las Y).

Se realizó una prueba estadística no paramétrica (Mann-Whitney) para establecer si hubo una asociación entre el VEB y EM, en una submuestra de pacientes mexicanos

Tabla 2 – Características de historia familiar de esclerosis múltiple, en pacientes con esclerosis múltiple del Instituto Nacional de Neurología. México D.F. 2012

Enfermedad	Número	%
Esclerosis múltiple	2	1,4
Artritis reumatoide	5	3,5
Lupus	3	2,1
Diabetes mellitus	90	63,8
Epilepsia	8	5,6
Enfermedad de Parkinson	4	2,8
Otras enfermedades neurológicas	14	10
Esquizofrenia	6	4,2
Asma	6	4,2

Fuente: Proyecto: Factores de riesgo para Esclerosis múltiple en México: INNN-INSP. 2012.

con EM y controles sanos. Para ello se utilizó el programa estadístico Stata versión 9.0¹¹.

Resultados

Se analizó información de un total de 330 sujetos, 141 casos y 189 controles. El promedio de edad fue de 33 y 32 años respectivamente; aproximadamente el 68% en los casos (96/141) y controles (130/189) correspondió a sexo femenino. De acuerdo a las variables sociodemográficas no detectamos diferencias estadísticamente significativas. De los casos, el 85% correspondieron a un fenotipo brote remisión, el 9,2% a un fenotipo secundariamente progresivo y el 4,2% a un fenotipo primario progresivo (tabla 1).

Referente a los antecedentes familiares, el 63,8% de los casos refirió algún familiar con diabetes mellitus, y el 20,5% con algún tipo de alergia (tabla 2). La mayoría de los pacientes cumplieron con estudios paraclínicos complementarios, para confirmar el diagnóstico: resonancia magnética al 97% y estudios de bandas oligoclonales (BOC) al 62% (tabla 3).

Del total de casos con fenotipo brote remisión (120), el 69% tuvo un grado de discapacidad menor a 3,5 puntos de acuerdo a escala de discapacidad (escala ampliada del estado de discapacidad EDSS)¹².

El VEB se detectó en 3 de las 189 muestras de los controles (1,5%) con CT de (31,36; 31,11; 32,89) y en 2 muestras de los 141 casos EM (2/141; 1,3%) con CT de (33,21; 34,05). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa (valor de p = 0,8882).

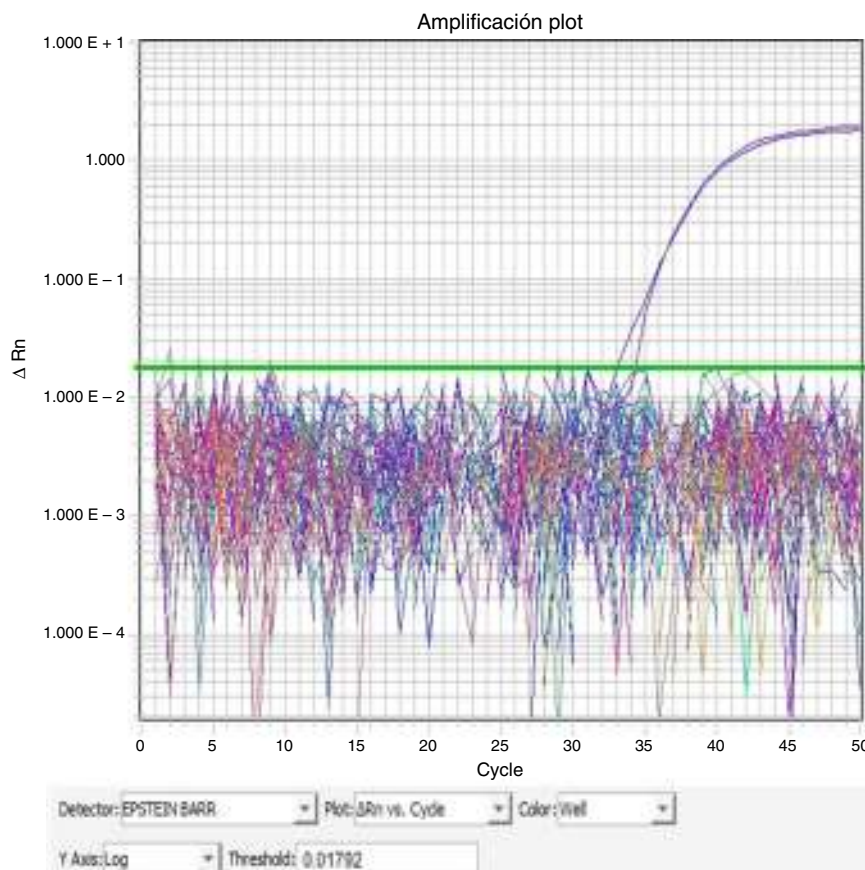


Figura 3 – Curva de amplificación de virus Epstein-Barr en casos de pacientes con EM. Hospital Nacional de Neurología. México D.F. 2012.

La carga viral se determinó a partir de una curva estándar de un control positivo al VEB: 200.000, 20.000, 2.000, 200, 20 y 2 copias. Las diluciones seriadas se amplificaron generando valores de CT para el cálculo de la carga viral (fig. 1).

Para las 3 muestras de los controles que fueron positivos al VEB, con CT de 31,11; 31,36 y 32,89, la carga viral calculada, usando de referencia el modelo de regresión lineal, corresponde a 21, 17 y 6 copias de VEB respectivamente y con una media de 14,6 copias. Para los casos, se detectaron 2 muestras positivas con CT de 33,21 y 34,05, que corresponden a 5 y 3 copias del VEB respectivamente y con una media de 4 copias (figs. 2 y 3).

Discusión

La EM se considera una enfermedad compleja del sistema nervioso central que incluye aspectos inmunológicos, inflamatorios, genéticos, clínicos, que tiene un curso crónico progresivo con la consecuente discapacidad neurológica en pacientes adultos jóvenes^{8,13}.

En este estudio se encontró que el 85% de los casos correspondía a patrón clínico remitente recurrente. Otro estudio en México reportó un patrón similar. Velázquez - Quintana et al. reportaron que el patrón clínico de 337 casos estudiados fue remitente recurrente en un 48%. Esta diferencia es probable

consecuencia de un sesgo de selección; nuestra frecuencia es similar a lo reportado en otras series¹⁴.

Nuestro estudio reporta una relación 1:3 hombre:mujer, similar a lo encontrado en otros estudios¹⁵⁻¹⁷.

La asociación entre el VEB y EM es probablemente un fenómeno inmunológico, sin embargo, también se ha considerado en otros estudios parte de un contexto multifactorial etiológico¹⁸.

Las primeras evidencias del papel que tiene el VEB en la patogénesis de la EM datan de la década de los 70¹⁹⁻²¹. Desde entonces, se han sumado mayor número de estudios que demuestran una mayor frecuencia en la seropositividad para VEB en pacientes con EM^{22,23}. La evidencia epidemiológica muestra que la infección por VEB es un factor de riesgo para el desarrollo posterior de EM en sujetos genéticamente susceptibles²⁴ y el antecedente de la mononucleosis infecciosa que se asocia con el VEB, en edades tempranas, también incrementa el riesgo²⁵⁻²⁷.

Cabe mencionar que a pesar de que el VEB es un virus ampliamente distribuido en México, no existen datos contundentes sobre el porcentaje de individuos serológicamente positivos. Solo 2 estudios refieren que los pacientes provienen de medio socioeconómico bajo y esto probablemente correlaciona con la alta probabilidad de exposición al VEB en edad temprana. Y de aquí la necesidad de conocer la influencia de este virus en diferentes poblaciones²⁸.

Tabla 3 – Características clínicas en pacientes con esclerosis múltiple del Instituto nacional de Neurología. México D.F. 2012

Antecedentes personales	Número	%
<i>¿Ha tenido algún tipo de alergia?</i>		
Sí	29	20,5
No	112	79,5
<i>Enfermedades autoinmunes diagnosticadas previamente</i>		
Enfermedad de tiroides	1	0,7
Neuropatía	1	0,7
Hipertensión arterial	3	2,1
Enfermedad hepática	2	1,4
Migraña	6	4,2
Úlcera gástrica	5	3,5
Colitis	3	2,1
<i>Se realizó estudio de resonancia magnética</i>		
Sí	137	97
No	4	3
<i>Se realizó estudio de punción lumbar</i>		
Sí	122	86
No	19	14
<i>Se realizó estudio de bandas oligoclonales (líquido cefalorraquídeo)</i>		
Sí	88	78,8
No	18	12,7
No sabe	12	8,5
<i>Resultado de estudio de bandas oligoclonales (líquido cefalorraquídeo)</i>		
Positivo	62	44
Negativo	21	14,9
No sabe	5	3,5
Sin información	53	37,6
<i>Se realizó estudio de anticuerpos contra mielina (líquido cefalorraquídeo)</i>		
Sí	18	12,7
No	77	54,6
No sabe	39	7,6
<i>Resultado de anticuerpos contra mielina</i>		
Positivo	8	5,6
Negativo	10	7
Sin información	123	87,2
<i>Tipo de diagnóstico de esclerosis múltiple</i>		
Brote remisión	120	85,8
Primaria progresiva	6	4,2
Secundaria progresiva	13	9,2
Indeterminado	2	1,4
<i>Número de brotes previos al diagnóstico</i>		
1	30	21,2
2	16	11,3
3	11	7,8
4	8	5,6
5 y más	8	5,6

Fuente: Proyecto: Factores de riesgo para Esclerosis múltiple en México: INNN-INSP. 2012.

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

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Proyecto apoyado por financiamiento Conacyt n.º Salud 2008 CO1-8736.

BIBLIOGRAFÍA

- Owens G, Gilden D, Burgoon M, Yu X, Bennett J. Viruses and multiple sclerosis. *Neuroscientist*. 2011;17:659-76.
- Hilas O, Patel P, Lam S. Disease modifying agents for multiple sclerosis. *Open Neurol J*. 2010;4:15-24.
- Welsh C, Steelman A, Mi W, Young C, Dean D, Storts R, et al. Effects of stress on the immune response to Theiler's virus—Implications for virus induced autoimmunity. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17:169-72.
- Alter M, Olivares L. Multiple sclerosis in Mexico. An epidemiologic study. *Arch Neurol*. 1970;23:451-9.
- En: Ader R, Felten D, Cohen N, editors. *Psychoneuroimmunology*, 2, 3th ed New York: Academic Press USA; 2001. p. 433.
- Libbey J, Fujinami R. Potential triggers of MS. *Results Probl Cell Differ*. 2010;51:21-42.
- Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, Stephens D, Banwell B. Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA*. 2004;291:1875-9.
- McDonald I, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis, 2001. *Ann Neurol*. 2001;50:121-7.
- QIAamp DNA mini and blood mini handbook, noviembre 2007, 2.ª ed.
- Sequence detection system (applied biosystems). Epstein-Barr (Genesig). USA, 2014.
- Stata Corporation. Stata reference manual: Stata release 9.1. Stata corporation 9th ed. College Station TX, USA 2005.
- Cadavid D, Tang Y, O'Neill G. Sensibilidad de la escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) a la progresión de la enfermedad y la intervención terapéutica en las formas progresivas de la esclerosis múltiple. *Rev Neurol*. 2010;51:321-9.

13. Ebers G. Prognostic factors for multiple sclerosis: The importance of natural history studies. *J Neurol*. 2005;252:II/15-20.
14. Velazquez-Quintana M, Macías Islas M, Rivera-Olmos V, Lozano-Zarate J. Multiple sclerosis in Mexico: Multicenter study. *Rev Neurol*. 2003;36:1019-22.
15. Bártulos Iglesias M, Marzo Sola ME, Estrella Ruiz LA, Bravo Anguiano Y. Epidemiological study of multiple sclerosis in La Rioja. *Neurologia*. 2014, pii: S0213-4853(14)00124-8.
16. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: A systematic review. *BMC Neurol*. 2013;13:128.
17. Magyari M, Koch-Henriksen N, Pflieger C, Sørensen PS. Gender and autoimmune comorbidity in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20:1244-51.
18. Bech E, Lycke J, Gadeberg P, Hansen HJ, Malmeström C, Andersen O, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled MRI study of anti-herpes virus therapy in MS. *Neurology*. 2002;58:31-6.
19. Fraser KB, Haire M, Millar JH, McCrea S. Increased tendency to spontaneous in-vitro lymphocyte transformation in clinically active multiple sclerosis. *Lancet*. 1979;2:175-6.
20. Millar JH. Multiple sclerosis. *Br Med J*. 1980;280:184-5.
21. Haire M, Fraser KB, Millar JH. Measles and other virus-specific immunoglobulins in multiple sclerosis. *Br Med J*. 1973;3: 612-3.
22. Sumaya CV, Myers LW, Ellison GW. Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 1980;37:94-6.
23. Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC, Bagley MH, Larsen PD. Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 1983;40:406-8.
24. Warner HB, Carp RI. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Lancet*. 1981;2:1290.
25. Haar S, Hollsberg P. Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Virol*. 2006;16:297-310.
26. Lucas RM, Hughes AM, Lay ML, Ponsonby AL, Dwyer DE, Taylor BV. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82:1142-8.
27. Simon KC, O'Reilly EJ, Munger KL, Finerty S, Morgan AJ, Ascherio A. Epstein-Barr virus neutralizing antibody levels and risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012;18: 1185-7.
28. Guadarrama M, Cruz H, Huetter M, Krueger G, Gathof B, Durán M, et al. Prevalencia de los virus herpes humanos 4 (VEB) y 6 (HHV-6) en linfoma de Hodgkin en pacientes estudiados en la Ciudad de México. *Rev Med Hosp Gen Mex*. 2004;67: 124-32.