



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**“Mecanismos moleculares de la relación entre el virus Epstein Barr
persistente en linfocitos B y el desarrollo de Esclerosis Múltiple.”**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Química Biológica

Evelin Sabrina Heck

Director de tesis: Dr. Mauricio Franco Farez

Director Adjunto: Dr. Mario Alejandro Lorenzetti

Consejera de estudios: Dra. Cybele García

Lugar de trabajo: Centro para la Investigación de Enfermedades Neuroinmunológicas (CIEN),
Fleni e Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas (IMIPP), Hospital
de Niños Ricardo Gutiérrez (HNRG).

Buenos Aires, 2025



Lic. Evelin Sabrina Heck
Tesisista



Dr. Mauricio F. Farez
Director de Tesis
Centro de Investigación de Enfermedades Neuroinmunológicas, Fleni
INEU-CONICET



Dr. Mario Lorenzetti
Director Adjunto de Tesis
Instituto Multidisciplinario de
Investigaciones en Patologías Pediátricas
(IMIPP CONICET-GCBA)

Resumen

“Mecanismos moleculares de la relación entre el virus Epstein Barr persistente en linfocitos B y el desarrollo de Esclerosis Múltiple.”

Resumen:

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria y autoinmune que afecta al sistema nervioso central, caracterizada por la pérdida de mielina en los axones. Aunque su etiología continúa siendo desconocida, se reconoce que se trata de una enfermedad multifactorial en la que intervienen factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos, se destacan el tabaquismo, la obesidad durante la adolescencia, la deficiencia de vitamina D y diversas infecciones virales. Dentro de los agentes infecciosos analizados, el virus Epstein Barr (EBV) ha demostrado poseer la asociación más sólida y consistente con la EM, aunque el mecanismo a través del cual este virus podría contribuir al desarrollo de la enfermedad no ha sido completamente elucidado.

El objetivo de este trabajo de tesis fue determinar el rol del EBV en la patogenia y/o el desarrollo de la EM. Para ello, se llevó a cabo un estudio prospectivo entre los años 2018 y 2023, en el que se analizaron muestras de pacientes con EM y controles provenientes de la misma región geográfica. Se evaluaron la serología y la carga viral del EBV, así como las variantes genéticas en regiones específicas del virus: el gen BCRF1, que codifica para el antígeno vIL10, y el gen BYRF1, que codifica para el antígeno EBNA2. Además, se realizaron análisis transcriptómicos en linfocitos B infectados y no infectados por EBV, obtenidos de pacientes con EM y de controles, y estudios *in vitro* para caracterizar funcionalmente los hallazgos moleculares.

Los resultados confirmaron la alta prevalencia del EBV en la población estudiada, con una serología positiva en el 100 % de los casos, sin diferencias significativas en la carga viral ni en las variantes genéticas entre pacientes y controles. No obstante, el análisis de expresión génica reveló una disminución del ARNm de IQGAP1 en linfocitos B EBV⁺ de pacientes con EM, en comparación con los EBV⁻ del mismo grupo. Los estudios *in vitro* demostraron que la inhibición de *Iqgap1* conduce a una mayor proliferación de linfocitos T y B, así como a un aumento en la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y T-bet, asociados con respuestas inmunes proinflamatorias.

Este trabajo constituye el primer estudio realizado en una cohorte argentina que aporta evidencia epidemiológica y molecular sobre un potencial rol del virus Epstein Barr en la patogenia de la esclerosis múltiple.

Palabras claves: Esclerosis Múltiple, Virus Epstein Barr, linfocitos B, variantes de vIL10 y EBNA2, IQGAP1.

“Molecular mechanisms of the relationship between Epstein Barr virus persistence in B lymphocytes and the development of multiple sclerosis.”

Abstract:

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system, characterized by demyelination and axonal damage. While its precise etiology remains unknown, MS is considered a multifactorial disorder influenced by genetic predisposition and various environmental risk factors, including smoking, adolescent obesity, vitamin D deficiency, and viral infections. Among the infectious agents studied, the Epstein Barr virus (EBV) has shown the most consistent and compelling association with MS. Although the exact mechanisms linking EBV to MS development are not yet fully understood, a causal relationship has been strongly suggested.

This thesis aimed to investigate the role of EBV in the pathogenesis of MS. In a prospective study conducted between 2018 and 2023, we evaluated EBV seroprevalence and viral load, and characterized sequence variants in the promoter and coding regions of the BCRF1 gene (encoding the vIL10 antigen) and the 3' terminal region of the BYRF1 gene (encoding the EBNA2 antigen), in patients with MS and healthy controls from the Argentine population. In parallel, we isolated B lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells and analyzed transcriptional alterations associated with EBV infection. To complement these findings, we also performed *in vitro* functional studies.

Our results confirmed a 100 % EBV seroprevalence in both patients and controls, with no significant differences in viral load. Sequence and phylogenetic analyses of vIL10 and EBNA2 showed no correlation with disease status or geographic origin. However, RNA sequencing revealed decreased expression of IQGAP1 gene mRNA in EBV-positive B cells from MS patients compared to their EBV-negative counterparts. Functional *in vitro* assays further demonstrated that *Iqgap1* silencing led to increased proliferation of T and B lymphocytes, along with upregulation of the transcription factors ROR γ t and T-bet, both involved in pro-inflammatory responses.

In conclusion, this thesis provides the first integrative study of EBV in an Argentine MS cohort, offering novel epidemiological and molecular insights that support a potential immunomodulatory role of EBV in MS pathogenesis.

Keywords: Multiple sclerosis, Epstein Barr virus, B lymphocytes, vIL10 and EBNA2 variants, IQGAP1.

Agradecimientos

Agradecimientos

Mi agradecimiento más profundo a mis directores de tesis, Mauricio y Mario, gracias por su orientación, apoyo y confianza a lo largo de todo este proceso, fueron una guía indispensable para mí. Su dedicación, conocimientos y paciencia me permitieron alcanzar este logro. Gracias por brindarme su tiempo y por su constante motivación para mejorar y superar los desafíos que se presentaron a lo largo de todos estos años.

Gracias al Laboratorio CIEN del Fleni y al IMIPP del Hospital de Niños Ricard Gutiérrez, por haberme brindado la oportunidad de realizar mi doctorado en estos prestigiosos centros de investigación. Fueron un pilar fundamental en el desarrollo de mi carrera académica, proporcionándome los recursos y el ambiente adecuados para crecer día a día.

Al CONICET, por darme la oportunidad de realizar un doctorado con una beca tan prestigiosa.

A mi compañera del CIEN, Sofi gracias por todas esas mañanas y tardes de risas, música y comida, aún en los peores momentos todo era diversión, fuiste mi primer compa de trabajo y te convertiste en una gran amiga.

A mis compañeros del IMIPP, Agus, Naty, Ceci, Osky y Vicki, quienes no solo me ayudaron en las cuestiones técnicas y científicas, sino que también hicieron de este proceso algo más llevadero. Gracias por escucharme en mis momentos de quejas y por sus consejos. Extraño las meriendas con birras cuando salíamos del laboratorio.

A Vicki, Pao y Pame, gracias por haberme escuchado con tanta atención en cada seminario del IMIPP y darme todos los consejos que pudieron en cuanto a cuestiones técnicas. Las tres son grandes ejemplos de mujeres y las admiro completamente.

Gracias a mis papas y a mi hermano, quienes fueron mi apoyo incondicional en este arduo y largo camino, les debo todo. Gracias por su amor, paciencia y comprensión en cada etapa de este proceso. Por soportarme en mis momentos de mal humor y malestar. Sin su respaldo constante, no habría sido posible llegar hasta este momento.

A mis amigas, Vicki, Agus y Cami, por estar siempre, incluso en los momentos más difíciles, brindándome su apoyo y compartiendo tanto mis alegrías como mis preocupaciones. Apoyándome en cada cambio que quise realizar durante todos estos años. Son un pilar fundamental en mi vida.

Finalmente, quiero dedicar un agradecimiento muy especial a Alan, por su amor, comprensión y apoyo incondicional. Gracias por tu paciencia, sé que hubo días muy difíciles a lo largo de estos años. Por tu capacidad para escucharme y tu ánimo constante que fueron fundamentales para completar este proceso con éxito. Por los mates y la compañía cuando tenía que escribir, hacer un curso o presentarme en un congreso. Gracias por escucharme hablar de cosas que al principio no entendías y terminaste explicando mejor que yo. Gracias por acompañarme en cada paso sin presionarme y dejarme hacer todo a mi tiempo. Y principalmente gracias por ser mi compañero de vida y por estar siempre a mi lado.

Índice

Índice

	Página
1.Introducción	1
1.1. Generalidades de la Esclerosis Múltiple	1
1.2. Epidemiología	1
1.3. Tipos de EM	3
1.4. Manifestaciones clínicas de la EM	5
1.5. Inmunopatología	6
1.6. Poblaciones celulares involucradas en la patología	7
1.6.1. Linfocitos T CD4	7
1.6.2. Linfocitos T CD8	7
1.6.3. Linfocitos B	8
1.6.4. Astroцитos	9
1.6.5. Microglía y macrófagos	9
1.7. Mecanismos inmunológicos involucrados en el desarrollo de la EM	10
1.8. Etiología	12
1.8.1. Factores genéticos	13
1.8.1.1. IQGAP1 (<i>IQ motif containing GTPase activating protein 1</i>)	14
1.8.2. Factores ambientales	15
1.8.2.1. Hábito tabáquico	15
1.8.2.2. Sobrepeso y obesidad	16
1.8.2.3. Dosaje de vitamina D	17
1.8.2.4. Agentes infecciosos	17
1.8.2.4.1. Citomegalovirus	18
1.8.2.4.2. Virus Varicella Zoster	18
1.8.2.4.3. Generalidades del Epstein Barr	19
1.8.2.4.3.1. Distribución geográfica y variación genética del EBV	20
1.8.2.4.3.2. Expresión de genes líticos y de latencia	21
1.8.2.4.3.3. Ciclo de replicación viral	22
1.8.2.4.3.4. Proteínas vIL10 y EBNA2	24
Interleuquina 10 viral	24
Antígeno nuclear 2 de Epstein Barr	25
1.8.2.4.3.5. Respuesta inmune frente al EBV	26
1.8.2.4.3.6. Detección y diagnóstico de la infección del EBV	26
1.8.2.4.3.7. EBV y Esclerosis Múltiple	27
Mimetismo molecular	28
Respuesta inmune alterada frente al EBV	29
Activación inespecífica	29
1.8.2.4.4. Tratamiento de la Esclerosis Múltiple	30

	Página
1.9. Justificación del trabajo	31
2. Hipótesis	34
3. Objetivos	36
4. Metodología	38
4.1. Consideraciones éticas	38
4.2. Diseño del estudio	38
4.3. Población en estudio	38
4.4. Muestras en estudio	39
4.5. Procesamiento de muestras	39
4.6. Obtención de datos demográficos, clínicos y de atrofia cerebral	40
4.7. Serología para EBV, CMV y VZV en pacientes y controles	40
4.8. Determinación de la carga viral de EBV	42
4.8.1. Aislamiento y purificación de ADN	42
4.8.2. Generación de la curva estándar	43
4.9. Secuenciación automatizada de los genes BCRF1 y BYRF1	44
4.9.1. Amplificación y secuenciación automatizada de BCRF1 y BYRF1	44
4.9.2. Amplificación del gen BCRF1 (vIL10)	44
4.9.3. Amplificación del gen BYRF1 (EBNA2)	46
4.9.4. Purificación y cuantificación de productos de amplificación	47
4.9.5. Secuenciación automatizada	48
4.9.6. Análisis de secuencias y reconstrucción filogenética	49
4.10. Preparación de muestras para <i>RNA-seq</i>	50
4.10.1. Separación de linfocitos B con EBV latente (MARIS)	50
4.10.1.1. Aislamiento de linfocitos B vírgenes y de memoria	50
4.10.1.2. MARIS	51
4.10.1.3. Separación de células utilizando citometría de flujo (Cell-Sorting)	52
4.11. Ensayos en ratones <i>in vitro</i>	53
4.11.1. Ratones	53
4.11.2. Aislamiento de linfocitos B	54
4.11.3. Cultivo de linfocitos B	54
4.11.4. Aislamiento de ARN	55
4.11.5. Síntesis de ADNc	55
4.11.6. Reacción de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	56
4.11.6.1. Generación de curvas estándar	56
4.11.6.2. Cuantificación relativa de ARNm	57
4.12. Silenciamiento de <i>Iqgap1</i> en linfocitos B y cocultivo con linfocitos T	58
4.12.1. Aislamiento de linfocitos B y T	58
4.12.2. Cocultivo de linfocitos B y T	58
4.12.3. Proliferación celular	59
4.12.4. Citometría de flujo	59

	Página
4.12.4.1. Tinción de marcadores de superficie e intracelulares	59
4.12.5. Diferenciación de linfocitos T	60
4.13.6. Presentación antigénica	60
4.13.7. Análisis de factores de transcripción	61
4.13.8. Análisis de citoquinas por qPCR	61
4.13.9. Análisis de citoquinas por ELISA	61
4.13.10. Proliferación celular de linfocitos B y T y marcadores de activación	62
4.13. Análisis estadístico	62
5. Resultados	64
5.1. Descripción demográfica de la población en estudio	65
5.2. Presencia de anticuerpos para virus de la familia <i>Herpesviridae</i>	67
5.3. Evaluación de carga viral de pacientes con EM y GC	84
5.3.1. Curva estándar	84
5.4. Caracterización de variantes de EBV	87
5.4.1. Caracterización de variantes del gen BCRF1 que codifica para la proteína viral vIL10	88
5.4.1.1. Reconstrucción filogenética del gen BCRF1	88
5.4.2. Caracterización de variantes del gen BYRF1 que codifica para la proteína viral EBNA2	89
5.4.2.1. Reconstrucción filogenética del gen BYRF1	94
5.5. Respuesta transcripcional en linfocitos B infectados por el EBV	100
5.6. Ensayos <i>in vitro</i> – Silenciamiento de <i>Iqgap1</i>	102
5.6.1. Efectividad del silenciamiento de <i>Iqgap1</i>	103
5.6.2. Proliferación celular	106
5.6.3. Evaluación de citoquinas por qPCR	107
5.6.4. Evaluación de citoquinas por ELISA	108
5.6.5. Silenciamiento de <i>Iqgap1</i> en linfocitos B y posterior cocultivo con linfocitos T	109
5.6.5.1. Proliferación celular	110
5.6.5.2. Evaluación de marcadores de activación	111
5.6.5.3. Efecto del silenciamiento de <i>Iqgap1</i> sobre la presentación antigénica	112
5.6.5.4. Evaluación de factores de transcripción de linfocitos T por PCR cuantitativa	113
5.6.5.5. Análisis de expresión de citoquinas de linfocitos T por qPCR	115
6. Discusión	118
7. Conclusión	145
8. Perspectivas	149
9. Bibliografía	152
10. Anexo	210

Abreviaturas

Abreviaturas

Δ Ct: Diferencia de Ct
 $\Delta\Delta$ Ct Diferencia de Δ Ct
 μ g: Microgramo
 μ l: Microlitro
 μ M: Micromolar
ACK: Solución de lisis de Amonio-Cloruro-Potasio, del inglés *Ammonium-Chloride-Potassium*
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ANOVA: Análisis de varianza, del inglés *Analysis of variance*
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
BOCs: Bandas oligoclonales de IgG
BPF: Fracción de parénquima cerebral; del inglés *brain parenchymal fraction*
BSA: Albúmina de suero bovino, de inglés *Bovine Serum Albumin*
CD19: Del inglés *Cluster of differentiation 19*
CD28: Del inglés *Cluster of differentiation 28*
CD3: Del inglés *Cluster of differentiation 3*
CD4: Del inglés *Cluster of differentiation 4*
CD8: Del inglés *Cluster of differentiation 8*
CD80: Del inglés *Cluster of differentiation 80*
CD86: Del inglés *Cluster of differentiation 86*
CMSP: Células mononucleares de sangre periférica
CMV: Citomegalovirus humano
CPA: Células presentadoras de antígenos
Ct: Valor del ciclo umbral, del inglés *Cycle threshold*
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato, del inglés *deoxynucleotide triphosphates*
ddNTPs: didesoxinucleótidos fluorescentes terminadores de cadena, del inglés *chain-terminating dideoxynucleotide triphosphates*
DE: Desviación estándar
DMT: Terapias modificadoras de la enfermedad, del inglés *disease modifying therapy*
D.O: Densidad óptica
EBNA1: Antígeno nuclear de Epstein Barr 1, del inglés *Epstein Barr nuclear antigen 1*
EBNA2: Antígeno nuclear de Epstein Barr 2, del inglés *Epstein Barr nuclear antigen 2*
EBNA3A: Antígeno nuclear de Epstein Barr 3A, del inglés *Epstein Barr nuclear antigen 3A*
EBNA3B: Antígeno nuclear de Epstein Barr 3B, del inglés *Epstein Barr nuclear antigen 3B*
EBNA3C: Antígeno nuclear de Epstein Barr 3C, del inglés *Epstein Barr nuclear antigen 3C*
EBV: Virus del Epstein Barr, del inglés *Epstein Barr Virus*
EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*
ELISA: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
EM: Esclerosis Múltiple
EMERGE: Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple
EMPP: Esclerosis Múltiple primaria progresiva
EMRR: Esclerosis Múltiple remitente-recurrente
EMSP: Esclerosis Múltiple secundaria progresiva
FOXP3: Del inglés *Forkhead box P3*
GC: Grupo control
GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
hIL10: Interleuquina 10 humana, del inglés *human interleukin 10*
IACUC: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales, del inglés *Institutional Animal Care and Use Committee*
IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IgG: Inmunoglobulina G
 IL-4: Interleuquina 4
 IL-6: Interleuquina 6
 IL-10: Interleuquina 10
 IL-17: Interleuquina 17
 IL-23: Interleuquina 23
 IMC: índice de masa corporal
 INF γ : Interferón gamma
 Iqgap1-siRNA: ARN de silenciamiento específico para *Iqgap1*
 JC: Modelo Jukes-Cantor
 JC+G: Modelo Jukes-Cantor con tasa de variación entre sitios que siguen una distribución gamma (G).
 LCR: líquido cefalorraquídeo
 LMPs: proteínas latentes de membrana, del inglés *latent membrane proteins*
 MAG: Glicoproteína asociada a mielina, del inglés *myelin-associated glycoprotein*
 MARIS: Método para analizar ARN luego de una separación intracelular, del inglés *Method for Analyzing RNA Following Intracellular Sorting*
 MBP: Proteína básica de la mielina, del inglés *myelin basic protein*
 MHC I: Complejo mayor de histocompatibilidad, de inglés *Major Histocompatibility Complex I*.
 MHC II: Complejo mayor de histocompatibilidad, de inglés *Major Histocompatibility Complex II*.
 mL: Mililitro
 mM: Milimolar
 MNI: Mononucleosis infecciosa
 MOG: Glicoproteína de oligodendrocitos de mielina, de inglés *myelin oligodendrocyte glycoprotein*
 MPM: Marcador de peso molecular
 MRI: Imágenes de resonancias magnética
 MSIF: Asociación Internacional de Esclerosis Múltiple, del inglés *Multiple sclerosis International Federation*
 NA: No aplica
 ng: Nanogramo
 NK: Células asesinas natural, del inglés *natural killer*
 NTC: Control sin templado, del inglés *no template control*
 pb: Pares de bases
 PBS: tampón fosfato salino o buffer fosfato salino, del inglés *Phosphate-buffered saline*
 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*
 qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real
 R²: coeficiente de correlación
 RFU: Unidades relativas de fluorescencia, del inglés *Relative Fluorescence Units*
 RM: Resonancia magnética
 RMN: Resonancia magnética nuclear
 RNA-seq: Secuenciación masiva de ARN
 Rorc: del inglés *RAR Related Orphan Receptor C*
 Scr-siARN: ARN de silenciamiento scramble
 SFB: Suero fetal bovino
 siARN: ARN de silenciamiento
 SNC: Sistema nervioso central
 ORF: Marcos abiertos de lectura, del inglés *Open reading frame*
 OVA: Ovoalbúmina
 Tbx21: del inglés *T-box transcription factor 21*
 TCR: Receptor de células T, del inglés *T cell receptor*
 TGF: factor de crecimiento transformante, del inglés *Tumor growth factor*
 Th1: Linfocitos T helper 1, del inglés *T helper cell 1*

Th17: Linfocitos T helper 17, del inglés *T helper cell 17*
Th2: Linfocitos T helper 2, del inglés *T helper cell 2*
TNF: Factor de necrosis tumoral, del inglés *Tumor necrosis factor*
Tregs: Linfocitos T regulatorios, del inglés *Regulatory T cells*
UIT: Unidad de Investigación Traslacional
VCA: antígeno de cápside viral, del inglés *Viral capsid antigen*
VDRE: Elemento funcional de respuesta de vitamina D, del inglés *Vitamin D response element*
vIL10: Interleuquina 10 viral, del inglés *Viral Interleukin 10*
VZV: Virus varicela zoster, del inglés *Varicella Zoster Virus*
WT: Salvaje, del inglés *Wild type*

1. Introducción

1.1. Generalidades de la Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica, autoinmune, inflamatoria y desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (SNC) y es la principal causa de discapacidad no traumática en jóvenes adultos (Compston & Coles, 2008; Lotfi et al., 2022). Se estima que a nivel mundial afecta a más de 2.8 millones de personas y su prevalencia es de 35,9 por cada 100.000 individuos (Walton et al., 2020). La EM es una patología que, al igual que la mayoría de las enfermedades autoinmunes, afecta predominantemente a mujeres (relación mujer: hombre 3:1) (Jakimovski et al., 2024; Magyari & Sorensen, 2019; Orton et al., 2006). El inicio de la enfermedad se da típicamente entre los 20-40 años, aunque en los últimos años se ha detectado un aumento en el número de casos de pacientes pediátricos (Alroughani & Boyko, 2018; Iaffaldano et al., 2017) y personas mayores (Ostolaza et al., 2021; Prosperini et al., 2022). La EM se caracteriza por el infiltrado linfocitario en el SNC, lo cual conduce a la destrucción de la vaina de mielina y el daño axonal (Compston & Coles, 2008; Zhao & Jacob, 2023). Es una enfermedad difícil de diagnosticar, debido principalmente a la heterogeneidad de los síntomas que pueden presentar los pacientes: alteraciones sensitivas y visuales, déficits motores, fatiga, dolor y déficits cognitivos, entre otros (Engelhardt et al., 2022). Más aún, estas manifestaciones clínicas dependen de la localización de las lesiones que ocurran en el SNC (Kearney et al., 2015; Kuhlmann et al., 2023). La forma clínica más común, es la EM remitente-recurrente (EMRR), que afecta aproximadamente al 85 % de los pacientes y se caracteriza por la aparición de un episodio de disfunción neurológica seguido por la recuperación o remisión clínica. De no mediar tratamiento, luego de 10-20 años post diagnóstico de la enfermedad, el 80 % de los pacientes con EMRR suele progresar a EM secundaria progresiva (EMSP), donde el deterioro neurológico es progresivo sin mejoría aparente (Dendrou et al., 2015; Klineova & Lublin, 2018; Pitt et al., 2022). Por otro lado, aproximadamente el 10 % de los pacientes con esclerosis múltiple directamente son diagnosticados con EM progresiva primaria (EMPP), la cual se caracteriza por un deterioro progresivo desde el inicio de la aparición de la enfermedad (Dendrou et al., 2015; Klineova & Lublin, 2018).

En cuanto a la etiología de la enfermedad, hace varios años se postula que la EM es una patología compleja y multifactorial que involucra tanto factores genéticos, que hacen susceptibles a los individuos, como también factores ambientales (agentes infecciosos, obesidad, hábito tabáquico, niveles de vitamina D, etc) (Jakimovski et al., 2024; Olsson et al., 2017; Waubant et al., 2019).

1.2. Epidemiología

Según un estudio realizado en 2019 por la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple junto con la Organización Mundial de la Salud, se estima que 2,8 millones de personas padecen de EM a nivel mundial; lo cual implica que 1 de cada 2785 individuos padecen EM (Walton et al., 2020). Estos valores aumentaron significativamente desde el último estudio llevado a cabo en 2013, cuando se había

reportado una prevalencia de 2,3 millones de personas afectadas con EM a nivel mundial. Entre los principales factores que los expertos atribuyen como responsables en el aumento de la prevalencia de la enfermedad, se encuentran la mejora en el criterio diagnóstico (Schwenkenbecher et al., 2019), el avance en los tratamientos, que aumentan la calidad de vida y la cantidad de años de supervivencia de los individuos (Kingwell et al., 2019) y una mejora en las bases de datos que brindan información más precisa y confiable acerca de la enfermedad (Portaccio et al., 2024).

La prevalencia de la EM varía considerablemente dependiendo la región geográfica, siendo mayor en Europa (133 casos por cada 100.000 habitantes), seguido por América (112 casos por cada 100.000 habitantes), el Mediterráneo Oriental (30 casos por cada 100.000 habitantes), Sudeste de Asia (9 casos por cada 100.000 habitantes), África (5 casos por cada 100.000 habitantes) y el Pacífico Oeste (5 casos por cada 100.000 habitantes) (Leray et al., 2016; Walton et al., 2020) (**Figura 1**). Desde el año 2013, el mayor aumento en la prevalencia se ha visto en América, donde la cantidad de casos se duplicó (Walton et al., 2020). Según estudios donde se incluyeron datos de América Latina y el Caribe, la prevalencia de la EM varía entre 0,75 a 21,1 casos por cada 100.000 habitantes, con la mayor prevalencia en Brasil, Argentina y la isla de Martinica y una menor prevalencia en Colombia y Ecuador (Cristiano et al., 2013; Cristiano & Rojas, 2017; Rojas et al., 2014).

Particularmente, en Argentina, tanto la prevalencia como la incidencia de la enfermedad fue descrita en algunas zonas del país, mientras que existe escasa información sobre aspectos epidemiológicos en otras regiones del mismo. Recientemente se describió una prevalencia de 20-40 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que la incidencia reportada fue de casi 3 casos nuevos por año por cada 100.000 habitantes (Kohler et al., 2021). En forma particular, en Buenos Aires, la prevalencia es de 38,2 casos por cada 100.000 habitantes, según un estudio realizado por Cristiano y col en el año 2016 (Cristiano et al., 2016). En la provincia de Santa Fe, y en particular en Rosario, la prevalencia es de 30,3 y 48,3 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente (Luetic & Menichini, 2021; G. Luetic & Menichini, 2020). Por su parte, un estudio realizado en el año 2002 en la patagonia argentina, que incluyó las ciudades de Neuquén, Trelew, Río Gallegos y Ushuaia, determinó una prevalencia de la enfermedad de 17,2 pacientes por cada 100.000 habitantes (Melcon et al., 2008). Finalmente, un estudio realizado en la provincia de Salta, en el noroeste argentino, determinó una prevalencia de 23,8 casos por cada 100.000 habitantes (Mellinger et al., 2018). Las diferencias en la prevalencia a lo largo del país podrían deberse tanto a las características de la población (etnias) como a las condiciones ambientales (geografía y clima). Es oportuno mencionar que hay mayor prevalencia de casos de EM en las ciudades de Buenos Aires y Rosario, que poseen una temperatura media anual de 17°C y se encuentran en la región pampeana. Incluso dentro de una misma provincia, según los reportes citados anteriormente, la prevalencia es desigual y con mayor número de casos en las grandes ciudades, donde hay mayor cantidad de centros de salud.

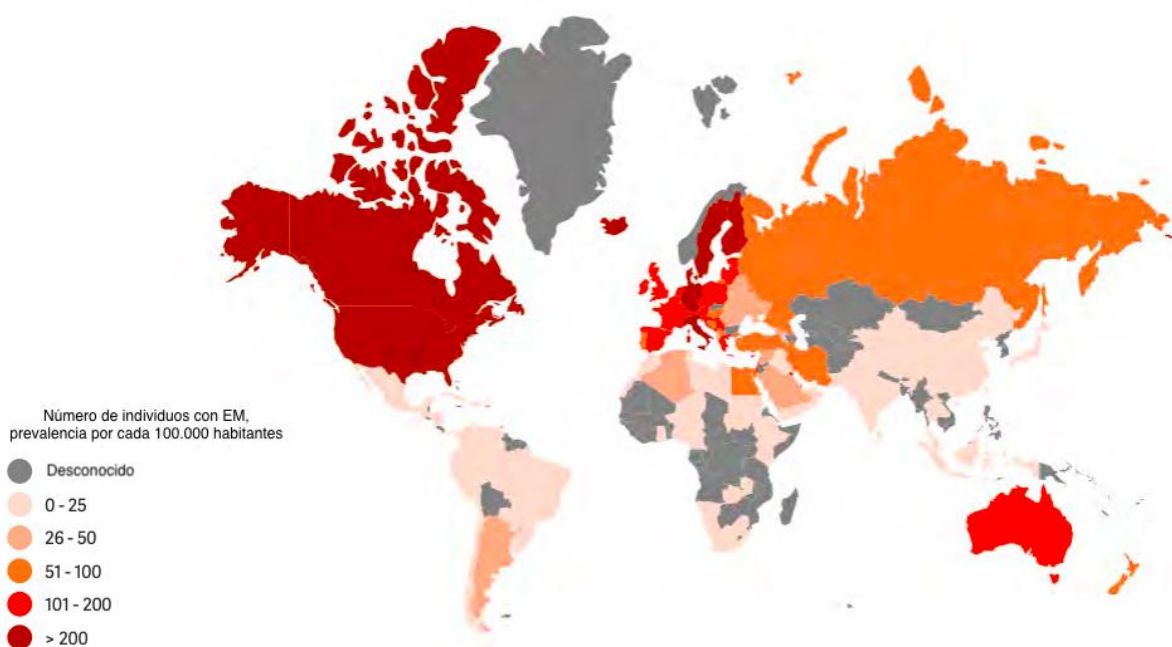


Figura 1: Prevalencia de la EM a nivel mundial. Figura adaptada del atlas de EM de la Federación Internacional de EM, 2020. Accesado por última vez septiembre 2020, <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2020/10/Atlas-Epidemiology-report-Sept-2020-Final-ES.pdf>

1.3. Tipos de EM

Hay cuatro tipos principales de esclerosis múltiple: síndrome desmielinizante aislado, EM remitente-recurrente, EM secundaria progresiva y EM primaria progresiva. La identificación del tipo de EM que padece un individuo requiere de una revisión clínica exhaustiva por parte de médicos neurólogos y es complementada con múltiples análisis de imágenes que se realizan periódicamente (E. Chen et al., 2023). El Síndrome desmielinizante aislado (SDA), se refiere al primer episodio desmielinizante inflamatorio en el sistema nervioso central, que, de cumplir con los criterios de diseminación en el tiempo, puede terminar siendo diagnosticado como EM (Kolčava et al., 2020; D. Miller et al., 2005). Según estudios previos, llevados a cabo en países occidentales, entre el 60 al 70 % de los individuos que cursan un primer episodio son diagnosticados con EM definitiva dentro de los 20 años del primer evento (D. H. Miller et al., 2012; Zhang et al., 2019). Más aún, existen estudios que determinaron que el 45 % de los individuos que cursaron un primer evento ya habían sido diagnosticados con EM a los 5 años del evento (Brownlee et al., 2015). Los principales predictores identificados de esta transición son: 1) El número de lesiones desmielinizantes hiperintensas en T2/FLAIR detectadas en la resonancia magnética (RM) de cerebro y médula espinal; 2) La edad del individuo al presentar el primer evento; y 3) La presencia y número de bandas oligoclonales presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Banerjee et al., 2019). Las bandas oligoclonales de IgG (BOCs) son anticuerpos expandidos clonalmente producidos por vía intratecal y es uno de los pocos biomarcadores en el LCR incluidos en los criterios de diagnóstico de la EM (Maroto-García et al., 2023; Obermeier et al., 2008). En el caso de

los pacientes con SDA que progresan a EM definitiva, el tipo que presentan mayormente es remitente recurrente. Por su parte, la EMRR es el tipo de EM más común, presentado por aproximadamente el 85 % de los pacientes. Esta forma clínica se caracteriza por episodios de desmejoría aguda del funcionamiento neurológico (llamado recaída o brote), ya sea por la aparición de nuevos síntomas o empeoramiento de los síntomas existentes, seguida por una recuperación parcial o total y sin aparente progresión de la enfermedad (etapa de remisión) (**Figura 2a**) (Bierhansl et al., 2022; Lublin et al., 2014). Síntomas tales como debilidad, trastornos del equilibrio y de la visión, pueden presentarse durante la recaída, con una duración de al menos 24 horas. Si bien la frecuencia de las recaídas puede variar de un paciente a otro, generalmente no supera 1,5 veces por año (Klineova & Lublin, 2018). Según estudios acerca de la historia natural de la EM, el 10 % de los pacientes con EMRR transiciona a la forma secundaria progresiva luego de 5 años de padecer la enfermedad. El riesgo aumenta un 25 % a los 10 años y alcanza un 80 % de los pacientes con la forma progresiva a los 30 años del desarrollo inicial de la EM (Bogosian et al., 2019). Se han identificado algunos predictores de la transición de EMRR a EMSP, como, por ejemplo: 1) La edad más avanzada al inicio de la EMRR; 2) El sexo masculino presentaría mayoritariamente este fenotipo; 3) Lesiones en la médula espinal y la recuperación incompleta de una recaída disminuirían el tiempo de progresión de EMRR a EMSP (Rovaris et al., 2006; Ziemssen et al., 2022). Fenotípicamente, la EMSP es muy variable, con períodos de progresión y empeoramiento con recaídas que luego pueden estabilizarse por un breve periodo de tiempo (**Figura 2b**) (Klineova & Lublin, 2018). Finalmente, entre un 10 al 20 % de los individuos desarrollan desde el inicio la forma primaria progresiva de la enfermedad (EMPP), que se caracteriza por la falta de la etapa de recaídas y remisiones; con una progresión continua de la enfermedad (**Figura 2c**) (Sempik et al., 2024). Si bien los síntomas de las EMSP y EMPP son diferentes, al día de la fecha no se describieron características genéticas, patológicas o que puedan ser detectadas mediante resonancias magnéticas y que permitan distinguirlas (Ransohoff et al., 2015). En el caso de la EMSP y la EMPP se pueden clasificar en activas (cuando hay evidencia de nueva actividad detectada con resonancia magnética nuclear (RMN)) o no activa (cuando no hay evidencia de actividad), así como también con progresión (cuando la discapacidad se acumula a lo largo del tiempo) o sin progresión en el caso de que no se acumule y solo se mantenga (Bierhansl et al., 2022; Lublin et al., 2014, 2020).

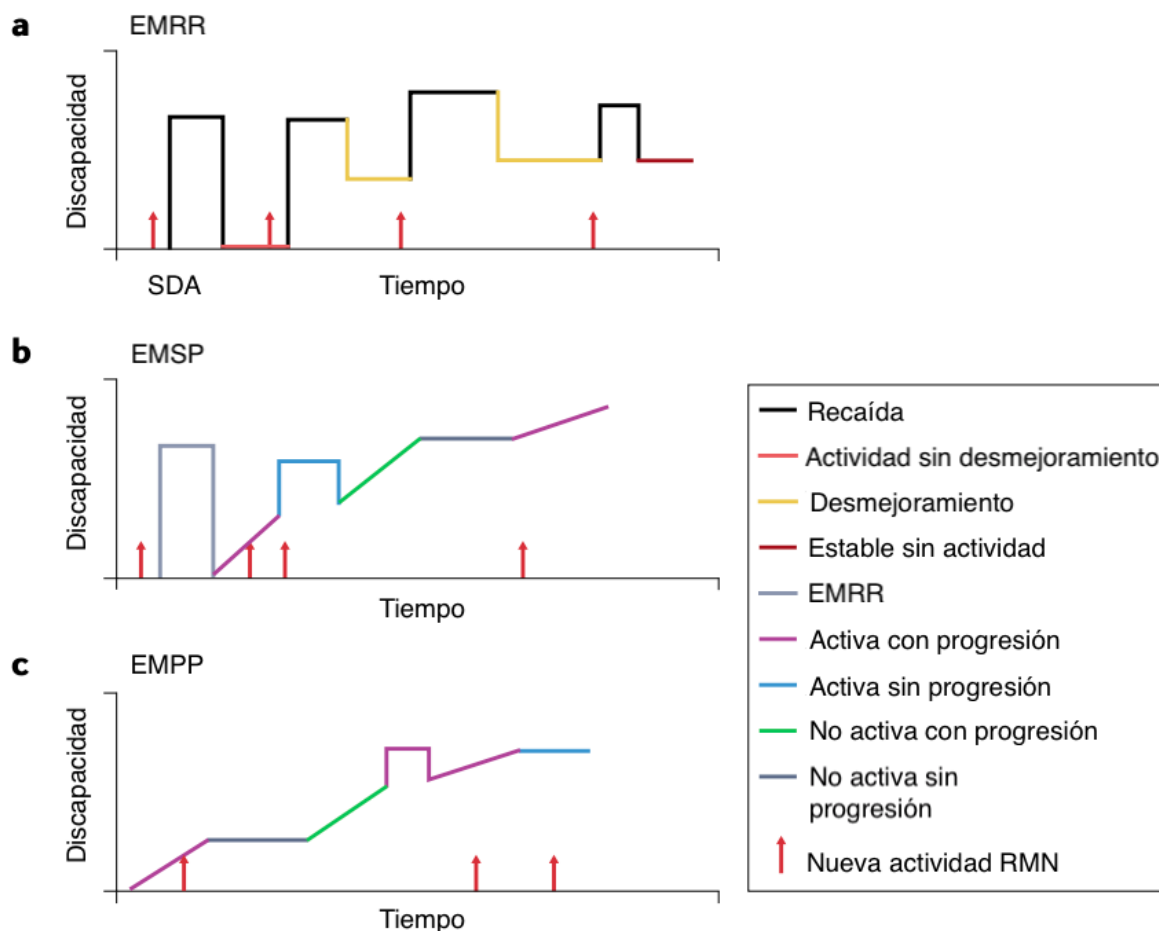


Figura 2: Formas clínicas de la EM. La EM tiene 3 formas clínicas: EMRR, EMSP y EMPP. **A)** La EMRR es caracterizada por una etapa de recaída y la posterior recuperación parcial o completa. **B)** La EMSP comienza como la EMRR, pero luego es caracterizada por una etapa de desmejora continua sin recuperación. **C)** En la EMPP se describe una desmejora continua desde el inicio del desarrollo de la enfermedad. Imagen adaptada de (Bierhansl et al., 2022)

1.4. Manifestaciones clínicas de la EM

Normalmente el daño al SNC suele ser detectado en forma concomitante a la aparición de los primeros síntomas clínicos y se evidencian cuando las lesiones se localizan en una zona que interrumpe la función del nervio («Hidden Disabilities in Multiple Sclerosis – The Impact of Multiple Sclerosis on Patients and Their Caregivers», 2013). Los pacientes con EM presentan un amplio espectro de síntomas que reflejan la localización multifocal de las lesiones en el SNC. La severidad y la amplia gama de síntomas reflejan la carga lesional, la ubicación y el grado de lesión tisular. Esta variabilidad, en términos de lesiones, es responsable no sólo de que los síntomas varíen entre pacientes, sino también que los síntomas varíen en un mismo paciente a lo largo del tiempo, y este hecho torna a la EM en una enfermedad impredecible. Si bien son variables, las manifestaciones clínicas más comunes son:

- 1) Visuales: que incluyen la pérdida de visión, visión doble y neuritis óptica.
- 2) Vestibulares: vértigo y desequilibrio en la marcha.

- 3) Motoras: debilidad, espasticidad y fatiga.
- 4) Sensoriales: pérdida de sensibilidad y parestesias.
- 5) Urinarias: incontinencia, retención, urgencia, constipación, diarrea y reflujo.
- 6) Cognitivas: pérdida de la memoria y problemas de concentración.
- 7) Psiquiátricas: depresión, aislamiento social y ansiedad.

Los síntomas listados de 1 al 4 son los que suelen manifestarse en las primeras etapas de la enfermedad y están relacionados directamente con la desmielinización y la pérdida axonal. Luego se incluye como síntomas secundarios los listados en el ítem 5 dado que dichos síntomas son consecuencias de los síntomas primarios. Finalmente, los síntomas terciarios, listados del ítem 6 al 7, son consecuencias psicológicas y sociales de la enfermedad (Ben-Zacharia, 2011; Ghasemi et al., 2017; Tafti et al., 2023).

Durante las etapas tempranas de la EM e incluso previo al diagnóstico de la enfermedad, ocurre un proceso denominado atrofia cerebral, que es la pérdida del volumen del cerebro. Este proceso es normal con el paso de los años y con un ritmo de 0,1 al 0,5 % por año; sin embargo, en el caso de los pacientes con EM, y principalmente en aquellos sin tratamiento, dicha atrofia se encuentra acelerada, con disminución del volumen del cerebro desde 0,5 al 1,35 % anual (Giovannoni et al., 2016). La atrofia del cerebro puede estar localizada tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca (Andravizou et al., 2019). La atrofia de la sustancia gris ocurre principalmente en las etapas tempranas de la enfermedad y refleja la pérdida axonal y el daño neuronal. El daño extenso de la sustancia gris, en particular la afectación del tálamo está asociado con una amplia gama de manifestaciones clínicas que incluyen trastornos cognitivos, déficits motores, fatiga y alteraciones de la motilidad ocular (Minagar et al., 2013). La atrofia progresiva del tálamo fue descrita en los distintos tipos de EM y a su vez, la pérdida del volumen talámico también fue descrita en pacientes pediátricos (Till et al., 2011). Por su parte, la atrofia de la sustancia blanca es indicativa de progresión y actividad de la enfermedad. Ambos tipos de atrofia pueden ser visualizadas mediante imágenes de resonancias magnéticas (MRI, por sus siglas en inglés) (Lie et al., 2022). Más aún, la atrofia total del cerebro también puede ser definida en término de cambio en la fracción de parénquima cerebral (BPF, por sus siglas en inglés) (Rudick et al., 1999). El BPF se calcula como la relación entre el volumen del tejido del parénquima y el volumen total del cerebro y es uno de los parámetros más utilizados cuando se analiza la atrofia cerebral (Chylińska et al., 2023).

1.5. Inmunopatología

La EM es una enfermedad caracterizada principalmente por la presencia de lesiones focales (también llamadas placas desmielinizantes) tanto en la sustancia blanca como gris, con destrucción y pérdida de los oligodendrocitos, las células encargadas de cubrir con mielina (mielinizar) los axones neuronales. Si bien la vaina de mielina se pierde completamente, la pérdida axonal es variable, incluso

entre diferentes lesiones de un mismo paciente (Kutzelnigg & Lassmann, 2014; Lassmann, 2018a). Si bien, al día de la fecha no se conoce con exactitud cuáles son los factores desencadenantes de la EM, se describió que las lesiones focales son consecuencia de una reacción inflamatoria producto de la secreción de citoquinas proinflamatorias y la subsecuente migración al sistema nervioso central de macrófagos y linfocitos T y B. En dicho contexto, ambos tipos de linfocitos reaccionarían específicamente contra los autoantígenos presentes en el SNC, y con una reacción autoinmune como resultado final (Dendrou et al., 2015; Thompson, Baranzini, et al., 2018).

1.6. Poblaciones celulares involucradas en la patología

1.6.1. Linfocitos T CD4

Los linfocitos T CD4⁺ vírgenes, pueden diferenciarse a linfocitos T efectores (Th1, Th2, Th17) o a linfocitos T reguladores (Treg) dependiendo de las citoquinas presentes en el microambiente que influyen su diferenciación. Los linfocitos Th1 se desarrollan cuando en el ambiente están presentes las citoquinas INF γ e IL-12, que activan una cascada de señalización que finaliza en la activación del factor de transcripción T-bet, característico de los linfocitos Th1; que a su vez secretan IL-2 e INF γ . El factor de transcripción GATA-3 es característico de los linfocitos Th2 y estos secretan IL-4, IL-5 e IL-13. Por otro lado, cuando la activación ocurre en la presencia de las citoquinas TGF- β 1, IL-23 y IL-6 o IL-21, se favorece la diferenciación de linfocitos Th17, que a su vez se caracterizan por la expresión del factor de transcripción ROR γ t y la producción de IL-17. Finalmente, los linfocitos Treg se caracterizan por la secreción de citoquinas antiinflamatorias IL-10, IL-35 y TGF- β y se diferencian bajo la presencia de la citoquina TGF- β y expresan el factor de transcripción FOXP3 (Grigoriadis & van Pesch, 2015; Lovett-Racke et al., 2011; Sun et al., 2023).

Según estudios realizados en pacientes con EM y en modelos animales de la enfermedad, se determinó que las recaídas son principalmente mediadas por linfocitos T efectores activados, principalmente Th1 y Th17, que migran al parénquima del SNC y causan desmielinización, activación de células gliales y daño axonal (Fujii et al., 2016; Legroux & Arbour, 2015). Una de las potenciales causas, es por un lado, la insuficiencia de la acción de los linfocitos Treg para controlar a los linfocitos efectores y a su vez, la resistencia de los linfocitos T efectores al control por parte de los Treg (Rodríguez Murúa et al., 2022).

1.6.2. Linfocitos T CD8

La importancia de los linfocitos T CD8⁺ en la EM se confirmó con el descubrimiento de dichas células en las lesiones desmielinizantes de la sustancia blanca y gris. Se describió que, en bloques de tejido de placas desmielinizantes del cerebro, obtenidas a partir de autopsias de pacientes, el número de linfocitos T CD8⁺ correlaciona directamente con el daño axonal y es mayor al número de linfocitos T

CD4+ en el sitio de la lesión (Frischer et al., 2009). Por otro lado, los linfocitos T CD8+ contribuyen al daño del SNC a través de la producción de los mediadores proinflamatorios IL-17 (Huseby et al., 2012) y linfoxina (Buckle et al., 2003), granzimas y perforinas (Ifergan et al., 2011). A su vez, se observó que hay un aumento en el número de linfocitos T CD8+ reactivos contra la proteína básica de la mielina (MBP, por sus siglas en inglés, myelin basic protein) en pacientes con EMRR y EMSP comparado con los controles (Salou et al., 2015; C. A. Wagner et al., 2020). Finalmente, la inhibición de los linfocitos T CD8+ beneficia la disminución de recaídas en los pacientes con EM (Salehi et al., 2016).

1.6.3. Linfocitos B

Con respecto a la asociación entre los linfocitos B con la EM, se demostró que los pacientes desarrollan un incremento en la producción de anticuerpos en el SNC, lo cual se evidenció como bandas oligoclonales (BOC, por sus siglas en inglés) en líquido cefalorraquídeo (von Büdingen et al., 2010). También, se observó en los pacientes con EM, una desregulación en el perfil de citoquinas secretadas tanto por linfocitos B vírgenes como de memoria, la secreción anormal de citoquinas proinflamatorias y/o la producción insuficiente de citoquinas reguladoras. En particular, los linfocitos B activados producen cantidades excesivas de TNF, linfoxina, GM-CSF e IL-6 en estos pacientes (Cencioni et al., 2021). Finalmente, además de su rol como células productoras de anticuerpos o células productoras de citoquinas, los linfocitos B son eficientes células presentadoras de antígenos (CPA). La secreción de citoquinas y la producción de moléculas coestimuladoras pueden activar los linfocitos T proinflamatorios, modular su respuesta e inducir el reclutamiento de otros agentes inflamatorios como los monocitos al SNC (Lehmann-Horn et al., 2015; R. Li et al., 2016) (**Figura 3**). Siguiendo la evidencia mencionada con anterioridad, se evaluaron varios tratamientos dirigidos contra los linfocitos B. De hecho, el rol de los linfocitos B en la patología de la EM está comprobado por el éxito de los tratamientos dirigidos contra estas células (anti-CD20), inclusive en su fase progresiva (Greenfield & Hauser, 2018; Sabatino et al., 2019).

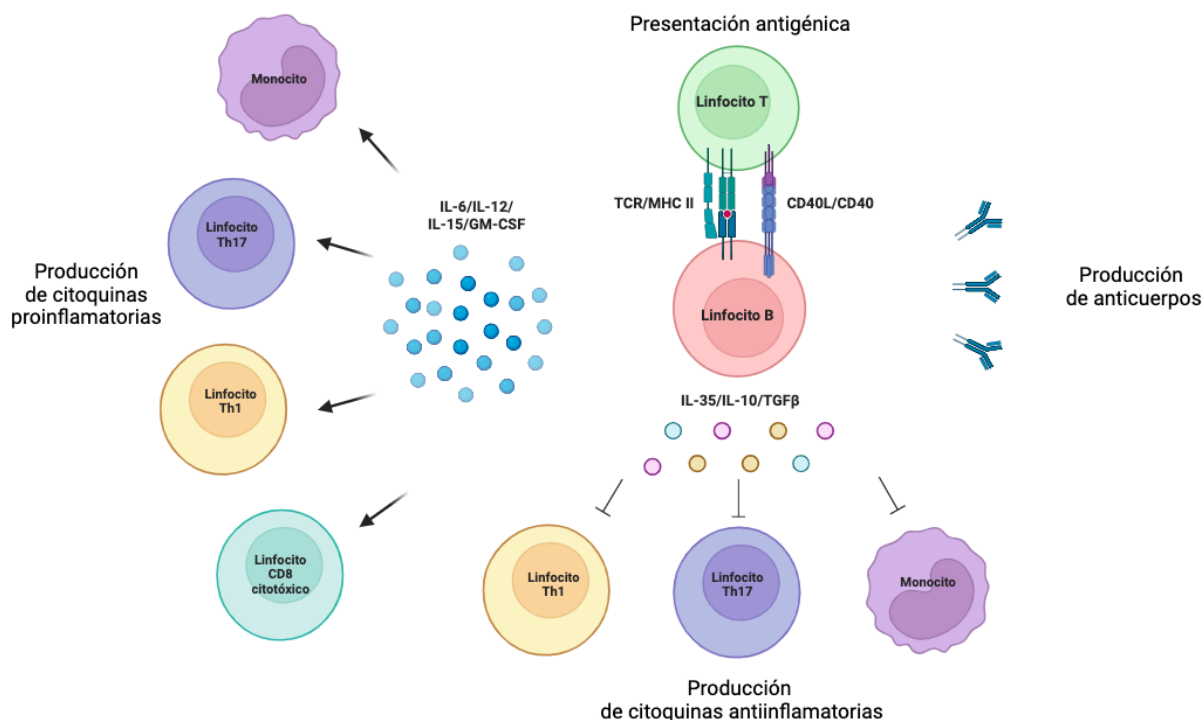


Figura 3: Interacción entre linfocitos B y T. Los linfocitos B pueden actuar como CPA presentando un antígeno a los linfocitos T en el contexto del MHC de clase II. Dicha interacción desencadena la producción de distintas citoquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, así como también la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B activados.

1.6.4. Astroцитos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC y tienen un rol dual en la patogénesis de la EM. Por un lado, contribuyen con la progresión de la enfermedad secretando citoquinas, metabolitos neurotóxicos y quimiocinas que promueven la migración de las células de la periferia al SNC (Correale & Farez, 2015) y, en paralelo, promueven la migración, proliferación y diferenciación de los precursores de oligodendrocitos que contribuyen con la remielinización (Moore et al., 2011). El rol de los astrocitos en la patogénesis de la enfermedad y la reparación del daño inflamatorio depende del microambiente que lo rodea, así como también de la interacción con otras células y factores que influyen en su activación (Wheeler & Quintana, 2019; Williams et al., 2007).

1.6.5. Microglia y macrófagos

Bajo condiciones fisiológicas normales, el número y la función de la microglía (macrófagos residentes del SNC) está controlado por el microambiente local; sin embargo, un estudio previo demostró que en la EM la microglía adopta un estado de activación que favorece la neurodegeneración (Perry & Holmes, 2014). Más aún, el mismo estudio demostró que el mencionado estado de activación de la microglía se vió influenciado tanto por factores internos (como la inflamación) o factores externos

(como las infecciones). Estos factores provocan la liberación de citoquinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios, que a su vez afectan la respuesta humoral de los linfocitos B y la función neuronal (Andersson & Tracey, 2012). La microglía activada puede adoptar dos perfiles contrapuestos, M1 (perfil citotóxico o proinflamatorio) y M2 (perfil inmunoregulador o antiinflamatorio), que se diferencian por las citoquinas y mediadores moleculares que secretan (Mosser & Edwards, 2008). El perfil M1 es el responsable de secretar citoquinas como IL-12 e IL-23, quimiocinas y demás metabolitos que están involucrados en el mecanismo de neurodegeneración y también actúan como CPA. Por su parte, el perfil M2 está involucrado en la eliminación del debris, necesario para la remielinización (Rodríguez Murúa et al., 2022).

1.7. Mecanismos inmunológicos involucrados en el desarrollo de la EM

Si bien el mecanismo a través del cual se produce el desarrollo de la EM todavía es desconocido, se postula que la patogénesis de la enfermedad está basada en la activación de células inmunes autorreactivas contra las proteínas de la mielina (Fletcher et al., 2010; R. Liu et al., 2022). La mielina forma una vaina que rodea los axones y los cuerpos celulares de las neuronas. La vaina está compuesta por distintas proteínas como la proteína básica de la mielina (MBP, por sus siglas en inglés), la glicoproteína asociada a mielina (MAG, por sus siglas en inglés) y la proteína proteolipídica. A su vez, en su superficie se encuentra la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG, por sus siglas en inglés) que funciona como receptor y conecta fibras mielinizadas vecinas (Aggarwal et al., 2011; Kister & Kister, 2023).

Hasta el día de la fecha, el mecanismo a través del cual los linfocitos T se vuelven autorreactivos todavía no fue elucidado, pero se postula que podría ocurrir por: a) Reacción cruzada con antígenos extraños o b) El reconocimiento de antígenos provenientes del SNC que se filtran a los ganglios linfáticos (Martinsen & Kursula, 2022; Münz et al., 2009). En cualquiera de los dos escenarios, las CPA capturan los antígenos y se los presentan a los linfocitos T autorreactivos en los ganglios linfáticos. Luego de su activación y diferenciación en la periferia a distintos subtipos proinflamatorios, los linfocitos T autorreactivos migran al SNC atravesando la barrera hematoencefálica. Una vez en el SNC, los linfocitos T autorreactivos pueden interactuar con células dendríticas, microglía y otras CPA que presentarán antígenos en el contexto del MHC de clase II (Major histocompatibility complex, por sus siglas en inglés); de esta forma los linfocitos T autorreactivos pueden activarse (Becher et al., 2006; Greter et al., 2005; R. Liu et al., 2022). A su vez, la estimulación y activación de los linfocitos T autorreactivos conduce a la expansión clonal de los linfocitos T CD4+, que se diferenciarán en los subtipos Th1 y Th17, productores de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α , IL-17 y GM-CSF (por sus siglas en inglés, Granulocyte macrophage colony stimulating factor). La presencia de las mencionadas citoquinas en el microambiente activa a macrófagos, células dendríticas, astrocitos y

células de la microglía, quienes en forma subsecuentemente, reclutan linfocitos B, linfocitos T CD8+ citotóxicos y mastocitos. El reclutamiento de todas estas células y la producción de citoquinas proinflamatorias, junto con otras moléculas neurotóxicas, conduce a la inflamación y promueve el daño del sistema nervioso central a través de la destrucción de la mielina y los oligodendrocitos (Rodríguez Murúa et al., 2022; G. F. Wu & Alvarez, 2011) (*Figura 4*).

Además de los linfocitos T autorreactivos, también existe una población de linfocitos B autorreactivos. Según la literatura, existen estudios que sugieren que la presentación antigénica y coestimulación de linfocitos B autorreactivos en el SNC podría activar linfocitos T proinflamatorios, que secretarían de forma recíproca citoquinas inflamatorias y a través de la interacción activaría nuevos linfocitos B autorreactivos. De forma simultánea, los linfocitos B autorreactivos podrían diferenciarse a células plasmáticas productoras de anticuerpos, que reconocen las vainas de la mielina y las proteínas de los oligodendrocitos. La unión de los anticuerpos a sus blancos induce la activación de complemento y promueve el daño tisular, pero también activaría otras células como las NK que a través de un mecanismo citotóxico también contribuyen a la destrucción de los tejidos (Comi et al., 2021; Dhaiban et al., 2021; R. Li & Bar-Or, 2019).

Por su parte, durante el periodo de remisión los pacientes con EM atraviesan una etapa de recuperación, que puede ser completa o parcial, y donde ocurre la remielinización de los axones; un proceso que se basa en la reparación de las vainas de mielina dañadas. Las células involucradas en la remielinización son las células de la microglía, células precursoras de oligodendrocitos, oligodendrocitos maduros y astrocitos (Maciak et al., 2023). Los oligodendrocitos son las principales células productoras de mielina en el SNC y son las responsables de reconstruir las vainas de la mielina luego del daño. Las células de la microglia y los astrocitos tienen un rol fundamental en el proceso de reparación, a través de la eliminación de las células dañadas, así como también en la producción de citoquinas y factores de crecimiento (Uyeda & Muramatsu, 2020). Otras células importantes durante el proceso de remisión son los linfocitos T reguladores que secretan citoquinas inmunosupresoras y otras moléculas antiinflamatorias, que regulan y limitan la inflamación del SNC (Mascanfroni et al., 2015).

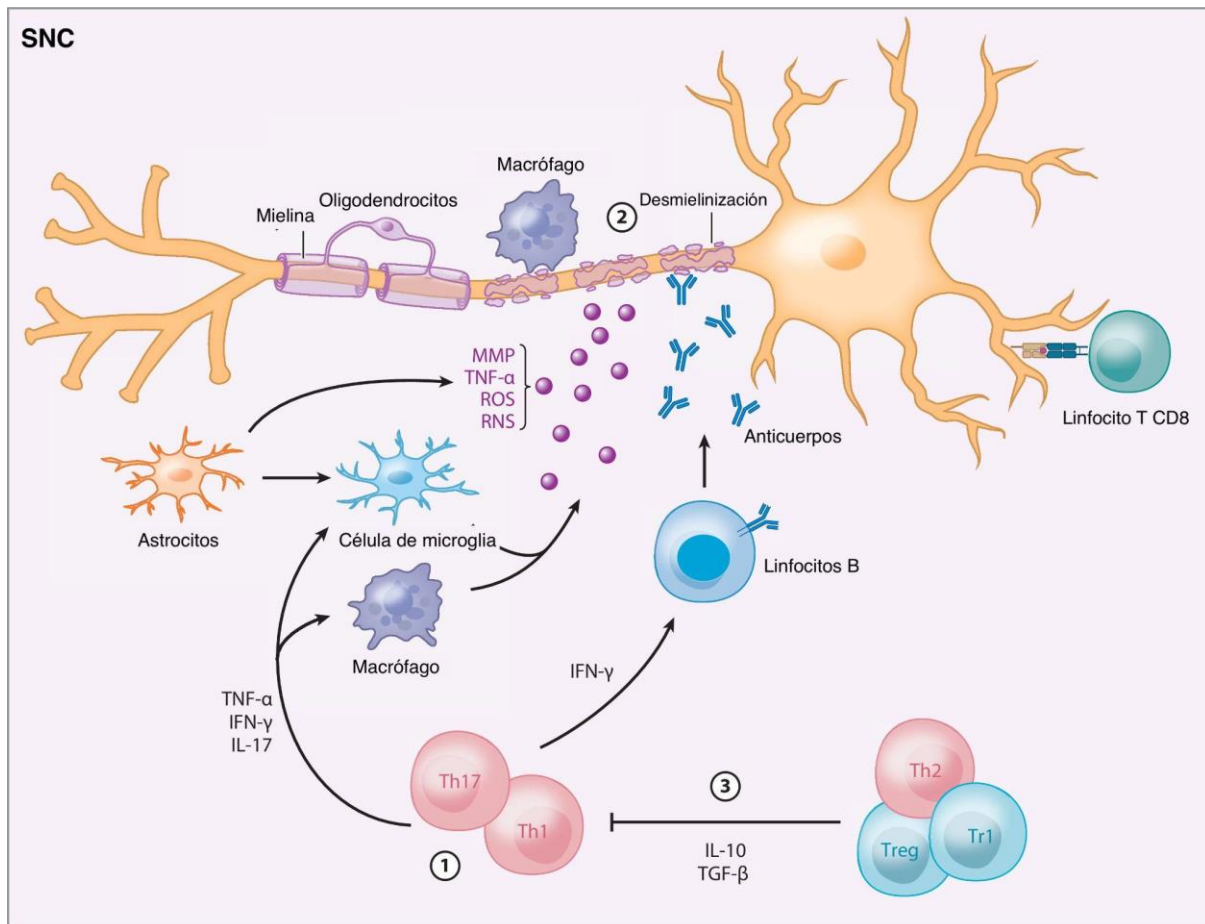


Figura 4: Mecanismos inmunes involucrados en el daño a la mielina. 1) Los linfocitos Th1 y Th17 secretan distintas citoquinas proinflamatorias que activan la respuesta patológica de macrófagos, células de la microglia y linfocitos B. Dicha respuesta es soportada por los astrocitos que promueven una respuesta inmune adicional a través de la secreción de citoquinas y quimiocinas. 2) El daño a la mielina y a los axones, se produce por el accionar de linfocitos B, macrófagos, células de la microglia y astrocitos. 3) La respuesta inflamatoria en el SNC es modulada por los linfocitos T reguladores. Imagen adaptada de (Rodríguez Murúa et al., 2022)

1.8. Etiología

Al día de la fecha, la etiología de la esclerosis múltiple no se encuentra completamente dilucidada dado que no existe un único factor que pueda explicar el establecimiento y desarrollo de esta patología neurodegenerativa en el 100 % de los casos. Sin embargo, y basado en el gran volumen de literatura especializada al respecto, se puede hipotetizar sobre una compleja interacción que involucra a diversos factores, tanto genéticos como ambientales, y que determinarían la susceptibilidad de un individuo a desarrollar la enfermedad (Alfredsson & Olsson, 2019; Goodin et al., 2021; Olsson et al., 2017; Waubant et al., 2019). En este sentido, se describió que la variabilidad genética sólo podría explicar, aproximadamente, el 30 % del riesgo de desarrollar EM (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019a), mientras que el 70 % restante debería ser atribuido a factores ambientales tales como la obesidad, el hábito tabáquico, la falta de vitamina D o infecciones por virus de la familia

Orthoherpesviridae, en particular el virus de Epstein Barr (EBV) (Belbasis et al., 2020; Vandebergh, Degryse, et al., 2022; Waubant et al., 2019).

1.8.1. Factores genéticos

La genética cumple un rol importante en el desarrollo de la EM, particularmente en el caso de la EM familiar. Esto fue descrito en múltiples estudios en grupos familiares con EM, donde el factor genético preponderó sobre los factores ambientales (Hansen et al., 2005; O’Gorman et al., 2013; Willer et al., 2003). Más aún, según estudios previos, el riesgo de desarrollar EM familiar en gemelos monocigóticos es del 17 %, en comparación con el 2 % en el caso de gemelos dicigóticos. De forma similar, el hecho de tener un hermano con EM aumenta el riesgo del individuo entre 20 y 40 veces, comparado con individuos sin historia familiar de EM (Ascherio et al., 2012; Ehtesham et al., 2021; Reich et al., 2018; Sawcer et al., 2014). A través de estudios de secuenciación de exoma de distintas familias con múltiples miembros que padecían EM, se ha identificado variantes genéticas en los genes, CYP27B1, TYK2, NR1H3 y NLRP1 (Dyment et al., 2012; Maver et al., 2017; Ramagopalan et al., 2011; Z. Wang et al., 2016). Sin embargo, aún no se han descrito variantes genéticas con alta penetrancia en la EM que estén presentes en todos los miembros de familias o en todas las familias con EM familiar (Farez et al., 2014). Si bien estos estudios demostraron una relación genética en los casos de EM familiar, no explican el desarrollo de dicha enfermedad en individuos sin historia familiar de EM. En este sentido, cabe resaltar que la mayor proporción de casos de EM corresponde a individuos sin antecedentes familiares dado que la EM familiar solo incluye el 12,6 % del total de casos (Ehtesham et al., 2021; Harirchian et al., 2018).

En años recientes, y gracias a la aparición y desarrollo de distintas técnicas de secuenciación masiva del ADN, se han detectado más de 200 regiones genéticas distintas que confieren susceptibilidad al desarrollo de la EM (Beecham et al., 2013; Patsopoulos, 2018; Thompson, Baranzini, et al., 2018). Hasta el momento, la evidencia más contundente, sobre dicha susceptibilidad es la relación con algunos alelos del complejo mayor de histocompatibilidad, particularmente el alelo de riesgo HLA-DRB15:01 (Kular et al., 2018; Murata, 2023; Patsopoulos et al., 2013) y la ausencia del alelo protector HLA-A*02:01 (Maghbooli et al., 2020; Ogawa et al., 2019). En este sentido, estudios previos reportaron que la prevalencia de dicho alelo está relacionado con un desarrollo más temprano de la enfermedad, así como también se relaciona con el sexo femenino, el empeoramiento de los síntomas, la presencia de BOCs en LCR, una mayor carga lesional en el cerebro y atrofia cortical (Balcerac & Louapre, 2022; Balnyte et al., 2013; Hollenbach & Oksenberg, 2015). El péptido autoantigénico presentado por el alelo HLA-DRB15:01, es el péptido de la proteína básica de la mielina (MBP) MBP₈₅₋₉₉ (Mamedov et al., 2020). A su vez, muchos de los polimorfismos únicos de nucleótidos detectados yacen en regiones regulatorias o en la región codificante de genes asociados a la función inmunológica. En este contexto,

y por mencionar los más relevantes, entre otros se han descrito diferentes polimorfismos en los genes *IL-17R*, *IL-2RA*, *TNFR1*, *BAFF*, *CYP2R1* e *IQGAP1* (Dobson & Giovannoni, 2019; Waubant et al., 2019).

1.8.1.1. *IQGAP1 (IQ motif containing GTPase activating protein 1)*

La proteína IQGAP1 pertenece a la familia de las proteínas IQGAP que incluye a IQGAP1, IQGAP2 e IQGAP3, todas las isoformas comparten estructura, dominios y la función de mediar interacciones proteína-proteína (Hedman et al., 2015). IQGAP1 es la isoforma mejor caracterizada y es expresada de forma ubicua en todos los tipos celulares (Delgado et al., 2021; Malarkannan et al., 2012). A través de su interacción con múltiples proteínas blanco, participa en la regulación de funciones celulares que incluyen: señalización calcio/calmodulina a través de su interacción directa con ambas moléculas y la formación de un complejo que regula la progresión del ciclo celular y la arquitectura del citoesqueleto. También regula la señalización CDC42 y Rac1; a través de su interacción IQGAP1 inhibe la actividad intrínseca de la GTPasa de Cdc42 y Rac1 para estabilizar la unión de GTP en su forma activa y de esta forma regula el *crosslinking* de los filamentos de actina, la dinámica de los microtúbulos y la adhesión célula-célula mediada por E-cadherina, transcripción mediada por β -catenina, tráfico de vesículas intracelulares, regulación de diversos factores nucleares y señalización celular (Briggs & Sacks, 2003; S. Choi & Anderson, 2016; Hedman et al., 2015; Thines et al., 2023; Watanabe et al., 2015). A su vez, se relaciona a la proteína IQGAP1 con el desarrollo de cáncer, ya que se reportó su sobreexpresión en diversos tipos de tumores, como el carcinoma hepatocelular, el melanoma, el carcinoma de mama, cáncer de colon y en gliomas (Hebert et al., 2020; Peng et al., 2021; White et al., 2009). Sin embargo, diversos estudios *in vivo* presentaron resultados contrapuestos sobre ésta teoría; mientras que en una serie de trabajos se demostró que el aumento en la expresión de *IQGAP1* contribuiría al crecimiento tumoral y a la desmejoría en el pronóstico (Jameson et al., 2013; Liang et al., 2017; Wei & Lambert, 2021), otros estudios demostraron que la delección de *IQGAP1* en células tumorales o estromales beneficiaría la tumorigénesis modulando la actividad de la proteína que codifica para el factor de crecimiento transformante (*TGF*, por sus siglas en inglés) a través de su unión al receptor de TGF (Bessède et al., 2016; Hensel et al., 2015; C. Liu et al., 2013; Wei & Lambert, 2021). De modo similar, también se relaciona la actividad regulatoria de IQGAP1 con la modulación de células del sistema inmunitario, en particular con células *Natural Killer* (NK) (Abel et al., 2018a; Awasthi et al., 2010) y linfocitos T y B (Lella & Malarkannan, 2023; Malarkannan et al., 2012; J. C. Wang et al., 2017). Se determinó que IQGAP1 modula negativamente la respuesta inmune de los linfocitos T, así como también que su eliminación conduce a un aumento de la producción de citoquinas y una mayor proliferación de los linfocitos T (Okuyama et al., 2020). Más aún, según reportes previos usando un modelo *in vivo* de ratón, se demostró que la inflamación en el cerebro y la espina dorsal resultó ser más severa en ratones *knockout* para IQGAP1 en comparación con los ratones salvajes; motivo por el cual

se postuló que IQGAP1 podría estar implicada en desórdenes inflamatorios (Gorman et al., 2012b; Okuyama et al., 2020; S. Sharma et al., 2011). En paralelo, y en cuanto a la relación entre la proteína IQGAP1 y la EM, según un estudio bioinformático se determinó que IQGAP1 se encuentra sobreexpresado en 18/19 tejidos de pacientes con EM, en comparación con individuos control (A. Liu et al., 2022). Sin embargo, según este estudio, la expresión de la molécula CD40 se encontraría disminuida en células de los pacientes con EM comparado con los controles y esta información es contradictoria a lo que indica el resto de los autores, donde han visto un aumento en la expresión de CD40 asociada al riesgo del desarrollo de la enfermedad (Casiraghi et al., 2015; Fadul et al., 2021). Por su parte, se describió que el polimorfismo de nucleótido único (SNP, por su sigla en inglés): *rs11609*, correspondiente al cambio C/G en la posición cromosómica 90500533, en el gen *IQGAP1* se encuentra asociado al riesgo de desarrollar EM. Más aún, la modificación del riesgo por parte de este SNP también varía en función de si se encuentra en homocigosis o heterocigosis, dado que en individuos que presentan homocigosis del alelo *rs11609* se reportó un aumento en la expresión del ARNm de *IQGAP1* en comparación con individuos que portan el alelo salvaje (Keshari et al., 2016).

1.8.2. Factores ambientales

Teniendo en cuenta que la susceptibilidad genética sólo puede explicar una fracción del incremento en el riesgo del desarrollo de la EM, el estilo de vida y los factores ambientales deben ser considerados al momento de calcular el riesgo asociado a dicha enfermedad. Si bien podrían ser factores aditivos independientes, también se considera la posibilidad de que haya una interacción sinérgica entre los distintos factores (Jacobs et al., 2020; Waubant et al., 2019). Más allá de que el estudio y la cuantificación de los factores ambientales es más complejo que el análisis genético, resulta de gran importancia identificarlos y poder así accionar sobre los mismos, o incluso prevenirlos. La evidencia más contundente, referida al riesgo del desarrollo de EM, es al día de la fecha, la relacionada con: el hábito tabáquico, la obesidad durante la adolescencia, los bajos niveles de vitamina D y las infecciones virales (particularmente con el virus Epstein Barr) (J. Huang, Kockum, et al., 2022; Maroufi et al., 2021; Zarghami et al., 2021).

1.8.2.1. Hábito tabáquico

Distintos metaanálisis así como también revisiones de literatura describieron una fuerte asociación entre el hábito tabáquico y el riesgo del desarrollo de la EM (Handel et al., 2011; Hernán et al., 2005; Manouchehrinia et al., 2022; Nishanth et al., 2020.). Según estudios epidemiológicos, existe un aumento de hasta el 50 % en el riesgo de desarrollar EM en individuos que fuman comparado con individuos que nunca fumaron (Poorolajal et al., 2017). Dicha asociación estaría relacionada directamente con la cantidad de cigarrillos que se consumen por día (dosis dependiente) así como también de la cantidad de

años durante los cuales se mantuvo el hábito tabáquico (Hedström et al., 2013; Pekmezovic et al., 2006). Más aún, también se estableció una relación entre la progresión de la enfermedad y el consumo de cigarrillos. En este sentido, fumar de manera regular se asoció con un fenotipo progresivo de la enfermedad y el agravamiento de la discapacidad, mientras que dejar de fumar, ya sea antes o después del inicio de la enfermedad, se relacionó con una progresión más lenta de la discapacidad (Healy et al., 2009; Hernán et al., 2005; Manouchehrinia et al., 2013). Si bien se propusieron varios mecanismos a fin de explicar los efectos adversos del hábito tabáquico, incluyendo los efectos sobre la desmielinización, la producción de citoquinas proinflamatorias, la alteración de la barrera hematoencefálica, los efectos inmunomoduladores y el aumento del óxido nítrico y los metabolitos del óxido nítrico, todos permanecen aún bajo estudio y sujetos a discusión (Arneth, 2020; Ascherio et al., 2012; Nishanth et al., 2020.).

1.8.2.2. Sobrepeso y Obesidad

Según los estudios llevados a cabo en distintas poblaciones, se estableció que existe una ventana de tiempo crítica, durante la cual un factor de riesgo tiene un mayor efecto en el desarrollo de la enfermedad; tal sería el caso de la obesidad. En este sentido, se demostró que la obesidad durante la adolescencia es un factor crítico que aumenta el riesgo de desarrollar EM en la edad adulta (Cortese et al., 2018; Høglund et al., 2021; Schreiner & Genes, 2021; Wesnes et al., 2015). Por el contrario, otros estudios demostraron que la práctica diaria de ejercicio parecería ser un factor protector e incluso que podría ayudar a combatir los efectos secundarios de la enfermedad, a través de la modulación de factores inmunitarios y hormonas asociadas al estrés (Cortese et al., 2018; C. Li et al., 2022; Mokhtarzade et al., 2019). Si bien se encontró evidencia que relaciona la EM con la obesidad, los mecanismos a través de los cuales el índice de masa corporal (IMC) influencia el curso de la enfermedad no están del todo claros. En la actualidad, existen 3 propuestas principales que buscan dar respuesta a esta relación: i) El tejido adiposo produce y libera citocinas proinflamatorias, tales como $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$, que promueven la respuesta Th1 y reducen la actividad de las células T reguladoras (Marrodan et al., 2021; Matarese et al., 2005). ii) Los individuos con elevado IMC, y que a su vez portan el alelo de riesgo *HLA-DRB15:01*, poseen 14 veces mayor posibilidad de desarrollar EM, comparado a los individuos que poseen el alelo protector *HLA-A*02* (Gianfrancesco et al., 2017; Hedström et al., 2014). iii) Las personas con mayor IMC presentan niveles más bajos de vitamina D que las personas con un IMC normal, siendo que los bajos niveles de vitamina D son considerados como un factor asociado al riesgo de desarrollar EM (Harroud et al., 2021; Jacobs et al., 2020; Tobias et al., 2023; Vandebergh, Dubois, et al., 2022).

1.8.2.3. Dosaje de vitamina D

Numerosos estudios demostraron que el incremento en los niveles de vitamina D antes de los 20 años, así como también su suplementación durante la edad adulta, confieren protección frente a la EM (Ascherio et al., 2012; K. L. Munger et al., 2006; Olsson et al., 2017). Por el contrario, el déficit en los niveles de vitamina D se correlacionan con un aumento en la actividad de la enfermedad y la progresión de la misma a lo largo del tiempo (Ascherio et al., 2014; Sandberg et al., 2016). El rol de la vitamina D en el desarrollo de la EM está sustentado también por evidencia genética. Se detectaron ciertos polimorfismos que se encuentran en regiones cercanas a genes involucrados en el metabolismo o regulación de la misma, que estarían involucrados en un aumento de susceptibilidad de la EM. Por ejemplo, en los genes que codifican para las proteínas CYP27B1 (Simon et al., 2011; Sundqvist et al., 2010), DHCR7, CYP24A1 y CYP2R1 (T. J. Wang et al., 2010). En forma adicional, también se demostró la interacción entre este factor ambiental y el alelo de riesgo *HLA-DRB15:01* (Handunnethi et al., 2010; Ramagopalan & Ebers, 2009). En particular, se identificó un elemento funcional de respuesta de vitamina D (VDRE, por sus siglas en inglés) localizado en la región promotora del *HLA-DRB1* al cual se une la vitamina D y particularmente este elemento siempre está presente en el haplotipo *HLA-DRB1*15* (Ramagopalan et al., 2009). Tal como ocurre para el resto de los factores ambientales involucrados en el aumento de susceptibilidad de la EM, el mecanismo a través del cual la vitamina D confiere un efecto protector aún es desconocido. La teoría más aceptada en la actualidad, postula principalmente su rol como factor inmunomodulador (Correale et al., 2009; Saini et al., 2016). Esta teoría se sustenta en el hecho de que en su forma activa, la vitamina D está involucrada en la activación y proliferación de linfocitos B y T, la diferenciación de linfocitos T a los perfiles Th1, Th17 y Treg, el reclutamiento de linfocitos T específicos de tejido y la producción de distintos isotipos de anticuerpos específicos (IgA e IgG), todos procesos desregulados en una enfermedad autoinmune como la EM (Dudani et al., 2011; Miclea et al., 2020; Mora et al., 2008; Sintzel et al., 2017). Sin embargo, los estudios clínicos randomizados de suplementación de vitamina D a pacientes con EM, no demostraron un impacto efectivo en la enfermedad (Cassard et al., 2023; Dörr et al., 2020; Hupperts et al., 2019).

1.8.2.4. Agentes infecciosos

Uno de los factores más estudiados en los últimos años en relación con el riesgo de desarrollar la EM es la presencia de agentes infecciosos, especialmente los virus de la familia *Orthoherpesviridae*, como el *Varicellovirus humanalpha3* (virus Varicela Zoster), *Lymphocryptovirus humangamma4* (virus de Epstein Barr), *Cytomegalovirus humanbeta5* (Citomegalovirus) o los *Roseolovirus humanbeta6a* y *Roseolovirus humanbeta6b*, donde los dos últimos son virus muy relacionados y conjuntamente denominados herpesvirus humano 6 (Donati, 2020; Sedighi et al., 2022a; J. O. Virtanen & Jacobson, 2012). En forma adicional, también se describió que las infecciones bacterianas por *Chlamydia*

pneumoniae y *Staphylococcus aureus* podrían actuar como factores iniciadores del desarrollo de la esclerosis múltiple (Alinezhad et al., 2021; Arjmandi et al., 2023; Cossu et al., 2018). La principal relación que se encuentra con la enfermedad es la epidemiología, el aumento de la respuesta inmunitaria a los agentes infecciosos, la evidencia en modelos animales o en otras enfermedades desmielinizantes que demuestran que los patógenos mencionados podrían inducir daño de la mielina con una conservación relativa de los axones, provocando daños en el sistema nervioso central e inflamación (Marrodan et al., 2019; Venkatesan & Johnson, 2014).

1.8.2.4.1. Citomegalovirus

El Citomegalovirus (CMV), o *Cytomegalovirus humanbeta5*, infecta a más del 70 % de la población mundial. Se transmite principalmente a través de la vía sexual o el contacto con saliva u orina del individuo infectado. Sus células diana son las del linaje mieloide, en especial macrófagos y células dendríticas y se replica en las glándulas salivales y el tejido cerebral (Griffiths et al., 2015; Gupta & Shorman, 2023; Olival et al., 2013). Si bien en la mayoría de los casos, la infección es asintomática, luego de la infección primaria, el CMV permanece latente en las células presentadoras de antígenos que, ocasionalmente pueden reactivarse y presentar el antígeno a las células T, promoviendo la activación y expansión de linfocitos T $CD4^+CD28^{null}$, que se postuló podrían contribuir a la patología de enfermedades autoinmunes (Hanley & Bollard, 2014). La evidencia al día de la fecha que propone una asociación del CMV con la EM es contradictoria; dado que existen estudios que lo postulan como posible responsable en el desarrollo de la EM, mientras que otros postulan que su rol podría ser protectorio (Thakolwiboon et al., 2020a; Vanheusden et al., 2015a). La evidencia a favor de un rol perjudicial en la enfermedad se basa en que los pacientes con EM presentan mayor seropositividad y, a su vez, tienen mayores títulos de anticuerpos IgG específicos anti-CMV y carga viral, comparado con los individuos sanos (Horakova et al., 2013; Salim et al., 2017; Sanadgol et al., 2011). Sumado a esta evidencia, se determinó que los pacientes seropositivos para CMV presentan mayor atrofia de la sustancia gris y del cerebro en comparación con los individuos CMV negativos (Zivadinov et al., 2014). Por otro lado, existe evidencia en favor de un rol protectorio de la enfermedad, según estudios de metaanálisis o estudios previos al desarrollo de la EM, la seropositividad del CMV estaría asociada con una reducción en el riesgo del desarrollo de la enfermedad y con menor atrofia cerebral (Grut et al., 2021; Sundqvist et al., 2014; Zivadinov et al., 2006a). Dado lo expuesto anteriormente, el rol del CMV en la patología de la enfermedad es aún especulativo y sin implicancias en el cuidado o la prevención de la enfermedad (Alari-Pahissa et al., 2018; Grut et al., 2021; Pakpoor, Pakpoor, et al., 2013).

1.8.2.4.2. Virus Varicella Zoster

En países templados, la infección con el Virus Varicella Zoster (VZV, por sus siglas en inglés), o *Varicellovirus humanalpha3*, ocurre normalmente durante la niñez; y en edad adulta, aproximadamente

un 90-95 % de los individuos son seropositivos para la VZV (Amjadi et al., 2017; Gershon et al., 2015). Por su parte, en países tropicales o subtropicales la seroprevalencia disminuye, siendo en este caso del 40-60 % en países como Pakistán, Singapur e India o aproximadamente del 80 % en Emiratos Árabes y Arabia Saudita (Daulagala & Noordeen, 2018). El contagio ocurre a través de aerosoles respiratorios o el contacto directo con los fluidos de las vesículas. Durante la infección primaria, el virus infecta células epiteliales, en las cuales se replica, y los viriones liberados se esparcen hacia los ganglios linfáticos (Zerboni et al., 2014). Luego de la primoinfección el virus permanece en estado de latencia en los ganglios dorsales (Ayoade & Kumar, 2023). Tal como ocurre con el CMV, la evidencia de la relación entre el VZV y la EM es inconclusa dado que en la literatura médica existen trabajos que describen su papel como cofactor en el desarrollo de la enfermedad, así como también existen estudios que le asignan un rol protectorio (Khalesi et al., 2023; Rice et al., 2021; K. Sharma et al., 2022). En este sentido, una revisión de 6 estudios observacionales de la población determinó un aumento en el riesgo de desarrollar EMRR en los individuos con infección pasada por VZV (McKay et al., 2015). En el mismo sentido, otros estudios lograron detectar ADN del virus tanto en LCR (100 %) como en CMSP (90 %) durante los episodios de recaídas, mientras que durante la etapa de remisión dichos porcentajes disminuyen (Rodríguez-Violante et al., 2009a; Sotelo et al., 2014). La presencia de ADN viral en los mencionados compartimentos durante el período de recaída de la enfermedad implicaría una reactivación del virus y que la misma podría estar participando de la patogénesis de la enfermedad (Sotelo et al., 2007a). Por otro lado, distintos autores no validaron dicha relación, demostrando que el ADN del virus en los individuos con EM es indetectable tanto en el suero como en el LCR o que no existe correlación entre la seroprevalencia del VZV y la enfermedad (Franciotta et al., 2009; Marrie, 2004; Marrie & Wolfson, 2001a).

1.8.2.4.3. Generalidades del Epstein Barr

El virus Epstein Barr (EBV, por sus siglas en inglés) o *lymphocryptovirus humangamma4*, es un virus ubicuo, que se estima que infecta a más del 90 % de la población mundial (Damania et al., 2022; Gross et al., 2010; Hoover & Higginbotham, 2023; Tzellos & Farrell, 2012). El EBV es uno de los herpesvirus humanos que evolucionó juntamente con el hombre, desarrollando estrategias de persistencia a largo plazo beneficiosas para la supervivencia viral (Ba Abdullah et al., 2017; Berenstein et al., 2018). La edad de contagio del EBV está influenciada principalmente por los factores socioeconómicos de la población. Típicamente, en países en vías de desarrollo, donde los niños están en contacto muy estrecho con sus pares y comparten juguetes, biberones y utensilios, la infección primaria es asintomática y ocurre durante la infancia (P. A. Chabay & Preciado, 2013). Por su parte, en países desarrollados, la primoinfección con EBV suele demorarse hasta la adolescencia o adultez temprana, donde la infección suele producir síntomas más severos, conocidos como mononucleosis infecciosa (MI) (Mohseni et al., 2023; Rostgaard et al., 2019). Por su parte, el EBV tiene la capacidad de transformar células B *in vitro*

e *in vivo* y debido a esto la Asociación Mundial de la Salud lo considera un agente carcinógeno tipo 1 en humanos desde el año 1997 (Humans, 1997). El potencial oncogénico del EBV fue demostrado por infecciones *in vitro* de linfocitos B y su posterior transformación en líneas celulares linfoblastoides (Saha & Robertson, 2019). Si bien el EBV no infecta animales pequeños de laboratorio (F. Wang, 2013), a través de un estudio *in vivo* se demostró la capacidad del EBV de transformar fibroblastos de ratón y volverlos tumorales (D. Wang et al., 1985). Otras aproximaciones que lograron realizarse hasta el momento incluyen el uso de ratones transgénicos que desarrollan tumores de linfocitos B y la infección con el EBV en ratones reconstituidos con células hematopoyéticas humanas que transitan un linfoma (Münz, 2017b; Sommermann et al., 2020). El EBV es relacionado con una variedad de enfermedades neoplásicas tales como: carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, carcinoma gástrico y desórdenes linfoproliferativos post trasplante (Ayee et al., 2020; P. J. Farrell, 2019; Kanda et al., 2019; Neves et al., 2017; Shannon-Lowe & Rickinson, 2019; Wong et al., 2022).

1.8.2.4.3.1. Distribución geográfica y variación genética del EBV

El EBV infecta en forma exitosa a todas las poblaciones en todas las regiones geográficas del planeta; sin embargo, presenta variaciones geográficas en cuanto a la distribución de genotipos virales y porcentaje de asociación con las diferentes patologías neoplásicas. Se han identificado dos tipos virales: EBV1 y EBV2 (antiguamente denominados tipo A y B). EBV1 y EBV2 difieren principalmente en la secuencia de los genes que codifican para los antígenos nucleares EBNA2, EBNA3A, EBNA3B y EBNA3C (Humans, 2012; Murata, 2023; Sample et al., 1990). El EBV de tipo 1 es el más predominante en el mundo, presente en Europa, Asia y América (Norte y Sur), mientras que el EBV de tipo 2 se encuentra principalmente en Alaska, Papúa Nueva Guinea y África Central (Blazquez et al., 2021; Chiara et al., 2016; Correia et al., 2018; Neves et al., 2017; Telford et al., 2020).

Una característica particular de las enfermedades vinculadas al EBV, es la variabilidad en la frecuencia de aparición de estas patologías en distintas regiones del mundo, así como la sintomatología que incluye infecciones asintomáticas, así como también infecciones asociadas a tumores malignos (W. Huang et al., 2023). En particular, el carcinoma nasofaríngeo tiene una alta prevalencia en el sudeste asiático, mientras que en el norte de África es menos común y prácticamente no se detectan casos en América del Sur (C.-L. Hsu et al., 2024). Sin embargo, la asociación con el EBV es del 95 % en todas las regiones geográficas (Su et al., 2023). Por otro lado, el linfoma de Burkitt es común en África ecuatorial, donde la relación con el virus es casi del 100 %, mientras que, en otras partes del mundo, donde se presenta de forma esporádica, su incidencia es más baja, y la vinculación con el EBV varía entre un 20-30 % en países desarrollados, hasta un 90 % en algunas poblaciones, como en el noroeste de Brasil (Al-Khreisat et al., 2023; Brady et al., 2007a). En cuanto al linfoma de Hodgkin (LH), la incidencia es considerablemente más alta en Europa y América del Norte, pero se reduce en América del Sur, siendo raro en África y el sudeste asiático (J. Huang, Pang, et al., 2022; Zhou et al., 2019). La relación con el

EBV varía según el nivel socioeconómico de la región, mostrando una mayor asociación en países en desarrollo que en los desarrollados. No obstante, en Argentina, los porcentajes de asociación son similares a los de los países más avanzados [Chabay et al., 2008; De Matteo et al., 2003; Dinand et al., 2006; Weiss, 2000].

Si bien las variantes virales, basadas en polimorfismos en diferentes genes virales, y asociados principalmente con distintas patologías neoplásicas fueron ampliamente descriptas (Correia et al., 2018; Kanda et al., 2019), sólo se realizaron escasos estudios de variantes virales y su asociación con la EM (Brennan et al., 2010; Mechelli et al., 2015a; Tschochner et al., 2016) y ninguno de estos estudios incluyó pacientes con EM de nuestra región geográfica. Este último hecho es el motor que impulsa la necesidad de caracterizar polimorfismos en genes virales que podrían jugar un papel de importancia en el establecimiento y progresión de la EM, en particular en una población de pacientes y dadores sanos de nuestra región geográfica. En este trabajo de tesis, buscamos caracterizar posibles polimorfismos en los genes que codifican para la interleuquina 10 viral (vIL10) y en el antígeno nuclear 2 de Epstein Barr (EBNA2).

1.8.2.4.3.2. Expresión de genes líticos y de latencia

El genoma del EBV es una molécula de ADN doble cadena de 172 Kpb que codifica para alrededor de 100 genes organizados en 85 marcos abiertos de lectura (ORFs por sus siglas en idioma inglés), que pueden ser transcritos a partir de diferentes promotores. Más aún, el genoma viral posee dos orígenes de replicación, OriP y OriLyt, que posibilitan la replicación del genoma viral en los dos estados de la infección (Smatti et al., 2018a). Esta estructura genómica le permite al virus, la expresión diferencial de genes en las dos fases de la infección: la fase lítica, donde se expresan la mayor parte de los genes virales, y la fase de latencia, en la cual sólo se traducen los 9 genes de latencia (Murata, 2023). Durante la fase lítica, el genoma viral adopta una forma lineal. A lo largo de esta etapa, el virus se replica y genera progenie, motivo por el cual se la conoce también con el nombre de fase replicativa. En esta etapa se expresan todos los ORFs, que se clasifican en inmediatamente tempranos, tempranos y tardíos (Chiu & Sugden, 2016; Gruffat et al., 2016). Los genes inmediatamente tempranos (BZLF1 y BRLF1, que codifican para los antígenos Zta y Rta, respectivamente) actúan como factores de transcripción viral de los genes tempranos. A su vez, son considerados transactivadores del programa viral lítico, ya que son los responsables del cambio desde el estado de latencia al ciclo lítico (Ali et al., 2022; H. Li et al., 2016). Los genes tempranos están involucrados en la replicación, metabolismo, bloqueo de procesamiento antigénico y son proteínas transactivadores de los genes tardíos. Entre los genes tempranos se pueden nombrar: BGLF5 (ADNsa alcalina), BXLF1 (timidina quinasa), BALF5 (ADN polimerasa), BALF2 (proteína de unión al ADN), BMRF1 (antígeno temprano difuso EA/D), BHRF1 (p17), BLRF2 (p23), BSLF1 (primasa), BBLF4 (ADN helicasa), BBLF2 (factor asociado a primasa) y

BCRF1 (vIL10, interleuquina 10 viral) (A. Chakravorty et al., 2019; Shareena & Kumar, 2023). Finalmente, los genes tardíos codifican principalmente para proteínas estructurales; en este sentido se pueden mencionar a las glicoproteínas de la membrana viral, proteínas involucradas en la interacción con el receptor celular, la fusión con la membrana de la célula diana y la entrada viral (BLLF1 (gp350/220 unión con el receptor CD21), BXLF2 (gp85, gH), BKFR2 (gp25, gL), BZLF2 (gp42) y BALF4 (gp 110, gB)), la proteína del tegumento viral BNRF1 (p143) y las proteínas de la cápside viral BCLF1 (VCA p55), BDRF1 (VCA p40) y BFRF3 (VCA p18) (Murata et al., 2021; Yap et al., 2022).

Luego de la infección lítica, el genoma del EBV se circulariza y durante la fase de latencia viral permanece en el núcleo del linfocito B en forma de episoma extracromosómico. En este sentido, se estimó que 1 de cada millón de linfocitos B de memoria permanecen infectados por EBV a lo largo de la vida del portador (Bornkamm & Hammerschmidt, 2001; Buschle & Hammerschmidt, 2020). Durante la fase de latencia, no hay producción de partículas virales y la expresión de la mayor proporción de genes virales se encuentra silenciada, y de esta manera el virus evade al sistema inmunitario del hospedador (Murata, 2023; Price & Luftig, 2015). Existen diferentes programas de latencia viral, y estos dependen del tipo de célula infectada (linfocito B virgen, de centro germinal o de memoria) y/o de la etapa del ciclo infeccioso o de la patología a la cual el virus se encuentra asociado.

Durante la fase de latencia, hay una expresión limitada de antígenos virales. La fase de latencia 0, es caracterizada por el arresto de todas las proteínas virales, sólo se transcriben los ARN no codificantes (BART, BHRF1 y EBER) y se asocia a la infección en un portador sano inmunocompetente (Morgan et al., 2022). En la fase de latencia I, solo se expresa el antígeno EBNA1 (antígeno nuclear 1), durante esta fase los linfocitos B de memoria se multiplican y se asocia con el linfoma de Burkitt (Amon & Farrell, 2005; Frappier, 2021). En la fase de latencia II, se induce la diferenciación de linfocitos B, se expresan los antígenos EBNA1, LMP1/2A y los ARN no codificantes EBERs y BARTs, se relaciona con las células tumorales del carcinoma nasofaríngeo y linfoma de Hodgkin (Price & Luftig, 2015; Yu & Robertson, 2023). La última fase, que es la más activa transcripcionalmente, es la fase de latencia III, en la misma se expresan todos los antígenos de latencia: antígenos nucleares EBNA1, 2, 3, 3A, 3B, 3C y LP y las proteínas de membrana LMPs (LMP1, 2A y 2B) (Bouvard et al., 2009; Price & Luftig, 2015). Dicha fase se encuentra asociada con desórdenes linfoproliferativos postrasplante, desorden linfoproliferativo ligado al cromosoma X y mononucleosis infecciosa (Frappier, 2021; Yu & Robertson, 2023).

1.8.2.4.3.3. Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación del EBV se divide en tres fases: infección primaria, latencia y reactivación lítica. El EBV se propaga a través de la saliva de un portador, y la infección primaria ocurre en la cavidad oral (orofaringe), principalmente en las amígdalas de un individuo susceptible. Según la teoría aceptada en

la actualidad, el virus tiene la capacidad de infectar células epiteliales donde se produce la infección lítica, con producción de nuevas partículas virales que conduce a la amplificación y liberación del virus que finalmente infectaran a los linfocitos B vírgenes subyacentes. Por su parte el EBV también tiene la capacidad de traspasar el epitelio faríngeo e infectar directamente los linfocitos B (Bu et al., 2022; Tonoyan et al., 2019). El virus EBV se une a través de la proteína viral gp350, a la proteína CD21 presente en los linfocitos B vírgenes, seguido de la interacción de la proteína viral gp42 con la molécula MHC de clase II (Shannon-Lowe & Rowe, 2014). A su vez, como las células epiteliales carecen de la proteína CD21, la unión se produce por la interacción entre BMRF-2 (presente en el EBV) y la integrina $\beta 1$ (presente en las células epiteliales) (Speck et al., 2000; Xiao et al., 2009). Una vez que el virus es internalizado por la célula, su genoma es transportado al núcleo, donde será replicado por las ADN polimerasas (Odumade et al., 2011). Luego de la entrada a los linfocitos B existen dos escenarios posibles; el inicio del ciclo lítico; o por otro lado, el establecimiento del ciclo de latencia, que comienza expresando todos sus antígenos los cuales se van silenciando progresivamente hasta silenciarse por completo (Damania et al., 2022; Soldan & Lieberman, 2023).

Una vez que el EBV infecta los linfocitos B vírgenes, induce su proliferación y su tránsito hacia el ganglio linfático, donde comienza la diferenciación a linfocitos B de memoria a través del centro germinal (Smatti et al., 2018a). A su vez, se postula que el EBV tiene la capacidad de infectar directamente los linfocitos B de memoria (Mrozek-Gorska et al., 2019a). En cualquier escenario posible, el virus permanecerá en los linfocitos B de memoria en estado de latencia 0 (donde deja de expresar sus antígenos virales y permanece indetectable para el sistema inmune) (Shannon-Lowe & Rickinson, 2019). Eventualmente, los linfocitos B de memoria infectados en estado de latencia se reactivan frente a distintos estímulos y esto conduce a un nuevo ciclo de replicación viral con liberación de partículas virales infecciosas, de forma tal que el EBV puede diseminarse a nuevos hospedadores o mantener la infección persistente en el mismo hospedador (**Figura 5**) (Smatti et al., 2018a).

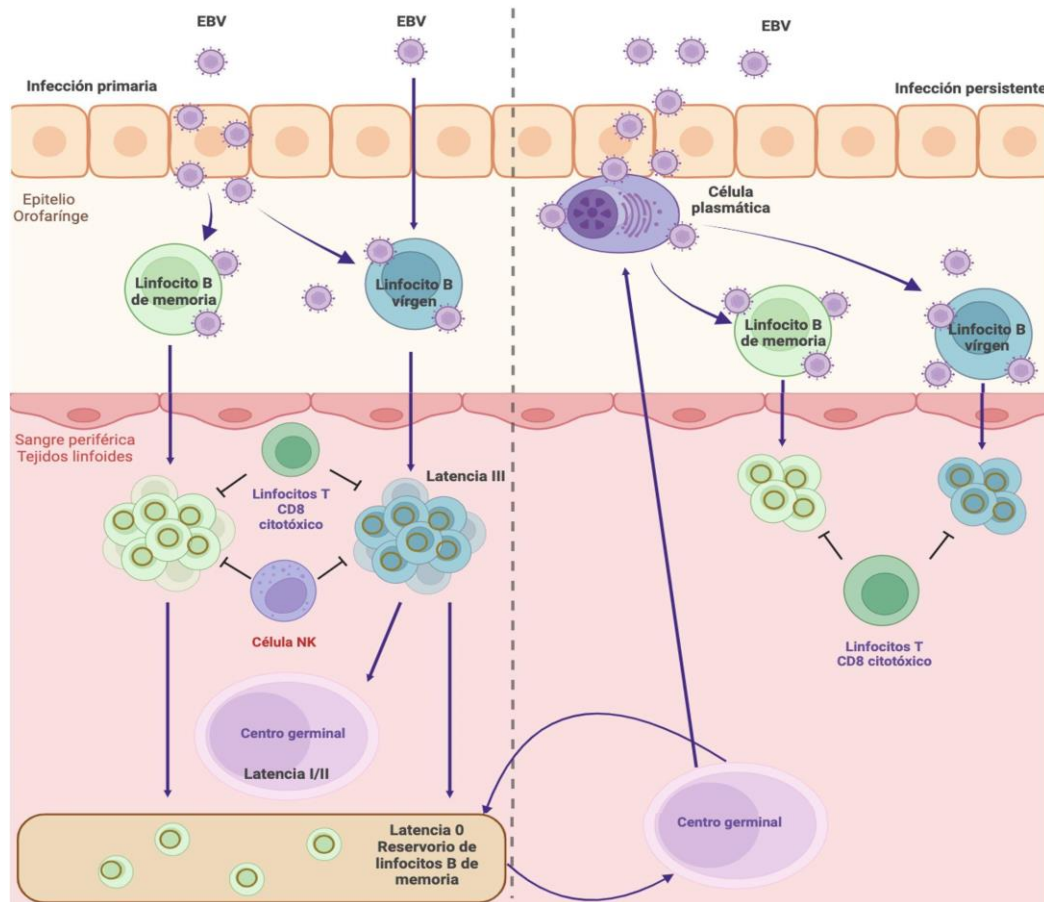


Figura 5. Esquema de la infección primaria y persistente por EBV. Se muestra el compartimiento faríngeo y circulación periférica en ambas condiciones. En la infección primaria, la entrada del virus al organismo del hospedador se da a través del epitelio de la orofaringe. El EBV se replica en el epitelio oral formando focos de replicación lítica, los viriones se liberan e infectan linfocitos B vírgenes y/o de memoria. A su vez, se cree que el virus puede atravesar el epitelio e infectar directamente su célula blanco (linfocitos B). Estos linfocitos dirigidos por el EBV comienzan a proliferar, mientras que se va a montar una respuesta de linfocitos T CD8 primaria y de células NK para intentar controlar y detener la infección. Algunos linfocitos B infectados evadirán el sistema inmune y comenzarán a disminuir la expresión de sus antígenos virales, dejarán de proliferar y se convertirán en linfocitos B de memoria de reservorio. Una posible ruta, es a través del centro germinal, donde se diferencian a linfocitos B de memoria y el virus permanecerá en estado de latencia 0 (donde deja de expresar sus antígenos virales y permanece indetectable para el sistema inmune). Y la otra ruta es independiente del centro germinal, la diferenciación a linfocitos B de memoria es dirigida por el EBV. Ocasionalmente, ocurre la reactivación de los linfocitos B de memoria, que iniciarán nuevamente el ciclo lítico de la infección, posiblemente inducido por la diferenciación a células plasmáticas. Se producirán nuevas partículas virales infectivas que infectarán nuevas células epiteliales o linfocitos B, en los cuales iniciará un nuevo programa de latencia. De esta forma, el EBV se asegura de mantener la infección en el hospedador e infectar nuevos hospedadores.

1.8.2.4.3.4. Proteínas vIL10 y EBNA2

Interleuquina 10 viral

La interleuquina 10 viral, codificada por el gen BCRF1, se expresa en forma inmediatamente temprana durante la fase lítica de la infección y presenta un 80 % de identidad con su proteína homóloga celular, la interleuquina 10 humana (hIL10) (Jog et al., 2018). El EBV induce la expresión de vIL10 y hIL10

para evadir al sistema inmunitario y permanecer en el huésped con una infección persistente (Schönrich et al., 2022). La expresión de vIL10 inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como el IFN γ , promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas (Jochum et al., 2012). En el contexto de la EM y teniendo en cuenta el rol inmunomodulador de la vIL10, se podría proponer que los polimorfismos en la secuencia codificante de vIL10 podrían alterar el fino balance en el montaje de la respuesta inmune frente a la infección y que los polimorfismos en su promotor podrían afectar el nivel de expresión de la vIL10 (Bar-Or et al., 2020; Schönrich et al., 2022). Ambos escenarios, en forma aislada o en conjunto, podrían participar de la inmunomodulación que contribuya al establecimiento y progresión de la EM. Según mi mayor entender, al día de la fecha sólo se publicó un trabajo que estudió polimorfismos en la secuencia codificante de la vIL10 en niños con EM y no se describieron variantes asociadas con el riesgo de la enfermedad (Yea et al., 2013). Más aún, el estudio de polimorfismos en el gen que codifica para vIL10, en patologías neoplásicas como el carcinoma nasofaríngeo o el carcinoma gástrico, ambos asociados a EBV, describió un elevado grado de conservación de la secuencia de la vIL10, lo cual sugiere una función crítica de esta interleuquina en la evasión del sistema inmune del hospedador durante la replicación del EBV (Chao et al., 2011).

Antígeno nuclear 2 de Epstein Barr

El antígeno nuclear 2 de Epstein Barr (EBNA2) codificado por el gen BYRF1, es una de las seis proteínas virales expresadas en el núcleo de linfocitos B infectados en el estadio de latencia y es esencial para la inmortalización de las células B (Abel et al., 2018b). El antígeno EBNA2 posee la capacidad de modular la actividad de factores de transcripción celular como RBPJk, a través de la activación de las vías de señalización celular y el aumento de la expresión de moléculas marcadoras del linfocito B como CD23 y CD21 (Glaser et al., 2017; Saha & Robertson, 2011). Más aún, posee actividad transactivadora sobre la transcripción de genes virales, entre ellos los genes que codifican para las proteínas latentes de membrana (LMPs). En el último caso, la capacidad transactivadora no se ejerce a través de la unión al ADN del gen diana sino a través de la modulación de factores de transcripción celular (Friberg et al., 2015; D. Y. Wu et al., 1996). EBNA2 es considerado un buen candidato para ser secuenciado y estudiado, ya que es uno de los genes más polimórficos del EBV y se identificó la interacción de dicho antígeno con varias proteínas celulares del hospedador. Particularmente, los SNPs de riesgo de la EM: TRAF3/RCOR1 (rs1258869) y CD40 (rs1883832) se encuentran localizados en sitios de unión del factor de transcripción EBNA2 (Afrasiabi et al., 2019, 2023; Keane et al., 2021). Por otra parte, se describieron polimorfismos en el gen viral BYRF1 presentes en los pacientes con EM y diferentes de los observados en controles sanos, en estudios realizados en Europa (Mechelli et al., 2015a; Varvatsi et al., 2021a). Sin embargo, aún resta confirmar si dichos polimorfismos estarían asociados al desarrollo de la EM en todas las regiones del mundo o si por el contrario representan variantes virales de circulación preferencial en el viejo continente.

1.8.2.4.3.5. Respuesta inmune frente al EBV

Durante la etapa primaria de la infección, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y las células NK, se expanden rápidamente para controlar y destruir los linfocitos B infectados (Hislop et al., 2007; Humans, 2012; Münz, 2017a). Las células NK tienen un rol de preponderante durante la infección primaria y replicación lítica, su respuesta se monta 1 o 2 días luego de la infección y actúa como la primera línea de defensa del sistema inmunitario secretando la citoquina INF γ (Png et al., 2021). Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos reconocen, mediante su receptor de células T (TCR), los antígenos virales en el contexto de las moléculas MHC de clase I de los linfocitos B infectados y proliferan a fin de lograr su eliminación (Hislop et al., 2007; Münz, 2017a). Finalmente, se reportó la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos contra el EBV que tienen la capacidad de unirse directamente a las partículas virales libres (Abbott et al., 2017; Jayasooriya et al., 2015). Cuando ocurre la reactivación del virus, se monta nuevamente una respuesta celular de linfocitos T CD8⁺ de memoria específicos contra el EBV que removerá las células infectadas. Sin embargo, y dado que el virus logra silenciar la expresión de sus antígenos, la respuesta inmunitaria nunca será lo suficientemente eficiente para erradicar por completo la infección; de esta forma el virus persiste produciendo niveles intermitentes o muy bajos de viriones (De Paschale & Clerici, 2012; Humans, 2012).

1.8.2.4.3.6. Detección y diagnóstico de la infección del EBV

Existe una amplia gama de herramientas para la detección del EBV, incluyendo ensayos serológicos como ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas), IFI (ensayo de inmunofluorescencia indirecta), quimioluminiscencia, inmunoblot, así como también ensayos de detección de ácidos nucleicos (Abusalah et al., 2020; H. Chen et al., 2022). Determinando por serología los anticuerpos IgG e IgM anti-VCA y anti-EBNA1, es posible distinguir entre infección activa o pasada. Los anticuerpos IgM dirigidos contra el antígeno VCA, se generan temprano en la fase activa de la infección, y luego su título disminuye hasta desaparecer a las pocas semanas. Por su parte, los anticuerpos IgG dirigidos contra el antígeno VCA, se generan durante el desarrollo de la infección aguda y permanecen estables por toda la vida del portador (De Paschale & Clerici, 2012; Smatti et al., 2018a). Finalmente, los anticuerpos IgG anti-EBNA1 aparecen de forma tardía, 3 a 6 semanas post infección, y permanecen de manera estable durante toda la vida del portador (Balfour Jr et al., 2015). La presencia de anticuerpos IgG e IgM anti-VCA y la ausencia de anticuerpos de tipo IgG anti-EBNA1 determinan una infección aguda. Por el contrario, la presencia de anticuerpos IgG VCA y EBNA1, en ausencia de IgM VCA es un indicativo de infección pasada. La presencia de IgG VCA y EBNA1 e IgM VCA indica infección primaria tardía o reactivación (Gärtner et al., 2003; Hess, 2004). La presencia de sólo IgG VCA o sólo IgG EBNA1 también son indicativos de infección pasada, sin embargo, es imperativo considerar que

hasta el 10 % de los individuos infectados con el EBV podrían nunca producir anticuerpos anti-EBNA1 (Balfour Jr et al., 2015), por lo que siempre es recomendable pesquisar la presencia de ambos anticuerpos. Existen a su vez anticuerpos específicos para otros antígenos que pueden detectarse, como el anticuerpo anti-antígeno temprano (EA), que es expresado durante la fase de convalecencia de la infección y está compuesto por dos componentes: difuso (EA-D) y restringido (EA-R) (Crowley et al., 2012). El título de anticuerpos IgG EA-D incrementa dentro de las 3 a 4 semanas post infección y luego de los 3 meses suele no ser detectable, si bien entre un 20 y 30 % de los portadores sanos mantienen los títulos detectables. Los títulos de anticuerpos IgG EA-R permanecen hasta 2 años después de la infección. Altos títulos de EA-D o EA-R indican reactivación de la infección latente del EBV (**Figura 6**) (De Paschale & Clerici, 2012).

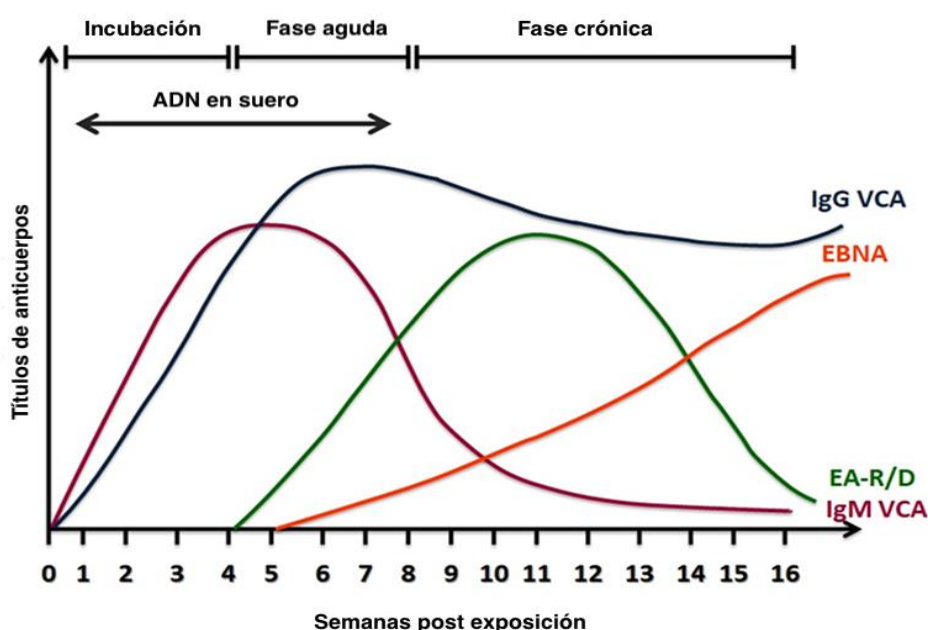


Figura 6: Respuesta serológica a la infección de EBV. El título de anticuerpos IgM VCA se detecta durante la fase activa de la infección y luego de la convalecencia disminuye. Los títulos de anticuerpos IgG VCA incrementan al mismo tiempo que IgM VCA y se mantienen estables a lo largo de toda la vida del portador. Los títulos IgG EBNA comienzan a ser detectables en forma tardía durante la infección y al igual que IgG VCA se mantienen constantes por el resto de la vida del huésped. Los títulos de anticuerpos IgG EA-D o R, incrementan en la fase aguda de la infección y luego disminuyen durante la convalecencia. Imagen adaptada de (Smatti et al., 2018a).

1.8.2.4.3.7. EBV y Esclerosis Múltiple

La EM es considerada una enfermedad multifactorial, en la cual hay una interacción entre distintos factores, tanto genéticos como ambientales. Dentro del grupo de los factores ambientales, el que mayor evidencia epidemiológica y serológica presenta es el EBV. Al día de la fecha existen una gran cantidad de estudios que soportan su rol en el desarrollo de la enfermedad, dado que reportan que la infección

con el EBV es un prerrequisito para el desarrollo de esta (Hedström, 2023; Läderach & Münz, 2022; Thomas et al., 2023). Se determinó que existe un incremento en el riesgo de desarrollar EM en individuos con historia pasada de mononucleosis infecciosa (Sheik-Ali, 2017), en individuos seronegativos que seroconvierten (Bjornevik et al., 2022a) y también en individuos que presentan altos títulos de anticuerpos IgG anti-EBNA1 (Ascherio et al., 2001; DeLorenze et al., 2006; Hedström et al., 2019; Levin et al., 2005a). En el mismo sentido, se reportó una mayor prevalencia de la infección de EBV en individuos con EM comparado con los individuos de grupos control (Ascherio & Munger, 2007). A su vez, se determinó que las bandas oligoclonales del líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM, reaccionan contra el EBV (von Büdingen et al., 2010) y que los linfocitos B expandidos clonalmente se unen a EBNA1 y la proteína GlialCAM, a través de un mecanismo de mimetismo molecular (Lanz et al., 2022). También se observó que individuos con EM presentan una respuesta de linfocitos T citotóxicos deficiente contra el EBV (Pender et al., 2017). Finalmente, se detectó la presencia del antígeno Zta, codificado por el gen viral BZLF1, en lesiones cerebrales de pacientes con EM, en muestras tomadas *post mortem* (Angelini et al., 2013). Más allá de la sólida evidencia que se encontró, no se determinaron los mecanismos moleculares exactos a través de los cuales el EBV podría contribuir al desarrollo de la enfermedad, pero se postularon numerosas teorías que necesitan ser profundizadas y comprobadas. Los principales mecanismos que explicarían la relación entre el EBV y la EM son el mimetismo molecular, la activación inespecífica y una respuesta inmune alterada que no permite controlar correctamente la infección (Bjornevik et al., 2023; Kuchroo & Weiner, 2022; Libbey et al., 2007; Robinson & Steinman, 2022).

Mimetismo molecular

Se ha demostrado en varios reportes la reactividad cruzada entre antígenos del EBV y autoantígenos del SNC, un fenómeno conocido como mimetismo molecular (Robinson & Steinman, 2022; Tengvall et al., 2019; Thomas et al., 2023; Tyler, 2022.). En este contexto, se postula que ciertos epítopes en antígenos virales podrían inducir una respuesta inmunitaria contra proteínas del SNC que contienen secuencias similares de aminoácidos. En este sentido, estudios previos reportaron la presencia de anticuerpos autorreactivos en pacientes con EM; en particular, se describieron anticuerpos anti la proteína del tegumento BRRF2 que también se unen a proteínas mitocondriales (Lindsey, 2017). De forma similar, se describió que anticuerpos anti la proteína de la cápside BFRF3 poseen reactividad cruzada con la proteína citoplasmática septina 9 (Lindsey, 2017). Finalmente, también se reportó que anticuerpos anti EBNA1 presentaron reactividad cruzada con α B cristalina, anoctamina 2, la proteína básica de la mielina (MBP) y moléculas de adhesión a células gliales GlialCAM (Lanz et al., 2022; Lünemann et al., 2008; Tengvall et al., 2019; Thomas et al., 2023). La teoría postula que durante la infección primaria por EBV, los linfocitos T y B se activan con antígenos del virus, pero a su vez, algunos linfocitos tendrán la capacidad de reaccionar contra autoantígenos del SNC, por su similitud con antígenos virales de EBV.

La migración de los linfocitos T y B autorreactivos al SNC induciría la destrucción de oligodendrocitos, comprometiendo la función neuronal. Otra posible explicación, es que aquellos individuos que tienen una predisposición genética a desarrollar EM tengan dificultades para controlar eficientemente la infección del EBV. En este contexto, al ocurrir una infección primaria se establecerán los reservorios de linfocitos B infectados; estas células podrían actuar como presentadoras de antígenos y de esta forma podrían estimular a los linfocitos T autorreactivos que luego promoverían la inflamación del SNC (Bjornevik et al., 2023; Soldan & Lieberman, 2023).

Respuesta inmune alterada frente al EBV

En lo referido a la desregulación de la respuesta humoral en los pacientes con EM, como se mencionó anteriormente, los pacientes presentan mayores títulos de anticuerpos IgG anti EBV comparados con los individuos de grupos control (Ascherio & Munger, 2010; Fernández-Fournier et al., 2023; Hedström et al., 2019). Dicha respuesta inmune elevada podría indicar una deficiencia del sistema inmune para controlar los reservorios de linfocitos B infectados con el EBV. A su vez, estudios previos reportaron la acumulación de anticuerpos IgG oligoclonales reactivos contra el EBV en LCR de pacientes con EM (J. Virtanen et al., 2014; Z. Wang et al., 2021). Por otro lado, la infección de los linfocitos B con el EBV induce la secreción de un perfil de citoquinas proinflamatorias y dichas citoquinas juegan un papel clave en la patología de la EM. Por el contrario, durante la replicación lítica del EBV, se expresa el gen que codifica para la citoquina antiinflamatoria interleucina 10 viral (vIL10), la cual suple la disminución en la expresión de IL-10 celular y genera un entorno tolerogénico para la infección viral (R. Li et al., 2016; Michel et al., 2015).

Por otro lado, la evidencia que avala la desregulación de la respuesta celular en los pacientes con EM, indica que los mismos presentan mayor cantidad de linfocitos T CD4⁺ polarizados a Th1 que reconocen específicamente a EBNA1 comparado con los controles EBV seropositivos (Lünemann et al., 2006). También se determinó que en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con EM, hay un aumento en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ cuando son estimulados con péptidos del EBV, pero no cuando se estimulan con péptidos de otros virus como el CMV (Lünemann et al., 2008). Por otro lado, la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ específicos contra el EBV se correlaciona con la actividad de la enfermedad y más aún, la respuesta de dichos linfocitos es mayor en pacientes con EM comparado con otras enfermedades inflamatorias del SNC o controles (Angelini et al., 2013).

Activación inespecífica

Dentro del SNC, el EBV contribuye a la inflamación y el daño en los tejidos diana. Esta noción opera bajo el supuesto de que el EBV puede inducir la activación inespecífica que iniciaría una respuesta

inmune antiviral contra las células infectadas dentro del SNC (Bar-Or et al., 2020). Brevemente, se especula que las infecciones virales conducen a la activación de células presentadoras de antígenos (CPA) como las células dendríticas. Dichas células tienen la capacidad de activar linfocitos T autorreactivos presensibilizados, y de esta forma iniciar una enfermedad autoinmune (activación inespecífica) (Pacheco et al., 2019). A su vez, los linfocitos T específicos para el EBV también podrían iniciar la activación inespecífica. Estos linfocitos T activados pueden migrar a sitios, por ejemplo, el SNC, donde se podrían encontrar con CPA que presentan antígenos del EBV y se desate una respuesta inflamatoria en el sitio con liberación de citoquinas que produciría el daño de tejido (Fujinami et al., 2006).

1.8.2.4.4. Tratamiento de la esclerosis múltiple

La EM es una enfermedad que hasta el día de la fecha no tiene cura; sin embargo, el diagnóstico precoz y el correcto tratamiento de los síntomas proporciona un aumento de la calidad de vida de los pacientes. Más allá del tratamiento con agentes farmacológicos, otras cuestiones, como modificaciones en el estilo de vida, rehabilitación y el soporte social colaboran a mejorar la vida de los pacientes. Actualmente los tratamientos se enfocan en tratar los ataques agudos, mejorar los síntomas y reducir la actividad biológica a través de terapias modificadoras de la enfermedad (DMT, por sus siglas en inglés, *disease modifying therapy*). Dichas terapias modifican el curso de la enfermedad suprimiendo o modulando el sistema inmunitario (Gajofatto & Benedetti, 2015; Hauser & Cree, 2020). Sus mecanismos de acción se centran en actuar como agentes antiinflamatorios en las etapas de recaídas de la enfermedad, reducir el número de recaídas, evitar la acumulación de lesiones en el SNC y en algunos casos retrasar, estabilizar y mejorar modestamente la discapacidad de pacientes. Si bien hay una gran variedad de terapias hoy en día, las más utilizadas incluyen:

Interferón beta: es una citoquina cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la activación de linfocitos T, la inducción de linfocitos T reguladores, y el bloqueo de la migración de los linfocitos T a través de la disminución de moléculas de adhesión (Dhib-Jalbut & Marks, 2010; Wiendl et al., 2021).

Acetato de glatiramer: es una mezcla de cuatro péptidos sintéticos de aminoácidos que se unen a los autoanticuerpos específicos contra la mielina para reducir su autorreactividad, promueven un fenotipo Th2 predominante (cambio del perfil Th1 a Th2) y alteran el balance entre citoquinas pro y antiinflamatorias (Duda et al., 2000; Lalive et al., 2011).

Modulador del receptor de esfingosina-1-fosfato (Fingolimod): es un modulador de la esfingosina-1-fosfato (S1P), que tras su fosforilación se une con gran afinidad al receptor de la S1P, lo cual a su vez conduce a la internalización y degradación del receptor en diferentes tipos celulares, incluidos los linfocitos T *naive* como de memoria. Como consecuencia, inhibe la capacidad de los linfocitos autorreactivos para salir de los ganglios linfáticos hacia el SNC (Subei & Cohen, 2015; Torkildsen et al., 2016).

Teriflunomida: es un metabolito activo de la leflunomida que inhibe reversiblemente la síntesis de pirimidinas, previniendo la proliferación de linfocitos T y B activos (O'Connor et al., 2011).

Dimetilfumarato: es un compuesto cuyo mecanismo de acción es la activación del factor nuclear (Nrf2), inhibición de la proliferación celular y la mejora de la respuesta antiinflamatoria a través de la producción de citoquinas (Linker et al., 2011; Wiendl et al., 2021).

Natalizumab: es un anticuerpo monoclonal humanizado que posee como blanco la cadena alfa de la integrina ($\alpha 4\beta 1$), una molécula de adhesión expresada en la superficie de los linfocitos que está involucrada en la transmigración a través del endotelio al SNC y su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la infiltración de leucocitos al cerebro a través del endotelio (Wiendl et al., 2021; J. H. Yang et al., 2022).

Estos tratamientos se dividen en primera o segunda línea. Los tratamientos de primera línea son Interferón, Acetato de glatiramer, Teriflunomida y Dimetilfumarato, mientras que los de segunda línea son Fingolimod y Natalizumab. Cuando los tratamientos de primera línea no son bien tolerados por los pacientes o la respuesta que producen no es suficiente para aminorar los síntomas, o progresión de la enfermedad, el médico tratante puede realizar distintas modificaciones en el tratamiento. Por un lado, puede aumentar la dosis del mismo tratamiento o bien puede optar por otro tratamiento de primera línea o realizar la transición a un tratamiento de segunda línea (Dörr & Paul, 2015; Gajofatto & Benedetti, 2015).

1.9. Justificación del trabajo

Dado el carácter multifactorial de la EM, que involucra tanto factores genéticos como ambientales, entre los que se destaca la infección por el EBV como el principal agente infeccioso asociado y aunque existe evidencia que vincula la infección por EBV con el riesgo de desarrollar EM, los mecanismos moleculares que subyacen a esta asociación aún no han sido plenamente esclarecidos. Más aún, son escasos los estudios que abordaron esta relación en poblaciones sudamericanas, particularmente en Argentina.

En este sentido, esta tesis se plantea como un abordaje integral que combina estudios epidemiológicos, análisis de variabilidad genética viral, perfil transcriptómico en linfocitos B y ensayos funcionales, con el fin de aportar evidencia desde distintas perspectivas sobre el posible rol del EBV en la patogenia de la EM.

En relación con los ensayos funcionales, el trabajo se enfoca en caracterizar la modulación de genes relevantes como *Iqgap1*, cuya alteración podría impactar en la respuesta inmunitaria y contribuir a los procesos inflamatorios crónicos típicos de la enfermedad.

El trabajo presentado constituye un aporte original para la caracterización epidemiológica, genética y molecular de esta enfermedad en la población argentina, proporcionando datos novedosos que podrían

ser de utilidad tanto para comprender la biología de la EM como para el diseño futuro de estrategias terapéuticas o preventivas.

2. Hipótesis

2.1. Hipótesis

Construcción de la hipótesis

Dado que:

- A. Se demostró que aquellas personas con historial de mononucleosis infecciosa tienen un mayor riesgo de desarrollar esclerosis múltiple (Handel et al., 2010).
- B. Se observó que la seropositividad para el EBV es mayor en pacientes con esclerosis múltiple (99 %, versus 95 % de los controles sanos (Almohmeed et al., 2013a; Pakpoor, Disanto, et al., 2013a).
- C. Se describió que el riesgo de desarrollar esclerosis múltiple en individuos seronegativos para el Epstein Barr es prácticamente nulo, mientras que luego de la seroconversión el riesgo aumenta unas 32 veces (Bjornevik et al., 2022a).
- D. Se evidenció que los pacientes con esclerosis múltiple presentan mayores títulos de anticuerpos IgG anti-EBV comparado con los controles (Ascherio et al., 2012; Levin et al., 2005a).
- E. Se detectó la presencia de antígenos del Epstein Barr en lesiones desmielinizantes localizadas en el cerebro de pacientes con esclerosis múltiple (Angelini et al., 2013; Hassani et al., 2018; Moreno et al., 2018).
- F. Se observó que, en un porcentaje de pacientes con EM, existe reactividad cruzada entre antígenos del EBV y la proteína GlialCam (Lanz et al., 2022).
- G. Considerando que el EBV infecta y persiste en los linfocitos B de memoria y que dichos linfocitos se encuentran en las lesiones de los pacientes con EM y que las bandas oligoclonales secretadas por los linfocitos B son un marcador de la enfermedad (Hassani et al., 2018; Maroto-García et al., 2023; Mrozek-Gorska et al., 2019).

Se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

“La infección con el virus Epstein Barr es un prerrequisito para el desarrollo de la esclerosis múltiple, y actúa a través de la modulación transcriptómica de los linfocitos B”

3. Objetivos

3.1. Objetivos

General

Caracterizar la participación del virus Epstein Barr en la patogenia de la esclerosis múltiple, mediante el análisis de la serología, la carga viral, la variabilidad genética de genes virales relevantes que codifican para las proteínas: vIL10 y EBNA2, y la modulación de la expresión génica en linfocitos B, complementándolo con estudios funcionales de los cambios transcripcionales observados

Específicos

1. Investigar la prevalencia de la infección por el EBV en una cohorte de pacientes con EM y controles en Argentina.
2. Evaluar la carga viral del EBV en pacientes con EM y el grupo control.
3. Caracterizar polimorfismos en los genes *BYRF1* (codifica para EBNA2) y *BCRF1* (codifica para vIL10) asociados con el riesgo de la EM.
4. Realizar un análisis transcriptómico comparativo de linfocitos B (EBV⁺ y EBV⁻) entre pacientes y controles.
5. Realizar estudios funcionales *in vitro* en diferentes subpoblaciones de linfocitos.
 - a. Analizar la proliferación celular de los linfocitos B y T.
 - b. Evaluar la secreción de citoquinas de los linfocitos B y T.
 - c. Analizar la presentación antigénica.
 - d. Estudiar la diferenciación de los linfocitos T.
 - e. Estudiar los factores de transcripción de los linfocitos T.

4. Metodología

*Metodología**4.1. Consideraciones éticas*

Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética e Investigación de Fleni, bajo el protocolo de investigación denominado Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple (EMERGE) N.º 37/14 (Anexo A-E). En forma previa a la toma de la muestra clínica, el médico tratante brindó toda la información pertinente a los participantes (pacientes y controles), tanto en forma oral como escrita, acerca de los fundamentos del estudio, así como también de los riesgos y molestias que pudieran surgir durante el mismo. Todas las muestras utilizadas se obtuvieron según lo establecido por dicho comité. En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado escrito (Anexo F), el cual fue leído y firmado por todos los participantes.

4.2. Diseño del estudio

Estudio observacional y analítico de una cohorte, con seguimiento prospectivo de los pacientes y carga de datos prospectiva.

4.3. Población en estudio

Se enrolaron 138 pacientes con esclerosis múltiple con seguimiento en el Departamento de Neuroinmunología de Fleni y 108 controles (convivientes de los pacientes genéticamente no relacionados). A partir de esta población, se realizó un pareo por edad y género.

Se aplicaron los siguientes criterios de inclusión: i. se incluyeron sujetos con EM de acuerdo con los criterios de McDonald 2010 y 2017 (Polman et al., 2011; Thompson, Banwell, et al., 2018), capaces de consentir voluntariamente, interesados en participar en el estudio; ii. pacientes con EM en cualquiera de sus formas clínicas (remitente recurrente, secundaria-progresiva, primaria-progresiva o progresiva recurrente); iii. pacientes con EM no tratados o que estén en tratamiento (desde al menos 3 meses antes) con interferón beta, acetato de glatiramer, natalizumab, fingolimod o dimetilfumarato. Criterios de exclusión: i. pacientes o controles menores a 18 años; ii. individuos incapaces de consentir voluntariamente la participación en el estudio; iii. uso de antibióticos o infecciones gastrointestinales en los 3 meses previos (para pacientes y grupo control (GC)); iv. historia de enfermedades crónicas o con otras enfermedades autoinmunes distintas a EM (para pacientes e individuos de grupo control); v. individuos que hayan recibido algunos de los siguientes tratamientos en los períodos especificados previo a la inclusión: corticoides (1 mes), Metotrexate, Ciclofosfamida, Azatioprina, Micofenolato mofetil o Inmunoglobulinas IV (3 meses), Cladribina y Alemtuzumab (12 meses).

Debido a que Fleni atiende pacientes de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) de nivel socioeconómico medio/alto, y con el fin de ampliar la representatividad de la muestra, se invitó a participar a dos centros adicionales: el Hospital de Clínicas José de San Martín (CABA), como hospital público sirviendo a un nivel socioeconómico medio-bajo (donde se enrolaron 6 pacientes con EM y 14 controles sanos), y la Fundación Sinapsis de la ciudad de Santa Rosa (Provincia de La Pampa), que contribuyó con muestras de 25 pacientes y 19 controles). Estas muestras se utilizaron exclusivamente para los experimentos de serología viral (véase debajo).

4.4. Muestras en estudio

Del total de 310 participantes (incluyendo los pacientes y controles de Fleni, Hospital de Clínicas José de San Martín y Fundación Sinapsis) se obtuvieron 20 ml de sangre que fueron procesados de forma diferente dependiendo del objetivo del experimento.

Las muestras obtenidas de un subgrupo de 128 pacientes con EM y 127 controles sanos fueron utilizadas para los estudios de serología, para lo cual se colectó la muestra de sangre utilizando tubos colectores de suero con un activador de coagulación.

Para la evaluación de carga viral de EBV, se utilizaron las muestras de un subgrupo de pacientes (n=44) y controles sanos (n=29). Se colectó sangre utilizando tubos colectores con el agente anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Para la determinación de las variantes virales de EBV, se utilizaron muestras de un subgrupo de pacientes (n=70) y controles sanos (n=59) para la secuenciación directa del gen *BCRF1* y un subgrupo de pacientes (n=169) y controles sanos (n=141) para la secuenciación directa del gen *BYRF1*.

Finalmente, a un subgrupo de pacientes (n=6) y controles (n=6) se les extrajo 120 ml de sangre, que fueron utilizados para el ensayo de secuenciación masiva de ARN (RNA-seq).

4.5. Procesamiento de muestras

Las muestras utilizadas para la serología se centrifugaron a 2.000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente y se separaron 5 ml de suero a partir de cada uno de los tubos. El suero se conservó a -80°C hasta su uso.

Las muestras de sangre utilizadas para la evaluación de carga viral y determinación de variantes virales se sembraron sobre un colchón de *Ficoll-Paque plus* (GE Healthcare) y se centrifugaron a 1.400 rpm durante 30 minutos. Se recuperó el halo correspondiente a las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y estas se lavaron dos veces con *buffer* fosfato salino estéril (PBS, por sus siglas en inglés) (Gibco, ThermoFisher). Las células se conservaron a -80°C en 200 µl de PBS hasta su uso.

Las muestras utilizadas para el RNA-seq se sembraron sobre un colchón de *Ficoll-Paque plus* (GE Healthcare) y se centrifugaron a 1.400 rpm durante 30 minutos. Se recuperó el halo correspondiente a las células mononucleares de sangre periférica y estas se lavaron dos veces con PBS (Gibco, Thermo Fisher).

4.6. Obtención de datos demográficos, clínicos y de atrofia cerebral

A los integrantes de la cohorte de Fleni cuyas muestras fueron utilizadas para los diferentes ensayos de serología pacientes (n = 97) y controles (n = 94), el médico tratante les realizó una breve encuesta para obtener datos demográficos (sexo, edad, hábito tabáquico e índice de masa corporal (IMC)). El IMC se dividió en cuatro categorías: delgadez si sus valores eran menores o iguales a 18,4 kg/m², peso normal si sus valores se encontraban entre 18,5 - 24,9 kg/m², sobrepeso si sus valores se encontraban entre 25,0 - 39,9 kg/m² y obesidad si los valores eran iguales o mayores a 40,0 kg/m². Por otro lado, a los pacientes se les realizó una serie de preguntas que incluía: edad al inicio de los síntomas, edad al diagnóstico, tipo de EM, tratamiento. En paralelo se obtuvieron datos de atrofia cerebral a partir de resonancias magnéticas que se llevaron a cabo en el servicio de imágenes de Fleni. Se colectaron las secuencias T1 3D (pre y post gadolinio) y 3D FLAIR. A partir de las resonancias se obtuvieron los datos de fracción de parénquima, volumen de lesiones, volumen de cerebro y volumen de tálamo (derecho e izquierdo) usando el programa *Entelai Neuro v4.0* (Entelai, Buenos Aires, Argentina).

4.7. Serología para EBV, CMV y VZV en una cohorte de pacientes con EM y controles sanos.

Se evaluó la presencia de anticuerpos anti EBV, CMV y VZV mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, según sus siglas en idioma inglés) indirecto en el suero de un subgrupo de pacientes (N = 128) y controles (N = 127). En todos los casos se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante de los reactivos comerciales. Se midieron los niveles de anticuerpos IgG dirigidos contra el antígeno de cápside viral (VCA) del EBV con el equipo de reactivos *Epstein Barr VCA ELISA IgG* (Vircell), el antígeno nuclear 1 (EBNA1) de EBV con el equipo de reactivos *Epstein Barr EBNA1 ELISA IgG* (Vircell), Citomegalovirus (CMV) con el equipo de reactivos *CMV IgG – ELISA* (Dia.Pro Diagnostic Bioprobes) y del virus Varicela Zoster (VZV) con el equipo de reactivos *Varicella Zoster ELISA IgG* (Vircell). Todos los kits se basan en una prueba inmunoenzimática indirecta, que consta de la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno fueron eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) reaccionó con el complejo antígeno-anticuerpo, y la que no se unió fue eliminada con los lavados. Por último, la globulina unida reaccionó con el sustrato tetrametilbenzidina (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambió a amarillo tras la adición de la solución de parada (ácido sulfúrico). El cambio de

coloración fue evaluado en un lector de placas *Benchmark Plus microplate spectrophotometer* (Bio-rad). Las diluciones usadas para cada ensayo se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Diluciones de muestras usadas para cada ensayo.

	VCA	EBNA1	VZV	CMV
Dilución	1/20	1/20	1/20	1/101
Volumen diluyente	237,5 µl	237,5 µl	237,5 µl	247,5 µl
Volumen muestra	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	2,5 µl

Para el cálculo del título de anticuerpos anti VCA, EBNA1 y VZV, se obtuvo la densidad óptica (D.O.) de cada pocillo mediante la valoración espectrofotométricamente a 450/620 nm. Luego se calculó la media de las D.O. del suero *cut-off* y mediante la siguiente relación finalmente se determinó el título de anticuerpos: índice de anticuerpos = (D.O. de la muestra / media de D.O. del suero *cut-off*) x 10. Dicho índice de anticuerpos es el reportado como resultado para cada individuo.

Para el cálculo del título de anticuerpos anti CMV, se obtuvo la D.O. de cada pocillo mediante la valoración espectrofotométricamente a 450 nm. Conociendo la concentración y la D.O. de los calibradores usados se graficó una curva de calibración y se interpolaron los valores de D.O. de cada muestra para obtener la concentración de anticuerpos IgG contra CMV presentes en la misma.

Los valores de corte a utilizar fueron los recomendados por los fabricantes de los *kits*.

Para VCA, EBNA1 y VZV se utilizaron los siguientes valores de corte:

Índice	Interpretación
< 9	Negativo
9-11	Dudoso
> 11	Positivo

Para CMV se utilizaron los siguientes valores de corte:

< 0,5 IU/ml	Negativo
> 0,5 IU/ml	Positivo

Interpretación de resultados para VCA, EBNA1 y VZV: las muestras con resultados dudosos se volvieron a analizar para la confirmación de estos. Las muestras con índices inferiores a 9 se consideraron negativas. Las muestras con índices superiores a 11 se consideraron que tenían anticuerpos específicos de tipo IgG frente al antígeno del virus (Positivo).

Interpretación de resultados para CMV: un resultado negativo indicó que el paciente nunca estuvo infectado con Citomegalovirus. Cualquier paciente que mostró un resultado dudoso, debió ser reevaluado y se volvió a examinar para la confirmación del resultado. Un resultado positivo fue indicativo de una infección por CMV.

4.8. Determinación de la carga viral de EBV en pacientes con Esclerosis Múltiple y grupo control

Una vez obtenida la serología de los individuos, se evaluó la carga viral en un subgrupo de pacientes (N = 44) y controles (N = 29) para determinar si las diferencias en los títulos de anticuerpos se debían a una mayor carga viral.

4.8.1. Aislamiento y purificación de ADN

A partir de las muestras de CMSP conservadas a -80°C se realizó la purificación de ADN genómico total con el equipo comercial de reactivos *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) según instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 20 µl de proteinasa K en un tubo de 1.5 ml por cada muestra. Se adicionaron 200 µl de la muestra de CMSP a cada tubo. Luego se adicionaron 200 µl de la solución tampón AL a la muestra y se homogeneizó en vortex durante 15 s. La preparación se incubó a 56°C durante 10 min en bloque térmico y luego se centrifugaron los tubos brevemente para remover las gotas de la tapa. Se adicionaron 200 µl etanol (96–100 %) a la muestra, se mezcló en un vortex durante 15 s y se centrifugaron los tubos nuevamente. Con mucho cuidado se agregó la mezcla a las columnas *QIAamp Mini-Spin* dentro de un tubo colector de 2 ml, se cerró la tapa y centrifugó 8000 rpm (6000 x g) durante 1 min. Se colocaron las columnas en un nuevo tubo colector de 2 ml y se descartó el tubo que contenía el filtrado. Se adicionaron 500 µl de la solución de lavado AW1 y centrifugó 8000 rpm (6000 x g) durante 1 min. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector, se adicionaron 500 µl de la solución de lavado AW2 y centrifugó a 14000 rpm (20000 x g) durante 3 min. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y centrifugó a 14000 rpm (20000 x g) durante 1 min. Se colocó la columna en un tubo limpio de 1.5 ml. Se agregaron 50 µl de la solución de elución AE e incubó la columna a temperatura ambiente (15 - 25 °C) por 5 min. Finalmente se centrifugó a 8000 rpm (6000 x g) por 1 min y se recuperó el eluato con el ADN purificado.

El ADN purificado se cuantificó por espectrofotometría de nanogota utilizando un *NanoDrop One* (Thermo scientific). Se registró la absorbancia a 260nm (correspondiente a ácidos nucleicos) y a 280nm (correspondiente a proteínas) y se determinó la relación entre ambas (A260/A280), la cual debió encontrarse dentro de un rango entre 1,8 y 2 para considerar exitosa la purificación. A partir de estos datos, se obtuvo la concentración de ADN genómico total (µg/µl), en base a la cual se estableció el volumen de ADN (equivalente a 500 ng) a utilizar en las reacciones de amplificación por PCR y qPCR.

4.8.2. Generación de la curva estándar

A fin de determinar la carga viral de EBV en un subgrupo de pacientes con EM y dadores sanos, se cuantificó en forma absoluta la cantidad de copias de genoma viral por μg de ADN total mediante la técnica de *qPCR*. A tal fin, el primer paso de la puesta a punto del ensayo fue generar una curva de calibración basada en diluciones seriadas al décimo de un plásmido que contenía un gen viral, de copia única en el genoma viral, y del que se conocía exactamente su cuantificación. El plásmido utilizado fue el *pGEM®-T Easy* (Promega) que contiene el gen viral EBNA1 insertado en su región de clonado. El mencionado plásmido, con una concentración de 2×10^7 copias de EBNA1 por μl fue gentilmente cedido por la Dra. Dolores Fellner del Servicio de Virus Oncogénicos del Departamento de Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS “Dr. C. Malbrán”.

Una alícuota de 5 μl del plásmido fue diluida en 45 μl de solución comercial TE (Thermo Fisher) a modo de obtener el precursor del primer punto de la curva de calibrado con una concentración de 2×10^6 copias de EBNA1/ μl . Luego se realizaron 6 diluciones seriadas al décimo de forma tal que el precursor del último punto de la curva contuviera una concentración de 2 copias de EBNA1/ μl . De esta forma, y al sembrar 5 μl de cada punto de la pre curva de calibrado en la reacción de *qPCR*, se logró una curva con un rango lineal de detección desde 1×10^7 copias totales de genoma viral y con un límite de detección teórico de 10 copias de genoma viral.

A partir de las muestras de ADN obtenidas para el subgrupo de casos y controles seleccionados, se prepararon diluciones de modo de poder adicionar a cada pocillo de reacción de *qPCR* 500 ng de ADN en 5 μl de volumen.

Para la reacción de cuantificación se utilizó una sonda de *TaqMan* (Applied Biosystems) específica para EBNA1 y los cebadores específicos para EBNA1 descriptos en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Secuencia de sonda y cebadores utilizados para la *PCR* en tiempo real.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Sonda EBNA1	VIC_TGCAGCTTTGACGATGG_MGBNFQ
EBV-delantero	CCGCTCCTACCTGCAATATCA
EBV-reverso	GGAAACCAGGGAGGCAAATC

Se preparó una dilución de trabajo 10 μM de los cebadores específicos y una dilución 5 μM de la sonda. Cada reacción de *qPCR* se realizó por duplicado y en un volumen final de 25 μl . Se utilizaron 12,5 μl de la mezcla comercial 2 $\times$ *SYBR Green-ER qPCR Super Mix Universal* (Invitrogen), 0,75 μl de cada cebador y 0,5 μl de la sonda específica, 5 μl de ADN y 5,5 μl de H_2O calidad biología

molecular. La reacción se realizó en un termociclador *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD) según el programa de ciclado descrito en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Ciclado utilizado para la *qPCR*.

Parámetros	Paso 1	Paso 2	Paso 3 PCR (45 Ciclos)		Paso 4
			Desnaturalización	Elongación	
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C	60°C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min	3 min

Para determinar el número de copias del gen EBNA1 por μg de ADN total en las muestras de los casos y controles se obtuvo el valor promedio de las réplicas, se múltiplo el N.º de copias por el factor de dilución de la muestra correspondiente al paciente o control y de esta forma, se calculó el N.º de copias de EBV por μg de ADN total en la muestra original.

Vale aclarar que, dado que el gen EBNA1 es de copia única en el genoma viral, cuantificar el número de copias de EBNA1 μg de ADN total equivale a determinar el número de copias de genomas virales por μg de ADN total en la muestra original.

4.9. Secuenciación automatizada de los genes virales BCRF1 y BYRF1 en una cohorte de pacientes con EM y controles sanos.

4.9.1. Amplificación y secuenciación automatizada de los genes virales BCRF1 y BYRF1 que codifican para las proteínas vIL10 y EBNA2, respectivamente.

A fin de amplificar las variantes de los genes virales, se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR* por sus siglas en inglés) anidada. Esta elección se fundamenta en la baja proporción de linfocitos B infectados por el EBV en sangre periférica de individuos inmunocompetentes con una infección pasada por EBV. Se ha documentado que durante la latencia viral sólo 1 de cada 10^5 - 10^6 linfocitos B, aproximadamente, presentan el genoma viral en forma de episoma.

4.9.2. Amplificación de la región promotora y codificante del gen BCRF1 que codifica para la proteína viral vIL10.

Para la amplificación del gen completo (incluyendo la región del promotor y la región codificante) se optó por una estrategia de *PCR* anidada utilizando pares de cebadores (internos y externos) diseñados con el programa accesible en la web *Primer3* (<https://primer3.ut.ee/>) (Kõressaar et al., 2018). Para el diseño se tuvo en cuenta, que los cebadores tuvieron como secuencia diana una región del genoma viral

que flanquean al gen *BCRF1*. De esta manera, se evitó que los cebadores amplifiquen el gen que codifica para IL10 humana. Por otro lado, se verificó que no hubiera complementariedad inter/intra cebadores ni formación de *hairpins* utilizando la herramienta gratuita en línea *OligoAnalyzer Tool* (Integrated DNA Technologies). Los cebadores se detallan en la **Tabla 4**. Los cebadores delanteros y reversos externos fueron utilizados en la primera ronda de *PCR* amplificando un fragmento de 1161 pb y los cebadores delanteros y reversos internos fueron utilizados en la segunda ronda de *PCR* para amplificar un fragmento de un tamaño menor (994 pb). Se utilizaron muestras de un subgrupo de 70 pacientes y 59 controles para este estudio.

Tabla 4: Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación del gen *BCRF1*.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Coordenadas en secuencia de referencia (línea celular B95.8, N.º de acceso GeneBank NC_007605)
Cebador externo delantero	CCTCTTGAGGGTCCGCTTAT	9169 - 9188
Cebador externo reverso	GGGGAGAACACAGGAAGGTA	10310 - 10329
Cebador interno delantero	TGGTGTAGCCTCCCGTAGTC	9220 - 9239
Cebador interno reverso	TCTCCTGCTTCCAGGGTATG	10194 - 10213

Para llevar a cabo la primera ronda de la *PCR* se preparó una mezcla que contenía 5 µl de la solución tampón de *PCR* (1×), 2 µl de dNTPs (0,2 mM), 1,5 µl de cebador delantero externo (1 µM), 1,5 µl de cebador reverso externo (1 µM), 5 µl de potenciador, volumen correspondiente a 500 ng de ADN, 0,25 µl de la enzima *Taq Platinum pfx* con actividad 3' - 5' exonucleasa correctora (todos los reactivos provistos por Thermo Fisher) y se agregó agua suficiente para lograr un volumen final de 25 µl por reacción. El programa de ciclado de la primera ronda de *PCR* se describe en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Primera ronda del ciclado utilizado para la amplificación del gen *BCRF1*.

Condiciones	Paso 1	Paso 2 (40 ciclos)			Paso 3	Paso 4
Temperatura	94°C	94°C	54°C	72°C	72°C	15°C
Tiempo	5 min	40 seg	40 seg	1 min	10 min	∞

Para la segunda ronda de la *PCR* se preparó una mezcla que contenía 5 µl de la solución tampón de *PCR* (1×), 2 µl de dNTPs (0,2 mM), 1,5 µl de cebador delantero interno (1 µM), 1,5 µl de cebador reverso interno (1 µM), 5 µl de potenciador, 2 µl del producto de la primera ronda de *PCR*, 0,25 µl de la enzima *Taq Platinum pfx* con actividad 3' - 5' exonucleasa correctora (todos los reactivos provistos por Thermo

Fisher) y se agregó agua para llegar a un volumen final de 25 µl por reacción. El programa de ciclado de la segunda ronda se describe en la **Tabla 6**.

En cada ronda de *PCR* se utilizaron como controles positivos la línea celular B95.8 (EBV⁺) o a la línea celular Raji (EBV⁺), como control negativo la línea celular K562 (EBV⁻) y una reacción sin templado (se adicionaron 5 µl de H₂O) como control de no contaminación de los reactivos.

Cada programa de ciclado se realizó en un termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

Tabla 6: Segunda ronda del ciclado utilizado para la amplificación del gen *BCRF1*.

Condiciones	Paso 1	Paso 2 (40 ciclos)			Paso 3	Paso 4
Temperatura	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	15°C
Tiempo	5 min	40 seg	40 seg	1 min	10 min	∞

4.9.3. Amplificación de la región 3' terminal del gen *BYRF1* que codifica para la proteína viral *EBNA2*.

Para la amplificación de la región 3' terminal de este gen se optó por una estrategia de *PCR* semi-aninada utilizando los cebadores previamente diseñados por Tierney y colaboradores (Tierney et al., 2006). Los cebadores se detallan en la **Tabla 7**. Los cebadores E2C y E2SEQ4 fueron utilizados en la primera ronda de *PCR* para amplificar el primer fragmento de 545 pb. El par E2C y 2 A.2 fueron utilizados en la segunda ronda de *PCR* para amplificar el fragmento de 499 pb que permite clasificar variantes de EBNA2. Se utilizaron muestras del total de pacientes (N = 169) y controles (N = 141) para este estudio.

Tabla 7: Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de la porción 3' terminal de *BYRF1*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Coordenadas en secuencia de referencia (línea celular B95.8, N.º de acceso GeneBank NC_007605)
E2C Delantero	AGGGATGCCTGGACACAAGA	48810—48829
E2SEQ4 Reverso	GTAATGGCATAGGTGGAATG	49374—49355
2 A.2 Reverso	TTCTGGACTATCTGGATCAT	49328—49309

Para llevar a cabo la primera ronda de la *PCR* se preparó una mezcla que contenía 5 µl de la solución tampón de *PCR* (1×), 2 µl de dNTPs (0,2 mM), 1,5 µl de cebador delantero E2C (1 µM), 1,5 µl de cebador reverso externo E2SEQ4 (1 µM), 5 µl de potenciador, volumen correspondiente a 500 ng de ADN, 0,2 µl de enzima polimerasa de ADN *Taq Platinum pfx* con actividad 3'-5' exonucleasa correctora

(todos los reactivos provistos por Thermo Fisher) y se agregó agua para llegar a un volumen final de 25 µl por reacción.

La segunda ronda de *PCR* fue llevada a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo 5 µl de la solución tampón de *PCR* (1×), 2 µl de dNTPs (0,2 mM), 1,5 µl de cebador delantero E2C (1 µM), 1,5 µl de cebador reverso 2A.2 (1 µM), 5 µl de potenciador, 2 µl del producto de la primera reacción de *PCR*, 0,2 µl de enzima polimerasa de ADN *Taq Platinum pfx* con actividad 3'-5' exonucleasa correctora (todos los reactivos provistos por Thermo Fisher) y se agregó agua para llegar al volumen final de reacción.

En cada ronda de *PCR* se utilizaron como controles positivos la línea celular B95.8 (EBV⁺) o a la línea celular Raji (EBV⁺), como control negativo la línea celular K562 (EBV⁻) y una reacción sin templado (se adicionaron 5 µl de H₂O) como control de no contaminación de los reactivos.

El programa de ciclado para ambas rondas de amplificación se realizó en un termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) según se describe en la (**Tabla 8**).

Tabla 8: Programa de 1° y 2° ronda de amplificación utilizados.

<i>Condiciones</i>	<i>Paso 1</i>	<i>Paso 2 (40 ciclos)</i>			<i>Paso 3</i>	<i>Paso 4</i>
<i>Temperatura</i>	95°C	95°C	52°C	72°C	72°C	15°C
<i>Tiempo</i>	5 min	45 seg	45 seg	45 seg	7 min	∞

4.9.4. Purificación y cuantificación de los productos de amplificación

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa *UltraPure Agarose* (Invitrogen) al 2 % disuelta en solución salina TAE 1x (40 mM Tris-Acetato pH 7,6; 1 mM EDTA) teñido con el colorante seguro *Sybr Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). Juntamente con las muestras se corrió el marcador de peso molecular comercial *CienMarker* (Biodynamics). La corrida electroforética se realizó a 100 V y amperaje variable durante 35 min en el caso de vIL10 y 50 min en el caso de EBNA2. Los geles fueron luego visualizados bajo luz ultravioleta en un transiluminador *Benchtop UV Transilluminator* (UVP). Los fragmentos de amplificación específicos se cortaron del gel con un bisturí estéril y los fragmentos de agarosa se colocaron en microtubos de 1,5 ml y se conservaron a -20°C hasta su purificación. A todas aquellas muestras de las cuales se obtuvo una banda en el gel de agarosa, correspondiente al fragmento amplificado de interés, se les realizó una segunda ronda de la segunda *PCR* y volvieron a ser corridas en el gel de agarosa, una vez cortadas las bandas se juntaron con las previamente obtenidas. De esta forma se obtuvo mayor cantidad de ADN para la secuenciación.

Dichas muestras, se purificaron con el equipo de reactivos comerciales *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen). Brevemente, a las bandas escindidas se les adicionó 600 µl de la solución QX1, 10 µl de la

resina comercial QIAEX II y se incubó a 50° C por 10 en bloque térmico. Se centrifugó la muestra por 30 segundos y se removió el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con 500 µl de la solución QX1, se mezcló en vortex hasta homogeneizar la muestra, nuevamente se centrifugó por 30 segundos y se removió el sobrenadante para eliminar los residuos de agarosa. Se lavó el *pellet* 2 veces con 400 µl de la solución PE, se mezcló en vortex hasta homogeneizar la muestra y nuevamente se centrifugó por 30 segundos y se removió el sobrenadante para eliminar los residuos de sales contaminantes. Se dejó secar el *pellet* según las indicaciones del fabricante. Para eluir el ADN se agregaron 20 µl de agua, se mezcló en vortex y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se centrifugó por 30 segundos y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo, el cual contenía el ADN purificado.

Se cuantificó y se evaluó la pureza del ADN purificado en un espectrofotómetro de nano gota *NanoDrop One* (Thermo Fisher).

4.9.5. Secuenciación automatizada

Los productos de amplificación se secuenciaron en un secuenciador *ABI 3500 DNA Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) con el reactivo comercial de secuenciación *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), en la Unidad de Investigación Traslacional (UIT), del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”. Para cada producto de amplificación se realizaron dos reacciones de secuenciación, una en sentido *forward*, sentido 5´ a 3´ de la hebra codificante, y una reacción *reverse*, sentido 3´ a 5´ de la hebra codificante. Cada mezcla de amplificación con didesoxinucleótidos fluorescentes terminadores de cadena (ddNTPs), se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: 2µl de cada uno de los cebadores utilizados en el segundo ciclo de *PCR* anidada, tanto delantero como reverso, pero en tubos separados (5 µM), 1,75 µl de solución tampón, 0,5 µl de reactivo *BigDye Terminator* que contiene los ddNTPs, desoxinucleótidos (dNTPs) y la enzima ADN polimerasa. Finalmente, a cada tubo de reacción se le adicionó el volumen correspondiente a 40 ng de ADN y se completó con H₂O hasta un volumen final de 10 µl.

El ciclo de amplificación se realizó siguiendo las condiciones detalladas en la **Tabla 9** en el termociclador *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems) de la UIT.

Luego de la amplificación, los productos amplificados fueron traspasados a diferentes pocillos de una placa de 96 pocillos, donde se llevó a cabo la precipitación pre-secuenciación. A tal fin, se agregaron 40 µl de una solución S1 (30 µl de Etanol + 10 µl de agua) a cada pocillo, se tapó la placa y se mezcló utilizando un vortex durante 15 segundos a 1800 rpm. Luego, se incubó la placa durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se centrifugó 30 min a 2500 g y a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante por volcado directo. Se agregaron 150 µl de una solución S2 (105 µl de Etanol + 45 µl de agua) a cada pocillo, se mezcló utilizando un vortex para placas durante 15 segundos a 1800 rpm. Se centrifugó 10 min a 2000 g a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante por volcado

directo, en este caso se dejó la placa boca abajo sobre un papel absorbente. Luego, se centrifugó la placa invertida 20 segundos a 400 g y se dejó evaporar el etanol 5 minutos en oscuridad. Finalmente se adicionaron 10 µl de formamida por pocillo, se mezcló utilizando un vortex vigorosamente durante 15 segundos, se centrifugó 20 segundos a 400 g y se colocó en el termociclador 2 minutos a 95 ° C para desnaturalizar el ADN. Una vez finalizado el ciclo, se colocó la placa en una gradilla refrigerada y se agregó una septa de goma para cubrirla. Finalmente, la placa se colocó en el analizador genético y se seleccionó el programa de secuenciación acorde a la longitud de cada fragmento a secuenciar.

Tabla 9: Condiciones de ciclado previo a la secuenciación.

<i>Condiciones</i>	<i>Paso 1</i>	<i>Paso 2 (40 ciclos)</i>		<i>Paso 3</i>
<i>Temperatura</i>	96°C	96°C	50° C	60° C
<i>Tiempo</i>	1 min	10 seg	5 seg	4 min

4.9.6. Análisis de secuencias y reconstrucción filogenética

Las secuencias se editaron, alinearon y analizaron con el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versión 7.0 (Hall, 1999). La reconstrucción de las relaciones filogenéticas para identificar asociaciones con la patología (EM) y geografía se realizó bajo el modelo de máxima verosimilitud con el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*; MEGA versión X (Kumar et al., 2018). La estimación del modelo evolutivo de cada alineamiento de secuencias analizadas se realizó con el programa MEGAX (**Tabla 10**). Este programa utiliza el algoritmo de máxima verosimilitud para estimar, con valor estadístico, cuál es el modelo de evolución que más se ajusta a los datos experimentales. La validación estadística de la topología de cada árbol fue realizada mediante remuestreo (1000 pseudoréplicas), siguiendo el mismo modelo de evolución deducido anteriormente. Para la visualización de los árboles filogenéticos se utilizó el programa MEGAX.

En el caso del alineamiento de gen *BYRF1* que codifica para la proteína viral EBNA2, se usaron secuencias de referencia descargadas de *Genbank*: B95.8 (número de acceso de *Genbank* NC007605.1), Raji (número de acceso de *Genbank* KF717093.1) y GD1 (número de acceso de *Genbank* AY961628.3). Y además se crearon los alelos 1.1, 1.2A, 1.2B, 1.3A y 1.3B usando de base la secuencia de la línea de referencia B95.8 y modificando las bases nucleotídicas que se describen para dichos alelos y que fueron originalmente descritas y publicadas por Mechelli y col (Mechelli et al., 2015a). Además, para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas y con el objetivo de identificar asociaciones con la geografía y otras patologías se generó un *dataset* balanceado por geografía y patología con secuencias que se extrajeron de *Genbank* que pertenecían a diferentes regiones geográficas del mundo (Argentina (n = 30), Europa (n = 32), Asia (n = 35), Asia Occidental (n = 5), África (n = 36), Estados Unidos (n =

19), Australia (n = 18), Indonesia (n = 26) y Papúa Nueva Guinea (n = 6)). Dichas secuencias provenían de aislamientos de distintas patologías neoplásicas como linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos y desórdenes linfoproliferativos postrasplante. También se incluyeron secuencias de aislamientos provenientes de pacientes con mononucleosis infecciosa y, por último, muestras no neoplásicas de dadores sanos.

Nota: Dado que se trata de un virus ADN que presenta poca variabilidad genómica la secuenciación directa resulta ser una metodología adecuada para el estudio de polimorfismo de diferentes genes de este virus. Más aún, los resultados previos obtenidos por este grupo de trabajo para otras regiones genómicas han demostrado que esta técnica permite poner en evidencia sin dificultad la presencia de coinfecciones con distintas variantes virales.

Tabla 10: Modelos de evolución.

Alineamiento	Modelo de evolución	Parámetros
<i>Gen BCRF1</i>	JC	Todas las sustituciones con igual probabilidad; Igual frecuencia de bases (A = 0,250; C = 0,250; G = 0,250; T = 0,250) R=0,5
<i>Porción 3' C-ter del gen BYRF1</i>	JC + G	Todas las sustituciones con igual probabilidad; Igual frecuencia de bases (A = 0,250; C = 0,250; G = 0,250; T = 0,250) R=0,5

JC: Jukes-Cantor; JC+G: Jukes-Cantor con tasa de variación entre sitios que siguen una distribución gamma (G).

4.10. Preparación de muestras para RNA-seq.

4.10.1. Separación de linfocitos B con infección latente por el EBV a través del Método para analizar ARN luego de una separación intracelular (MARIS)

4.10.1.1. Aislamiento de linfocitos B vírgenes y de memoria mediante inmuno selección positiva.

Luego de la separación de las CMSP, se realizó el aislamiento de linfocitos B de memoria siguiendo las instrucciones del reactivo *EasySep Human Memory B cells Isolation Kit* (Stemcell). Este *kit* se basa en un ensayo de inmuno selección positiva sin utilizar columnas. En resumen, se colocaron las CMSP resuspendidas en la solución tampón *EasySep* en un tubo al que luego se le adicionó una mezcla de anticuerpos y partículas magnéticas (*Releasable RapidSpheres*) que se unen a las células CD27⁺. Luego se colocó el tubo con la mezcla en una gradilla con magnetos, donde las partículas magnéticas quedan adheridas a la pared del tubo. En este caso, el sobrenadante es volcado en un tubo nuevo sin sacar el

anterior del magneto. En el caso deseado de separar los linfocitos B vírgenes se conserva el sobrenadante para su posterior procesamiento. Se sacó el tubo del magneto y se eliminaron las partículas magnéticas mediante varios lavados. Luego se adicionaron otra serie de anticuerpos y partículas magnéticas (*Dextran RapidSpheres*) que se unen a las células que no sean las de interés y colocando el tubo en el magneto, se eliminan todas las células que no sean los linfocitos B de memoria. El sobrenadante se vertió en un tubo nuevo sin sacar el anterior del magneto y esta fracción final del aislamiento contenía las células de memoria altamente purificadas.

Para aislar los linfocitos B vírgenes se continuó trabajando con el tubo que se separó en el primer paso del protocolo. Al sobrenadante se le agregaron las partículas magnéticas (*Dextran RapidSpheres*) que se unen a las células que no sean las de interés y colocando el tubo en el magneto se eliminaron todas las células que no sean los linfocitos B vírgenes. El sobrenadante se vertió en un tubo nuevo sin sacar el anterior del magneto y esta fracción final del aislamiento contenía las células vírgenes altamente purificadas.

Con este método fue posible obtener una pureza del 95.4 ± 4.4 (%) para los linfocitos B de memoria y del 90.6 ± 9.0 (%) para los linfocitos B vírgenes.

4.10.1.2. MARIS (Method for Analyzing RNA following Intracellular Sorting)

Con el objetivo de separar por citometría de flujo los linfocitos B EBV⁺ y EBV⁻ y luego aislar el ARN de dichas células para realizar un *RNA-seq* se utilizó un método para analizar ARN luego de una separación intracelular (*MARIS*, por sus siglas en inglés) (Hrvatín et al., 2014). Esta técnica permite obtener ARN de alta calidad de distintos tipos celulares para el análisis de transcriptoma después de la fijación celular, la tinción inmunofluorescente intracelular y el posterior *Cell-Sorting*. En particular para mantener la integridad del ARN, se utilizó en todos los pasos del protocolo el inhibidor de ribonucleasas eucarióticas *RNasin Plus Ribonuclease Inhibitor* (Promega), cuya función es evitar que dichas enzimas degraden el ARN.

Los linfocitos B de memoria y B vírgenes aislados previamente fueron fijados y permeabilizados con la solución *Fix/Perm* (4 % PFA paraformaldehído, 0,1 % saponina en PBS suplementado con *RNasin* en una proporción 1:100). Las células se incubaron por 30 minutos a 4°C. y luego se centrifugaron a 3000 g por 3 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y finalmente se realizó un lavado con solución de lavado (0.2 % BSA, 0.1 % saponina en PBS suplementado con 1:100 de *RNasin*). Para la tinción con los anticuerpos, detallados en la siguiente sección, los mismos fueron diluidos en una solución de tinción (1 % BSA, 0.1 % saponina en PBS suplementado con 1:25 de *RNasin*), y se resuspendieron las células en la mencionada solución. Se colocaron los tubos en un agitador rotatorio bidireccional por 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Se centrifugaron las células a 3000 g por 3 minutos y se descartó el

sobrenadante. Se realizaron dos lavados con la solución de lavado y, por último, se resuspendieron las células en solución de corrida (0.5 % BSA en PBS suplementado con 1:25 de RNAsin).

4.10.1.3. Separación de células utilizando citometría de flujo (Cell-Sorting)

Las células B infectadas en forma latente por EBV se detectaron mediante la evaluación de la expresión del antígeno viral EBNA1 mediante una marcación intracelular. Se realizaron controles para determinar la autofluorescencia de las células donde se utilizaron los linfocitos B tanto vírgenes como de memoria sin marcación o tinción. Luego se usaron los controles de isotipo, anticuerpos que carecen de especificidad hacia un blanco de las células, pero son de la misma clase y tipo de los anticuerpos utilizados en la marcación. Para este fin se utilizó el *Mouse IgG1 kappa Isotype Control* (P3.6.2.8.1, Thermo Fisher, 1:100) como control de isotipo de FITC y el *Mouse IgG2b kappa Isotype Control* (eBMG2b, Thermo Fisher, 1:100) como control de isotipo de PE. Por último, se usaron marcaciones simples que sirven para la compensación de los fluoróforos. En este caso, se utilizaron el anti-CD20 (APC, Thermo Fisher, 1:100) y el anti-EBNA1 (PE, Santa Cruz Biotechnology, 1:100).

La separación de las células se realizó utilizando el citómetro de flujo *FACSaria II* (Becton Dickinson). Se separaron 2 poblaciones: CD20⁺ EBNA1⁺ y CD20⁺ EBNA1⁻. La selección de las poblaciones se realizó según la estrategia de *gating* que puede observarse en la **figura 7**. Cada población celular separada fue resuspendida en 750 µl de reactivo inhibidor de enzimas degradadoras del ARN *TRIZol Reagent* (Invitrogen) y se las remitió al *Broad Institute* en Massachusetts, Estados Unidos de Norte América, para realizar el ensayo de secuenciación de ARN (*RNA-seq*). La realización del *RNA-seq* y su posterior análisis bioinformático se realizó a través de la colaboración con el Dr. Francisco Quintana y su equipo de trabajo.

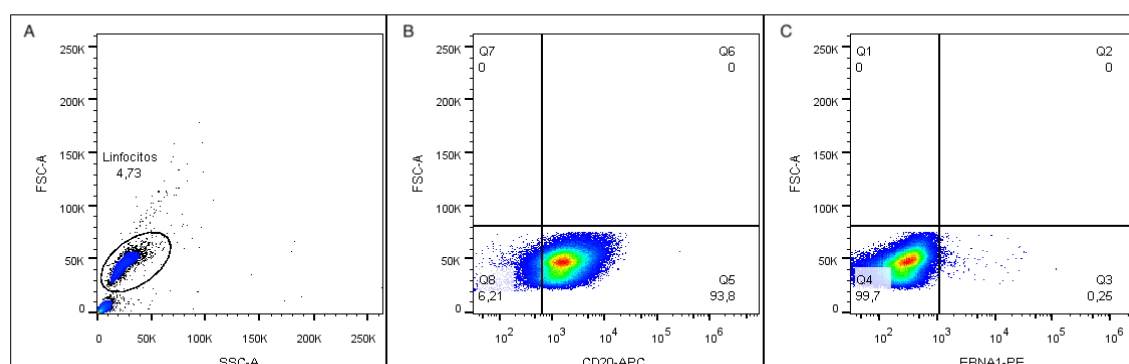


Figura 7: A) Se seleccionó la población correspondiente a los Linfocitos. B) Dentro de la población de linfocitos se seleccionaron los Linfocitos B CD20⁺ (Visualizados en el cuadrante Q6). C) Dentro de la población de linfocitos B, se seleccionaron los EBNA1⁺ (Visualizados en el cuadrante Q3) y los EBNA1⁻ (Visualizados en el cuadrante Q4).

4.11. Ensayos en ratones in vitro

Debido a que en los resultados del RNA-seq se vio una disminución en la expresión de ARNm de *Iqgap1*, en los linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁺ de pacientes con EM comparado con linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁻ de pacientes con EM, se decidió realizar ensayos *in vitro*, simulando los resultados obtenidos. Por lo tanto, se silenció *Iqgap1*, en linfocitos B de ratones (lo cual representaría a los linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁺ de los pacientes con EM) y se los compararon con linfocitos B de ratones sin silenciar ningún gen (lo cual representaría a los linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁻).

Dichos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Francisco Quintana en el *Brigham And Women's Hospital*, de la Universidad de Harvard, Boston, Estados Unidos, bajo su tutela y también la de la Dra. Liliana Sanmarco. Esta colaboración, se realizó en el marco de la beca de capacitación *Du Pré* otorgada mediante concurso por la Asociación Internacional de Esclerosis Múltiple (*MSIF*, por sus siglas en inglés) entre enero y junio del 2019.

Estos experimentos que implican el uso de animales de laboratorio cuentan con la aprobación del *Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)* del *Brigham and Women's Hospital*, Número de protocolo 2016N000335, para asegurar el bienestar de los animales involucrados en el proyecto de investigación (*Anexo G*).

4.11.1. Ratones

Par el aislamiento de los linfocitos B se utilizaron ratones salvajes C57BL/6J (Cepa #:000664, *The Jackson Laboratory*) (n = 4) de entre 8 a 10 semanas.

Para el aislamiento de los linfocitos T, se sacrificaron ratones OTII (Cepa #:004194, *The Jackson Laboratory*) (n = 4) y 2D2 (Cepa #:006912, *The Jackson Laboratory*) (n = 4) de entre 8 a 10 semanas. Los ratones OTII tienen el TCR específico para la proteína ovoalbúmina de gallina (OVA₃₂₃₋₃₃₉) en el contexto de MHCII. Por lo tanto, administrando OVA₃₂₃₋₃₃₉ al medio de cultivo se puede estudiar la biología de los linfocitos T, las interacciones TCR-ligando, la activación de células T, la selección tímica, la presentación cruzada de antígenos y la tolerancia e inducción de células T centrales y periféricas (Barnden et al., 1998). Por otro lado, los ratones 2D2 tienen el TCR re arreglado para reconocer una fracción de la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG₃₅₋₅₅). Por lo tanto, administrando MOG₃₅₋₅₅ al medio de cultivo es posible estudiar el repertorio de células T específicas para MOG, así como también estudiar la neuritis óptica y su relación con el desarrollo de la autoinmunidad en el SNC (Bettelli et al., 2003).

Se utilizaron estos ratones ya que los OTII son un modelo general de autoinmunidad, mientras que los 2D2 son el modelo más utilizado para estudiar la EM, ya que desarrollan la enfermedad de forma similar en incidencia y manifestación a las que desarrollan los pacientes con esclerosis múltiple.

4.11.2. Aislamiento de linfocitos B

Se sacrificaron los ratones salvajes ($n = 2$) y se les extrajo el bazo para la extracción de esplenocitos mediante la utilización de un tamizador celular de 70 μm . Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1500 rpm, seguido de una incubación con 1 ml de solución de lisis de Amonio-Cloruro-Potasio (ACK, Thermo Fisher) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para neutralizar dicha solución, se adicionaron 20 ml de solución salina fría (PBS, 0.5 % de BSA y 2 mM de EDTA). Finalmente se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante.

Luego de la separación de las células, se realizó el aislamiento de linfocitos B siguiendo las instrucciones del kit comercial *B cells isolation kit mouse* (Macs Miltenyi Biotec). El kit se basa en un ensayo de inmuno selección negativa utilizando columnas LS. En breve, a las células resuspendidas en la solución tampón fría se le adicionó una mezcla de anticuerpos biotinilados provistos por el kit de reactivos previamente mencionado, que se unen a las células CD43^+ y CD4^+ . A continuación, se resuspendieron las células y se incubaron por 5 min a 4°C , luego se realizó un lavado con la solución tampón fría, se agregaron las partículas magnéticas anti-biotina y se mezclaron e incubaron a 4°C por 10 min. Posteriormente se colocó la columna en el separador *QuadroMACS* (Macs Miltenyi Biotec) y se volcó la suspensión celular a la columna. Las partículas magnéticas quedaron adheridas a la pared de la columna y se recuperó el eluato que contenía los linfocitos B no marcados.

4.11.3. Cultivo de linfocitos B

Se contaron las células en cámara de Neubauer y se plaquearon entre 100.000 - 200.000 células por pocillo en placa de 12 pocillos. Se agregaron 15 $\mu\text{g/mL}$ de $\alpha\text{-IgM}$ y 500 μl de medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 5 mM de HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin y 50 μM de $\beta\text{-mercaptoetanol}$ (todos los reactivos provistos por Gibco). A su vez se prepararon los ARN de silenciamiento (siARN) específico para *Iqgap* (*Iqgap1*-siRNA, específico para el gen de interés (Dharmacon)) y *scramble* (Scr-siARN, control sin ARN diana específico (Dharmacon)). Se resuspendieron los liofilizados en 250 μl de agua ultrapura. Se prepararon 100 μl de medio *Opti-MEM I Reduced Serum Medium* (Thermo Fisher Scientific) + 1,5 μl de siARN + 2 μl de *INTERFERin Transfection Reagent* (Polyplus-transfection) y se dejó reposar la mezcla por 10 min a temperatura ambiente. Luego se adicionó dicha mezcla a cada pocillo, obteniendo un volumen final de 603,5 μl . Cada condición se sembró por triplicado, la placa se incubó en estufa a 37°C en condiciones de 5 % de CO_2 por 3 días. Cada día se centrifugó la placa y se aspiró el sobrenadante de 3 pocillos del control y del gen silenciado y a su vez; al pellet de cada well se le agregaron 350 μl de la solución de lisis *RNeasy Lysis Buffer* (RLT) (Qiagen). Finalmente, el sobrenadante se congeló a -20°C para evaluar expresión de citoquinas con la técnica de ELISA y el pellet fue mantenido a -70°C para evaluar el silenciamiento del gen por *qPCR*.

4.11.4. Aislamiento de ARN

A partir de los linfocitos B, se purificó el ARN utilizando el *kit* comercial *RNeasy Mini kit* (Qiagen). Brevemente, se adicionaron 350 µl de etanol 70 % al lisado de células y se mezcló con la pipeta. Se transfirieron los 700 µl de la muestra, incluyendo cualquier precipitado a una columna (*RNeasy mini*) ubicada dentro de un tubo colector de 2 ml. Se centrifugó por 1 min a 8000 g y se descartó el eluato. Se agregaron 700 µl de solución tampón RW1 a la columna, se centrifugó por 1 min a 8000 g y se descartó el eluato. A continuación, se agregaron 500 µl de solución tampón RPE a la columna, se cerró la tapa, se centrifugó por 1 min a 8000 g y se descartó el eluato. A fin de garantizar que el ARN se encontrará libre de contaminantes de la solución RPE se repitió el último paso, solo cambiando el tiempo de centrifugación por 2 min a 8000 g para finalmente descartar el eluato. Se colocó la columna dentro de un nuevo tubo colector y se centrifugó a 16000 rpm por 1 min para secar la membrana. Por último, se colocó la columna en un nuevo tubo colector, se agregaron 30 µl de agua libre de RNasas y se centrifugó por 1 min a 8000 g para eluir el ARN. El ARN se colocó inmediatamente en hielo si iba a ser usado en el momento, o se congeló a -70°C si iba a ser usado con posterioridad.

4.11.5. Síntesis de ADNc

Luego de realizar la cuantificación del ARN por absorbancia a 260 nm utilizando espectrofotómetro de nano gota *Qubit 4 Fluorometer* (Thermo Fisher), se preparó la reacción de síntesis de ADNc siguiendo las instrucciones del equipo de reactivos *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life technologies) utilizando una solución tampón 10× RT, dNTPs 25×, cebadores al azar 10×, Transcriptasa reversa, 2 µg de ARN y agua hasta completar un volumen final de reacción de 20 µl (todos los reactivos provistos por (Applied Biosystems). Los tubos individuales se colocaron dentro del termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) y se utilizó el programa detallado a continuación (**Tabla 11**).

Tabla 11: Condiciones de ciclado utilizado para la síntesis del ADNc.

<i>Condiciones</i>	<i>Paso 1</i>	<i>Paso 2</i>	<i>Paso 3</i>	<i>Paso 4</i>
<i>Temperatura</i>	25°C	37°C	85°C	4°C
<i>Tiempo</i>	10 min	120 min	5min	∞

4.11.6. Reacción de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

4.11.6.1. Generación de curvas estándar

Antes de llevar a cabo cada reacción de qPCR se generaron las curvas estándar correspondientes. Brevemente, para generar dichas curvas, se utilizó ADNc de linfocitos B provenientes de los ratones salvajes y por separado ADNc de linfocitos T provenientes de los ratones OTII y 2D2. A partir de este ADNc se realizaron 5 diluciones seriadas al décimo. Por duplicado, se realizaron las reacciones de amplificación específicas a las temperaturas correspondientes tanto para los genes de interés y su respectivo control o gen endógeno (*housekeeping*). Las diluciones, en todos los casos, se consideraron correctas cuando la diferencia de Ct entre cada punto de las curvas fuera de 3,3 ciclos. El valor de Ct refleja el número de ciclo al cual el nivel de fluorescencia alcanzado supera el umbral, valor que es proporcional a la cantidad de material genómico presente en la muestra original.

A partir de la gráfica de la curva de amplificación en fase lineal, se estableció la línea de base dos ciclos antes del comienzo de la amplificación. Se estableció el valor de umbral y línea de base, tanto para las curvas estándar del gen *housekeeping* como para los genes de interés. En el caso del valor umbral, este se estableció sobre la gráfica en escala logarítmica y dentro de la fase exponencial de la curva de amplificación. Una vez establecidos estos parámetros, se registró el valor del ciclo en el cual el nivel de fluorescencia detectada superó el umbral (Ct), correspondiente al primer punto de la curva. El valor de Ct obtenido a partir del primer punto de cada una de las curvas de calibración, se empleó como el valor de Ct del “calibrador” en el cálculo de la expresión relativa.

Para todos los genes evaluados, se graficó el promedio del Ct obtenido en cada dilución en función del logaritmo de dicha dilución. A partir de estas curvas, se determinó la eficiencia de amplificación (E) y el coeficiente de correlación (R) en cada caso. Se consideró una buena eficiencia cuando ésta se encontrará dentro del rango de 90 - 110 %. En el caso de que se encuentre dentro de dicho rango, el valor de la eficiencia permite evidenciar que, finalizado cada ciclo de amplificación, el templado se duplicó durante la etapa exponencial del ciclo. Esta se calculó aplicando la ecuación (1):

$$\text{Eficiencia (E)} = 10^{(-1/\text{Pendiente})} - 1 \quad (1)$$

A su vez, se determinó el ΔCt para cada valor entre las curvas de los genes *housekeeping* y las curvas correspondientes a los genes de interés. Se graficó el logaritmo de la dilución en función del ΔCt y se obtuvo el dato de la pendiente de dicha recta, el cual proporciona información acerca de la similitud de los niveles de expresión entre el gen de interés y el gen *housekeeping* respecto a cada dilución. Se consideró un valor de pendiente $< 0,1$ como criterio para considerar una diferencia constante de Ct en todas las diluciones y validar el uso de los genes endógenos.

Una vez obtenidas las curvas estándar, se ensayaron las muestras de interés. Se amplificó el gen endógeno y el transcripto de interés, registrándose el valor Ct para cada muestra (valor Ct “muestra” en la ecuación 2).

Por último, la expresión génica se determinó mediante una cuantificación relativa. Según el método $\Delta\Delta C_t$, se calculó la relación de cambio (RQ) para los transcriptos ensayados en cada caso según la ecuación (2):

$$\text{Relación de cambio (RQ)} = \frac{E(IQGAP1)}{E(HPRT)} \frac{\Delta C_t(\text{calibrador} - \text{muestra})}{\Delta C_t(\text{calibrador} - \text{muestra})} \quad (2)$$

4.11.6.2. Cuantificación relativa del ARNm

Una vez obtenido el ADNc se realizó la reacción de *qPCR*. Se preparó la mezcla utilizando *Fast Master Mix* (1×) (Thermo Fisher), la sonda *TaqMan* específica (1×) y agua. Se agregaron 5,5 µl de mezcla por reacción y 4,5 µl de ADNc. Cada reacción se realizó por duplicado. Las sondas usadas fueron *Iqgap1* (Mm01313746_m1, Thermo Fisher) y *Gapdh* (Mm99999915_g1, Thermo Fisher) para comprobar el silenciamiento del gen *Iqgap1*. También se evaluaron otros genes de interés: *Il10* (Mm01288386_m1, Thermo Fisher), *Il6* (Mm00446190_m1, Thermo Fisher), *Csf2* (Mm01290062_m1, Thermo Fisher) y *Tnf* (Mm00443258_m1, Thermo Fisher). A su vez, en cada corrida se realizaron los controles correspondientes a la reacción de *qPCR*. Se utilizó un control negativo, o control sin templado (NTC, *non template control*), reemplazando al ADNc con 4,5 µl de H₂O destilada con el objetivo de controlar que los reactivos utilizados en la reacción no se encontraran contaminados.

Se utilizó el equipo *ViiA 7 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), el método experimental fue el Ct comparativo ($\Delta\Delta C_t$) en modo rápido. Se colocaron 10 µl de reacción en cada pocillo de las placas *MicroAmp Optical 384-Well* (Applied Biosystem) y se utilizó el programa detallado a continuación (**Tabla 12**). Se realizaron 6 réplicas de cada condición.

Tabla 12: Ciclado utilizado para la *qPCR*.

Parámetros	Activación de la polimerasa	PCR (60 Ciclos)	
		Desnaturalización	Elongación
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tiempo	10min	15 seg	1 min

4.12. Silenciamiento de *Iqgap1* en linfocitos B y posterior cocultivo con linfocitos T

4.12.1. Aislamiento de linfocitos B y T

Para el aislamiento de los linfocitos B se siguió el protocolo detallado en la sección 11.2. Para el aislamiento de los linfocitos T provenientes de los ratones OTII y 2D2 se siguieron las instrucciones del equipo de reactivos *Naive CD4⁺ T cell isolation kit mouse* (Macs Miltenyi Biotec). El kit se basa en un ensayo de inmuno selección negativa utilizando columnas LS. En breve, a las células resuspendidas en la solución tampón fría (PBS, 0.5% de BSA y 2 mM de EDTA) se le adicionó una mezcla de anticuerpos biotinilados, provistos en el kit, y que se unen a las células: CD11b, CD11c, CD19, CD25, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC class II, Ter-119, y TCR γ/δ . Se resuspendió e incubó por 5 min a 4°C, se realizó un lavado con la solución tampón fría y se agregaron las partículas magnéticas anti-biotina y las anti-CD44 y se mezclaron e incubaron por 10 min a 4°C. Posteriormente se colocó la columna en el separador *QuadroMACS* (Macs Miltenyi Biotec) y se trasvasó la suspensión celular a la columna. Las partículas magnéticas quedaron adheridas a la pared de la columna, y se recuperó el eluato que contenía los linfocitos T no marcados.

4.12.2. Cocultivo de linfocitos B y T

Se contaron las células en cámara de Neubauer y se plaquearon entre 300.000 y 600.000 células T por pocillo en placa de 24 pocillos. Se las cultivaron durante 3 días con 10 $\mu\text{g/ml}$ de α -CD3 (BioLegend) + 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de α -CD28 (BioLegend). Luego se cocultivaron los linfocitos T con linfocitos B que habían sido silenciados previamente según se describió en el apartado 11.3 en una proporción 3:1 (3T:1B) y además se les agregó el péptido correspondiente: a los cultivos de linfocitos T provenientes de ratones OTII se les agregó el péptido OVA (10 $\mu\text{g/ml}$) y a los cultivos de linfocitos T provenientes de ratones 2D2 se les agregó el péptido MOG (20 $\mu\text{g/ml}$) según se describe en la **Tabla 13**.

Cada condición se sembró por triplicado y la placa se incubó en estufa a 37°C en condiciones de 5 % de CO₂ durante 3 días.

Tabla 13: Condiciones de los pocillos para el cocultivo de linfocitos T y B.

Scr siRNA 3T:1B OTII + OVA	Scr siRNA 3T:1B OTII + OVA	Scr siRNA 3T:1B OTII + OVA	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B OTII + OVA	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B OTII + OVA	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B OTII + OVA
Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG	Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG	Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG

4.12.3. Proliferación celular

La proliferación celular de los linfocitos B fue evaluada utilizando el método de incorporación de timidina tritiada. Para ello, se cultivaron los linfocitos B en placas de 96 pocillos, con 1 µl de timidina y 19 µl de medio de cultivo RPMI, suplementado con α-IgM (todos los reactivos provistos por Gibco). La placa fue incubada a 37°C durante toda la noche. La timidina radiactiva incorporada al ADN fue luego cuantificada en un contador de centelleo *TRI-CARB 4910TR 110 V Liquid Scintillation Counter* (PerkinElmer). Los grupos evaluados fueron linfocitos B con el ARN de silenciamiento control (*Scr-siARN*) y el dirigido hacia el blanco de interés (*Iqgap1-siRNA*). Se hicieron 6 réplicas de cada condición.

4.12.4. Citometría de flujo

4.12.4.1. Tinción de marcadores de superficie e intracelulares

Luego de 3 días de cocultivo de los linfocitos T y B, se centrifugó la placa y se recuperó el sobrenadante, que fue conservado a -20°C para un posterior ensayo de medición de citoquinas por ELISA. Al pellet, se le adicionaron 200 µl de una mezcla, que contenía *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA, Sigma-Aldrich, 50 ng/ml), ionomicina (Sigma-Aldrich, 1 µM), *GolgiStop* (BD Biosciences, 1:1500) and *GolgiPlug* (BD Biosciences, 1:1500) diluido en medio de cultivo RPMI (Life Technologies) conteniendo 10 % suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich), 1 % solución penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), 50 µM 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y 1 % aminoácidos no esenciales (Life Technologies).

Se incubó la placa por 4 h en la estufa a 37 grados. Se centrifugó 5 min a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante por volcado directo. Para la tinción de marcadores de superficie, se usó una concentración de anticuerpos entre 1/50 - 1/100 y en el caso del marcador de viabilidad LIVE/DEAD cell (405 Aqua, Thermo Fisher) se usó una concentración 1/1000. Se agregaron todos los anticuerpos a 2 mL de PBS/BSA/EDTA y se dispensaron 100 µl de la mezcla por pocillo. Se incubó a 4°C por 30 min en oscuridad. Se lavó con 100 µl de PBS/BSA/EDTA. Se centrifugó por 5 min 1500 rpm y se descartó el sobrenadante por volcado directo. Para la fijación se usó el equipo comercial de reactivos *Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set* (eBioscience). En resumen, se mezcló 1 ml de fijador y 3 ml de diluyente y se agregaron 75 µl de la mezcla a cada pocillo. Se incubó 20 min a temperatura ambiente. Se lavó con 100 µl de una solución tampón de lavado 10×. Se centrifugó 5 min a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante por volcado directo.

Para la tinción intracelular se utilizó una concentración de anticuerpos 1/100, se usaron 20 µl de cada anticuerpo que fue diluido en 2 mL de solución tampón de lavado. Se agregaron 100 µl de la mezcla por pocillo y se incubó durante 45 min a 4°C protegido de la oscuridad. Se lavó con 100 µl de una solución tampón de lavado 10×. Se centrifugó 5 min a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante por volcado directo. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en una solución de PBS/BSA/EDTA en un volumen de 180 µl por

pocillo y se conservó a 4°C protegido de la luz hasta el momento de la citometría. La citometría de flujo se realizó utilizando el equipo *Symphony A5* (BD Biosciences).

4.12.5. Diferenciación de linfocitos T

Se aislaron y cultivaron los linfocitos T de un ratón 2D2 como se explicó en la sección 13.1. Una vez que fueron cultivados, se adicionaron distintos estímulos para diferenciar a los linfocitos en los linajes de interés (Th1 y Th17). Por un lado, para diferenciar a linfocitos Th1 además de utilizar α -CD3 y α -CD28, se agregó a la mezcla IL-12 (R&D Systems, 30 ng/ml) + α -IL-4 (BioLegend, 2,5 μ g/ml) y, en paralelo, para diferenciar los linfocitos T a Th17 sumados al α -CD3 y α -CD28, se adicionó IL-6 (R&D Systems, 30 ng/ml) + TGF- β (Miltenyi, 3 ng/ml) + IL-23 (Thermo Fisher Scientific, 30 ng/ml) + α -IL-4 + α -IFN γ (R&D Systems, 5 μ g/ml). Luego de 3 días de cultivo, se cocultivaron los linfocitos T diferenciados con los linfocitos B previamente silenciados y se agregó el péptido MOG (**Tabla 14**).

Luego de 3 días de cocultivo, se centrifugó la placa, se guardó el sobrenadante para medir citoquinas por ELISA y se usó el pellet para evaluar distintos marcadores por citometría de flujo y *qPCR*.

Tabla 14: Condiciones de los pocillos para el cocultivo de linfocitos T diferenciados y linfocitos B.

Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th0	Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th0	Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th0	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th0	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th0	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th0
Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th1	Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th1	Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th1	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th1	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th1	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th1
Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th17	Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th17	Scr siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th17	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th17	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th17	<i>Iqgap1</i> -siRNA 3T:1B 2D2 + MOG Th17

4.12.6. Presentación antigénica

Para evaluar la presentación antigénica se realizó citometría de flujo como se explicó en la sección 13.3. Se evaluaron los marcadores de superficie anti-CD3 de ratón (BV750, Biolegend, 1:50), anti-CD4 de ratón (PECy7, eBioscience, 1:100), anti-CD19 de ratón (BV605, Biolegend 1:100) para determinar los linajes celulares y luego anti-I-A/I-E de ratón (BUV395, BD Bioscience, 1:100), anti-CD80 de ratón

(BUV737, BD Bioscience, 1:100) y anti-CD86 de ratón (BUV563, BD Bioscience, 1:100) que son moléculas coestimuladoras presentes en las células presentadoras de antígenos.

4.12.7. Análisis de factores de transcripción

Para el análisis de factores de transcripción por *qPCR*, se siguieron los pasos detallados en la sección 11.6. Se evaluó la expresión de *Tbx21* (Mm00450960_m1, Thermo Fisher), el factor de transcripción de las células Th1; *Rorc* (Mm01261022_m1, Thermo Fisher), factor de transcripción de las células Th17 y *Foxp3* (Mm00475162_m1, Thermo Fisher), factor de transcripción de las células Treg.

4.12.8. Análisis de citoquinas por qPCR

El estudio de citoquinas se realizó por *qPCR*. Se evaluó la expresión relativa de *Il10* (Mm01288386_m1, Thermo Fisher), *Csf2* (Mm01290062_m1, Thermo Fisher), *Il17* (Mm00439618_m1, Thermo Fisher), *Ifnγ* (Mm01168134_m1, Thermo Fisher) y *Tnfα* (Mm00443258_m1, Thermo Fisher).

4.12.9. Análisis de citoquinas por ELISA

Utilizando la técnica de ELISA, se evaluó la concentración de citoquinas (IL-10, INFγ, GM-CSF, IL-6 y TNFα) secretadas tanto por los linfocitos B como los linfocitos T en cultivo.

Para sensibilizar la placa, se diluyeron los anticuerpos de captura en PBS 1×: anticuerpo de captura anti-GM-CSF (Invitrogen, 88-7334-88, 1:250), anticuerpo de captura anti-IL-10 (Invitrogen, 88-7105-88, 1:250), anticuerpo de captura purificado anti-IFNγ (BD Biosciences, 551309, 1:500), anticuerpo de captura purificado anti-IL-6 (BioLegend, 504501, 1:500) y anticuerpo de captura purificado anti-TNFα (Biocompare, 510802, 1:500). Se agregaron 100 μl de la dilución a cada pocillo de la placa, se cubrió la misma con un film y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se lavó la placa con PBS Tween 2× dos veces, luego se bloqueó con BSA 1× en PBS y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Mientras tanto, se prepararon las muestras y los estándares, que se diluyeron en una solución tampón Elispot (eBioscience) 1×. Se sembraron 50 μl de las muestras y los estándares en cada pocillo y se incubó 2 horas en agitador a 4° C. Al día siguiente las placas fueron lavadas 5 veces con PBS Tween 1× e incubados con los anticuerpos de detección diluidos en Elispot 1×: anticuerpo de detección anti-GM-CSF (Invitrogen, 1:250), anticuerpo de detección anti-IL-10 (Invitrogen, 1:250), anticuerpo biotinilado anti-IFNγ (BD Biosciences, 1:500), anticuerpo biotinilado anti-IL-6 (BioLegend, 1:500) y anticuerpo biotinilado anti-TNFα (BioLegend, 1:500) durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador rotatorio bidireccional. Luego, las placas fueron lavadas 8 veces con PBS Tween 1× e incubadas con Avidina-HRP diluida con Elispot 1× (Invitrogen, 1:250) durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador rotatorio bidireccional. Las placas fueron lavadas nuevamente 8 veces con PBS Tween 1× y se revelaron utilizando *TMB Substrate Solution* 1× (Invitrogen). La reacción se detuvo con *KPL TBM Stop Solution*

(SeraCare) y finalmente, se midió la absorbancia con el lector *Glo-Max Explorer Multimode Microplate Reader* (Promega) utilizando un filtro de 450 nm.

Para calcular la concentración de cada una de las citoquinas evaluadas, se diluyeron los estándares (6 diluciones seriadas al medio) y se graficó una recta con los valores de los estándares y sus correspondientes diluciones (**Tabla 16**). Una vez obtenida la ecuación de la recta, se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras y se obtuvo la concentración para cada una de ellas.

Tabla 16: Citoquinas evaluadas con la metodología de ELISA y armado de la curva estándar para cada una de ellas.

IL-10 e INF γ	Concentración ng/ml	GM-CSF e IL-6	Concentración pg/ml	TNF α	Concentración ng/ml
Std 1	10	Std 1	500	Std 1	1
Std 2	5	Std 2	250	Std 2	0,5
Std 3	2,5	Std 3	125	Std 3	0,25
Std 4	0,625	Std 4	62,5	Std 4	0,125
Std 5	0,312	Std 5	31,25	Std 5	0,0625
Std 6	0,156	Std 6	15,625	Std 6	0,0312

4.12.10. Proliferación celular de linfocitos B y T y marcadores de activación

Para evaluar la proliferación celular de los linfocitos luego del cocultivo, se utilizó la técnica de citometría de flujo. Se siguió la metodología detallada en la sección 13.3. En particular, se seleccionó la población CD19⁺ (Linfocitos B) y CD3⁺ y CD4⁺ (Linfocitos T), mientras que como marcador de proliferación se utilizó el anticuerpo anti-ki67 de ratón (AF700, BioLegend, 652419, 1:100). Como marcador de activación se usó el anti-CD44 de ratón (Pe–Cy5, BioLegend, 103010, 1:100).

4.13. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism 7.00. El estudio fue del tipo casos (pacientes con EM) vs controles. Las variables continuas fueron evaluadas con una prueba de t-Student en el caso de comparar dos variables o mediante ANOVA en caso de más de dos variables. Para determinar las diferencias entre grupos luego del ANOVA, se realizó una comparación de las medias mediante la prueba de Tukey. Aquellos datos que no siguieron una distribución normal se analizaron aplicando una prueba de Mann Whitney o de Kruskall Wallis, según el número de grupos, con comparación entre columnas con el post test de Dunns según correspondiera. Se efectuó el coeficiente de correlación de Pearson para calcular el grado de asociación entre variables continuas normalmente

distribuidas y el de Spearman para variables no paramétricas. Todas las pruebas fueron *two tailed* y los valores de $P < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

5. Resultados

*Resultados**5.1. Descripción demográfica de la población en estudio*

La población en estudio se compuso de 48 hombres y 80 mujeres que formaron parte de la cohorte de pacientes con EM y 68 hombres y 59 mujeres que formaron parte del grupo control. El rango etario fue de 25-73 años con una mediana de 43,4 en el caso de los pacientes con EM y de 25-75 años con una mediana de 45,1 en el caso de los controles. La edad al inicio de los síntomas de la enfermedad fue en promedio 32,5 años con un rango de entre 16 y 58 años. La edad al diagnóstico de la enfermedad fue en promedio 34,9 años con un rango de entre 20 y 62 años. El tipo de esclerosis múltiple predominante fue EMRR 118/128 (92,2 %) y, con menor incidencia, EMPP 5/128 (3,9 %), EMSP 1/128 (0,8 %) y SDA 4/128 (3,1 %). El 87,5 % de los pacientes recibió tratamiento, mientras que el 12,5 % restante de los pacientes no estaba bajo ningún tratamiento al momento de la participación en el estudio. La descripción demográfica de la población enrolada se muestra en la **Tabla 17**.

Del subgrupo de pacientes (N = 97) y controles (N = 94) de Fleni se obtuvieron datos acerca de su hábito tabáquico y el IMC. El 19,5 % y 16,1 % de los pacientes con EM y participantes del grupo control fumaban regularmente, el 37,8 % y 30 % de los pacientes con EM y participantes del grupo control fumaron en el pasado y el 42,7 % y 53,9 % de los pacientes con EM y participantes del grupo control nunca tuvieron el hábito tabáquico. En lo que respecta al análisis estadístico, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p > 0,05$, prueba de Chi cuadrado). En cuanto al análisis del IMC, se determinó que los pacientes con EM presentaban en promedio un valor de IMC de 23,81 con una desviación estándar de 3,6, mientras que los individuos del grupo control presentaban un valor de IMC promedio de 26,4 con una desviación estándar de 5,2. Luego de realizar el correspondiente análisis estadístico se observó que había diferencias significativas entre los valores de IMC de pacientes y controles ($p < 0,0001$, prueba de Mann-Whitney).

Tabla 17: Descripción demográfica de la población en estudio.

	EM	GC
	(<i>n</i> =128)	(<i>n</i> =127)
Sexo, <i>N</i> (%)		
Masculino	48 (37,5)	68 (53,5)
Femenino	80 (62,5)	59 (46,5)
Edad		
Mediana	43,4 (11,5)	45,1 (11,9)
Rango	25-73	25-75
Edad al inicio de los síntomas, años		<i>NA</i>
Promedio (<i>DE</i>)	32,5 (9,2)	
Rango	16-58	
Edad al diagnóstico, años		<i>NA</i>
Promedio (<i>DE</i>)	34,9 (8,9)	
Rango	20-62	
Tipo de EM, <i>N</i> (%)		<i>NA</i>
SCA	4 (3,1)	
EMRR	118 (92,2)	
EMPP	5 (3,9)	
EMSP	1 (0,8)	
Tratamiento, <i>N</i> (%)		<i>NA</i>
Fingolimod	30 (23,4)	
Natalizumab	10 (7,8)	
Acetato de glatiramer	13 (10,2)	
Teriflunomida	1 (0,8)	
Interferón beta	54 (42,2)	
Dimetilfumarato	4 (3,1)	
Sin tratamiento	16 (12,5)	

Síndrome clínico aislado (SCA), Esclerosis múltiple progresiva primaria (EMPP), Esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR). Esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP). Desviación estándar (*DE*). No aplica (*NA*).

5.2. Presencia de anticuerpos para virus de la familia Herpesviridae

A fin de estudiar si existen diferencias significativas en la presencia y títulos de anticuerpos de tipo IgG anti-EBV entre el grupo de pacientes con EM y el grupo control, se evaluó el título de anticuerpos IgG anti-VCA y anti-EBNA1 (ambos antígenos del EBV), y a modo de control el título de anticuerpos anti-CMV y anti-VZV.

En cuanto a la seropositividad de los anticuerpos ensayados, se observó que 128/128 (100 %) de los pacientes con EM resultaron ser seropositivos para IgG-VCA. Por su parte, y en el mismo grupo de análisis, 125/128 (97,65 %) casos fueron positivos para IgG-EBNA1. Resulta importante mencionar que la totalidad de los pacientes con EM presentaron anticuerpos para al menos uno de los antígenos de EBV y no se observó seronegatividad para ambos antígenos en ningún caso, motivo por el cual el 100 % de los pacientes con EM fue considerado como seropositivo para EBV. En el grupo control se detectaron 123/127 (96,8 %) individuos seropositivos para IgG-VCA y 123/127 (96,8 %) individuos seropositivos para IgG-EBNA1. De forma similar, todos los individuos del grupo control presentaron seropositividad para al menos uno de los anticuerpos ensayados y, en consecuencia, este grupo de análisis también fue considerado seropositivo para EBV en el 100 % de los casos. Con respecto a la seropositividad para CMV, se observó que 99/128 (77,3 %) de los pacientes con EM resultaron ser seropositivos para IgG-CMV, mientras que 99/127 (77,9 %) de los individuos del grupo control fueron seropositivos para IgG-CMV. Por último, con respecto a la seropositividad para VZV, se determinó que 126/128 (98,5 %) de los pacientes con EM resultaron ser seropositivos para IgG-VZV, mientras que 127/127 (100 %) de los individuos del grupo control fueron seropositivos para IgG-VZV.

Para todos los anticuerpos ensayados, no se observaron diferencias significativas en la seropositividad entre los grupos de estudio ($p > 0,05$ en todos los casos, test exacto de Fisher). Estos resultados se resumen en la **Tabla 18**.

Tabla 18: Datos serológicos de la población en estudio.

Anticuerpos IgG	EM (n=128)	GC (n=127)	<i>p</i> valor
VCA			
Casos positivos	128/128	125/127	
Seropositividad (%)	100	98,4	> 0,05
Título medio (DE)	33,9 (8,5)	31,1 (9,2)	0,0064
Rango	12,4-51,7	6,24-53,1	
EBNA1			
Casos positivos	125/128	123/127	
Seropositividad (%)	97,65	96,8	> 0,05
Título medio (DE)	34,9 (9,2)	32,5 (9,9)	0,0403
Rango	5,98-54,05	0,9-58,02	
CMV			
Casos positivos	99/128	99/127	
Seropositividad (%)	77,3	77,9	> 0,05
Título medio (DE)	7,8 (6,3)	5,9 (5,8)	0,0107
Rango	0,03-27,46	0,06-23,27	
VZV			
Casos positivos	126/128	127/127	
Seropositividad (%)	98,5	100	> 0,05
Título medio (DE)	36,8 (21,6)	36,2 (20,5)	> 0,05
Rango	2,6-84,6	13,5-83,2	

Desviación estándar (DE).

Con el objetivo de analizar posibles variaciones en el título de anticuerpos de los virus estudiados en este trabajo, entre pacientes e individuos del grupo control, se realizó el análisis del título de anticuerpos IgG anti-VCA, anti-EBNA1, anti-CMV y anti-VZV. En lo que refiere a los anticuerpos anti-antígenos de EBV, se determinó para el grupo de pacientes con EM un título medio de $33,9 \pm 8,5$ para el título de anticuerpos anti-VCA y un título medio de $34,9 \pm 9,2$ para el título de anticuerpos anti-EBNA1. Por el contrario, en el caso del grupo control se determinó un título medio de $31,1 \pm 9,2$ para el título de anticuerpos anti-VCA y un título medio de $32,5 \pm 9,9$ para el título de anticuerpos anti-EBNA1. Mediante el análisis estadístico de los datos se determinó que existió una diferencia significativa en el título de anticuerpos IgG anti-VCA ($p = 0,0064$, prueba t de Student) y EBNA1 ($p = 0,0403$, prueba de Mann-Whitney) entre los grupos EM y GC (**Figura 1A y 1B**, respectivamente). Con respecto al título de anticuerpos IgG-CMV, se determinó para el grupo de pacientes con EM un título medio de $7,8 \pm 6,3$ IU/ml y en el grupo control un título medio de $5,9 \pm 5,8$ IU/ml. En este caso, se vio una diferencia significativa en el título de anticuerpos IgG anti-CMV ($p = 0,0107$, prueba de Mann-Whitney) entre pacientes y controles. Por último, al evaluar el título de anticuerpos IgG-VZV, se determinó para el grupo de pacientes con EM un título medio de $36,8 \pm 21,6$ y en el grupo control un título medio de $36,2 \pm 20,5$. No se vieron diferencias significativas en el caso de IgG-VZV ($p > 0,05$, prueba de Mann-Whitney) (**Figura 8**).

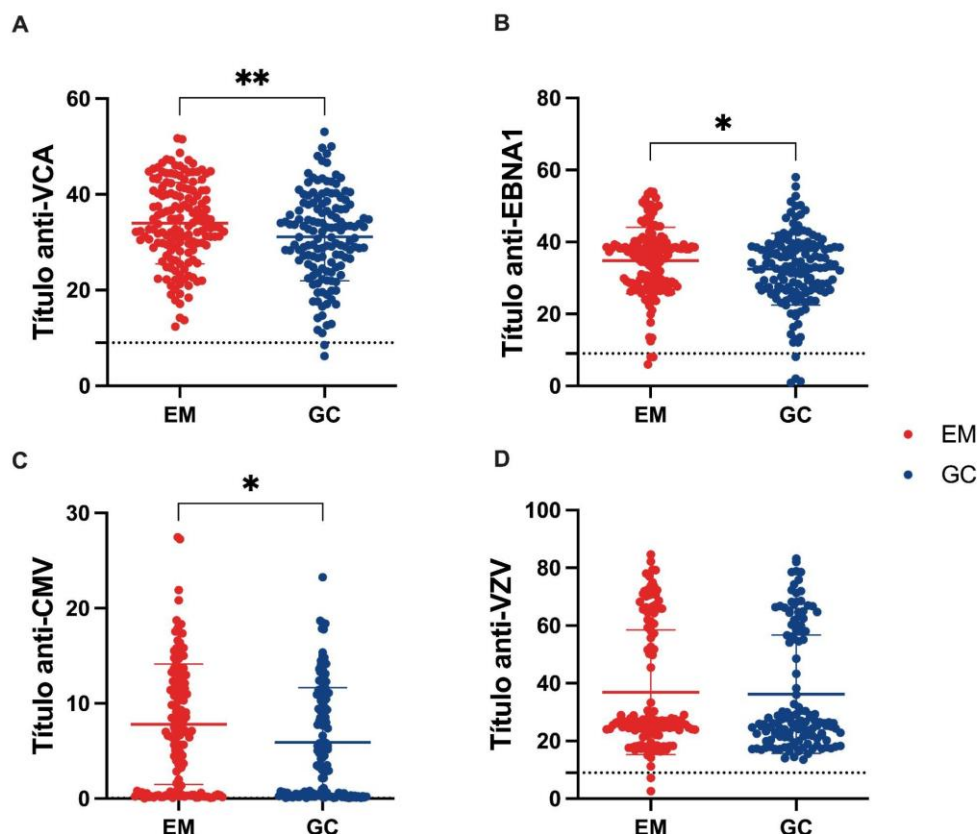


Figura 8: Gráfico de dispersión comparando título de anticuerpos entre los pacientes con EM y los controles. La altura de la barra representa la media del grupo y se grafica la barra de DE. La línea punteada en cada gráfico indica el punto de corte, por debajo del mismo los títulos son negativos, mientras que por encima del mismo son positivos. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-CMV. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-VZV. EM: Pacientes con esclerosis múltiple (Rojo). GC: Grupo control (Azul).

A fin de estudiar posibles diferencias en los títulos de anticuerpos para los virus estudiados, se evaluó el título de anticuerpos según el sexo cromosómico (Mujer vs Hombre) de los individuos (**Figura 9**). Con respecto al título de anticuerpos IgG anti-VCA, no se detectaron diferencias significativas dentro del grupo de pacientes con EM ni de individuos del grupo control según su sexo cromosómico ($p > 0,05$ en todos los casos, prueba estadística t de student) (**Figura 9 A**). A su vez, el título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 no difirió estadísticamente según su sexo cromosómico entre los individuos con EM y/o los individuos del grupo control ($p > 0,05$, prueba de Mann Whitney) (**Figura 9 B**). Por otro lado, en cuanto título de anticuerpos IgG anti-CMV, al igual que lo ocurrido con el título de anticuerpos anti-EBV, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos del sexo cromosómico mujer u hombre entre los pacientes con EM y los individuos del grupo control ($p > 0,05$, prueba de Mann Whitney) (**Figura 9 C**). Finalmente, con respecto al título de anticuerpos anti-VZV, no se detectaron diferencias significativas entre los pacientes con EM y los individuos del grupo control independientemente del sexo cromosómico ($p > 0,05$ en todos los casos, prueba estadística de Mann Whitney) (**Figura 9 D**).

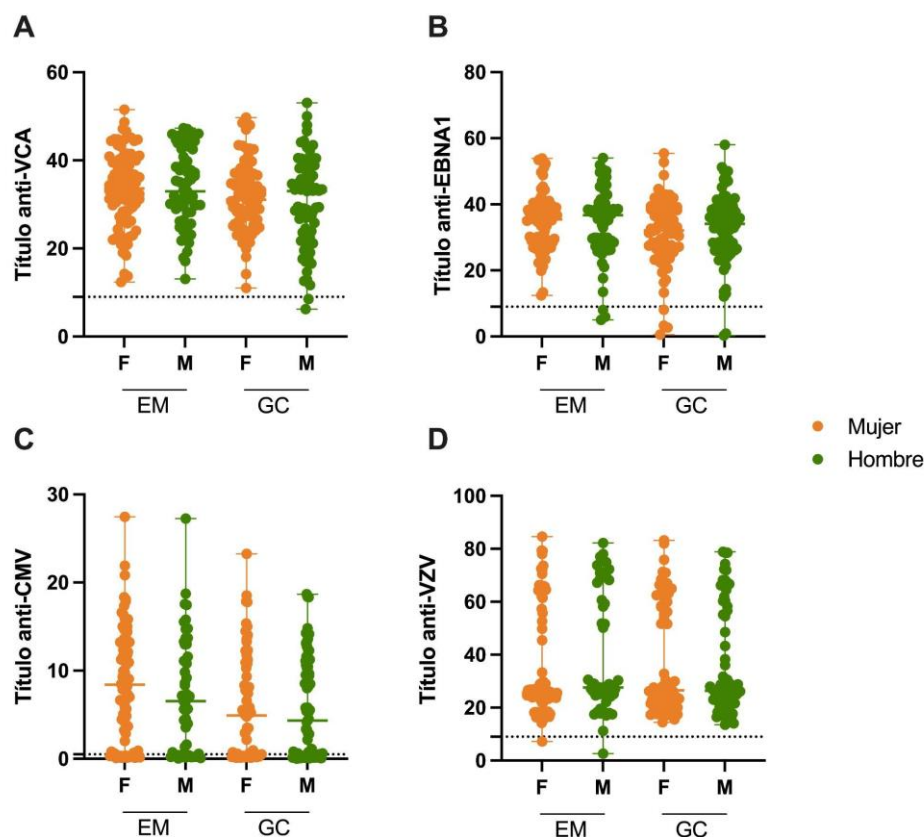


Figura 9: Gráfico de dispersión comparando título de anticuerpos en función del sexo cromosómico de los pacientes con EM y los controles. La altura de la barra representa la media del grupo y se grafica la barra de DE. La línea punteada en cada gráfico indica el punto de corte, por debajo del mismo los títulos son negativos, mientras que por encima del mismo son positivos. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA según sexo cromosómico. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 según sexo cromosómico. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-CMV según sexo cromosómico. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-VZV según sexo cromosómico. EM: Pacientes con esclerosis múltiple. GC: Grupo control. El color amarillo corresponde al sexo cromosómico mujer, mientras que verde corresponde al sexo cromosómico hombre. $p > 0,05$, prueba estadística t de student y prueba estadística de Mann Whitney.

Dado que existen distintas formas clínicas de EM: Síndrome clínico aislado (SDA), Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente (EMRR), Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva (EMPP) y Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva (EMSP), se evaluó en una primera instancia la posible variación en los títulos de los anticuerpos ensayados y la forma clínica de la enfermedad en el grupo de pacientes. En ese sentido, el título medio de los anticuerpos ensayados en cada grupo de manifestación clínica se observa en la **figura 10**. No se detectaron diferencias significativas para ninguno de los anticuerpos evaluados según la forma clínica de la EM ($p > 0,05$ en todos los casos, prueba de ANOVA).

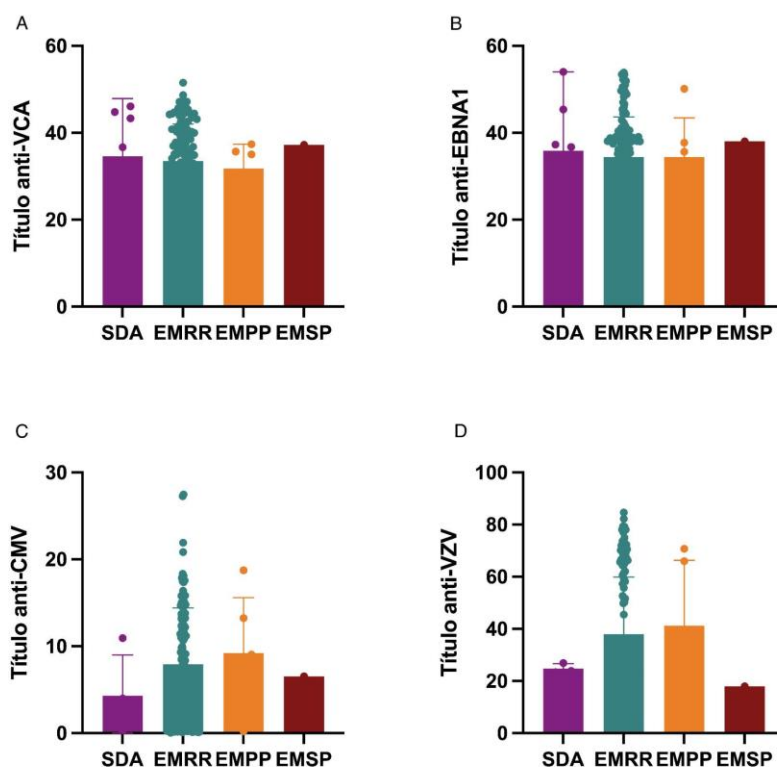


Figura 10: Gráfico de barras comparando forma clínica de EM vs título de anticuerpos. La altura de la barra representa la media del grupo y se grafica la barra de DE. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA según forma clínica manifestada. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 según forma clínica manifestada. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-CMV según forma clínica manifestada. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-VZV según forma clínica manifestada. Síndrome clínico aislado (SDA), Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente (EMRR), Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva (EMPP), Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva (EMSP). ($p > 0,05$ en todos los casos, prueba de ANOVA).

Por otro lado, considerando que los pacientes de la cohorte aquí analizada fueron sometidos a distintos tratamientos, según indicación del médico tratante. Más aún, teniendo en cuenta que en una marcada proporción de casos el tratamiento indicado consiste en inmunoterapia que modifica la actividad del sistema inmunitario a fin de disminuir la frecuencia o la severidad de los síntomas ocasionados, se evaluó la posible existencia de diferencias en el título de anticuerpos según tratamiento recibido. Como primer paso, se consideraron los tratamientos según la clasificación de primera o segunda línea. En el grupo de primera línea se incluyeron: Interferón, Acetato de glatiramer, Teriflunomida y Dimetilfumarato, mientras que los de segunda línea incluyeron Fingolimod y Natalizumab. Una vez definidos los grupos se evaluó la posible existencia de variación en los títulos de anticuerpos en forma dependiente del tratamiento indicado. El título medio de los anticuerpos ensayados en cada grupo de tratamiento indicado se observa en la **figura 11**. En cuanto al título de anticuerpos anti-VCA como el anti-CMV no se observaron diferencias significativas en relación con el tratamiento indicado ($p > 0,05$ en ambos los casos, prueba de ANOVA) (**Figura 11 A y C**). Por otro lado, teniendo en cuenta el título de anticuerpos anti-EBNA1, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con tratamiento de segunda línea y los pacientes sin tratamiento ($p = 0,0329$, prueba de ANOVA y

posterior análisis de comparaciones múltiples con Kruskal Wallis). En dichos grupos, se observó un título medio de $32,43 \pm 10,4$ en el caso del grupo de pacientes con tratamiento de segunda línea y un título medio de $39,03 \pm 8,2$ para los pacientes sin tratamiento (**Figura 11 B**). Finalmente, respecto al título de anticuerpos anti-VZV y al igual que para el caso anteriormente mencionado, se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con tratamiento de segunda línea y los pacientes sin tratamiento ($p = 0,0448$, prueba de ANOVA y posterior análisis de comparaciones múltiples con Kruskal Wallis). En los mencionados grupos, se estimó un título medio de $44,98 \pm 23,2$ para el grupo de pacientes con tratamiento de segunda línea y un título medio de $30,11 \pm 17,6$ para los pacientes sin tratamiento (**Figura 11 D**).

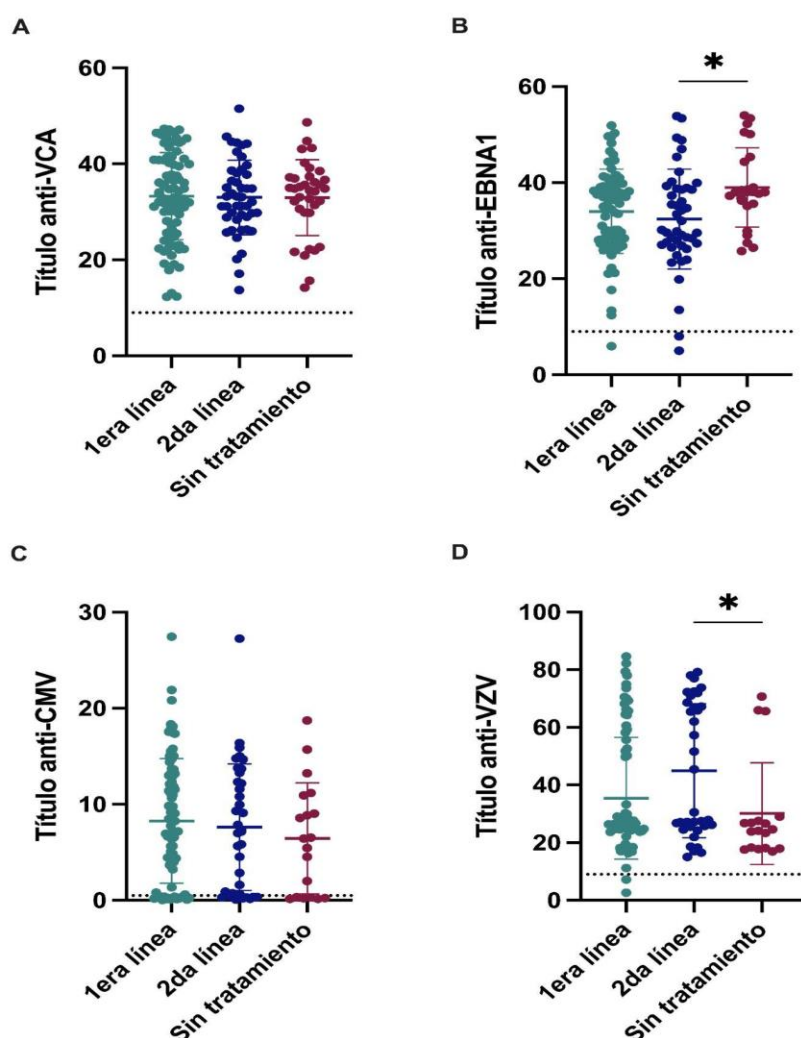


Figura 11: Gráfico de barras comparando títulos de anticuerpos en función del tipo de tratamiento recibido por los pacientes con EM. La altura de la barra representa la media del grupo y se grafica la barra de DE. La línea punteada en cada gráfico indica el punto de corte, por debajo del mismo los títulos son negativos, mientras que por encima del mismo son positivos. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA según tratamiento. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 según tratamiento. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-CMV según tratamiento. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-VZV según tratamiento. * $p < 0,05$, prueba estadística de Mann Whitney.

Finalmente, se estudió el efecto de la edad sobre el título de los anticuerpos evaluados. Para el título de anticuerpos IgG-VCA, en el grupo de pacientes con EM se estimó un título medio de $34,01 \pm 8,4$, mientras que en el caso del grupo control se determinó un título medio de $31,1 \pm 9,1$. Para el título de anticuerpos IgG-EBNA1, en el grupo de pacientes con EM se observó un título medio de $32,8 \pm 7,1$, mientras que en el caso del grupo control se determinó un título medio de $30,9 \pm 8,6$. Con respecto al título de anticuerpos IgG-CMV, se estimó un título medio de $8,9 \pm 7,8$ IU/ml, en el caso del grupo de pacientes y un título medio de $6,8 \pm 7,3$ IU/ml en el caso del grupo control. Por su parte, se estimó que el título medio de anticuerpos IgG-VZV en el grupo de pacientes y controles fue $36,7 \pm 21,6$ y $36,4 \pm 20,5$, respectivamente. Finalmente se realizó la correlación estadística de los parámetros. Tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control, la variable edad correlacionó de forma positiva con el título de anticuerpos anti-CMV ($p < 0,0001$, $r = 0,3393$, Correlación de Spearman) y ($p = 0,0004$, $r = 0,3071$, Correlación de Spearman), respectivamente, (**Figura 12**). Esta correlación indicaría que conforme aumenta la edad de los participantes, mayor es el título de anticuerpos anti-CMV. No se determinaron otras correlaciones significativas para el resto de los anticuerpos evaluados.

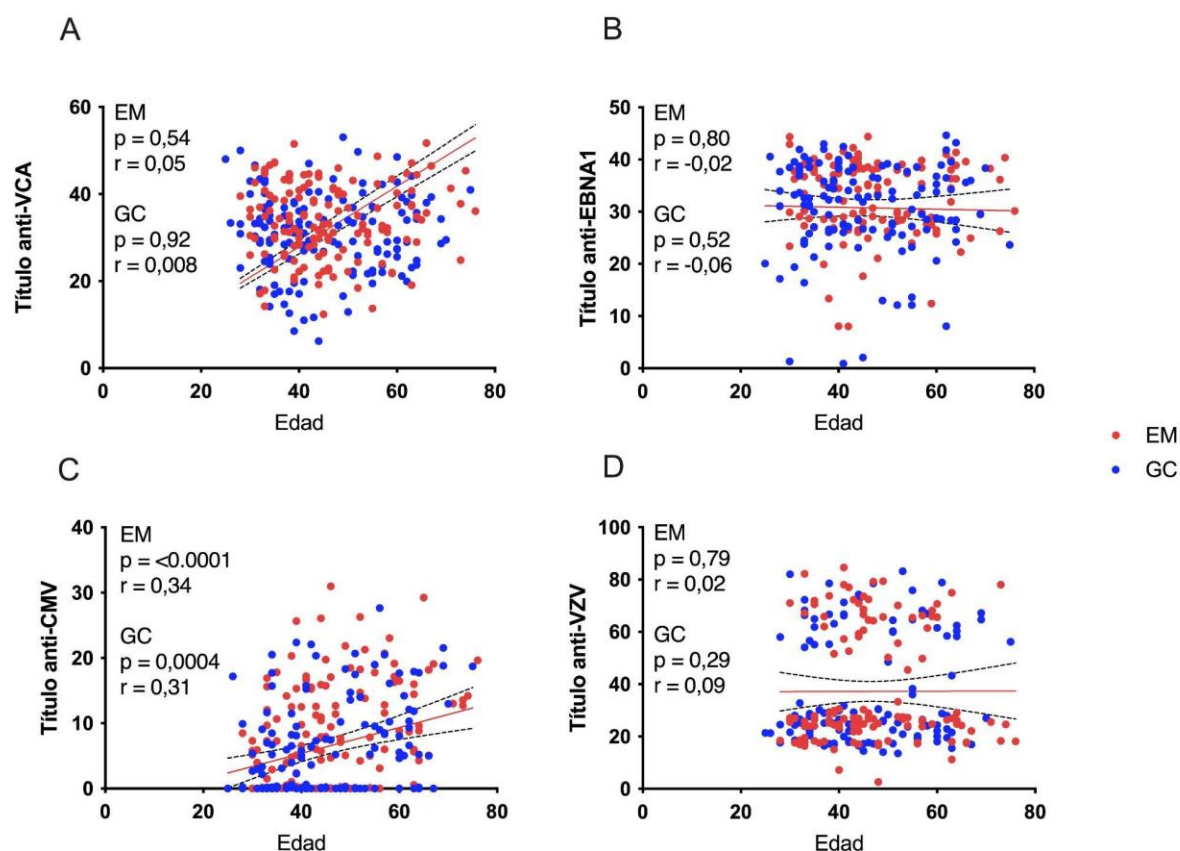


Figura 12: Gráfico de correlación de título de anticuerpos en función de la edad de los pacientes con EM y los controles. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA vs edad. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 vs edad. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-CMV vs edad. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-VZV vs edad. EM: Pacientes con esclerosis múltiple (Rojo). GC: Grupo control (Azul).

Considerando que existen otros factores ambientales que también están asociados con el riesgo de desarrollar EM, entre ellos el hábito tabáquico y el índice de masa corporal (IMC), y que se describió el sinergismo entre los factores mencionados, resultó de interés en este trabajo evaluar la posible interacción entre el hábito tabáquico y los títulos de anticuerpos anti-EBV y por otro lado, entre el IMC y los títulos de anticuerpos anti-EBV. A tal fin se obtuvieron los datos de la cohorte de pacientes con EM (n = 97) y controles (n = 94) de Fleni.

En primera instancia, se estratificó la población según el hábito tabáquico, en fumadores (considerando aquellos que fuman actualmente y aquellos que habían dejado el hábito) y no fumadores (considerando aquellos que a lo largo de su vida nunca habían tenido el hábito). El porcentaje de fumadores y no fumadores fue comparable entre la población de pacientes con EM y controles ($p > 0,05$, prueba estadística de Fisher). El 57,34 % de los pacientes y el 46,15 % de los controles presentaban el hábito tabáquico, mientras que el 42,66 % y 53,85 % de los pacientes y controles, respectivamente, nunca habían fumado (**Figura 13 A y B**). Por otro lado, al evaluar el título de anticuerpos anti-EBV, según el estatus fumador no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0,05$, prueba estadística t de student en el caso de anticuerpos anti-VCA y Mann Whitney en el caso de anti-EBNA1). Para el título de anticuerpos IgG-VCA, en el grupo de pacientes fumadores se estimó un título medio de $37,68 \pm 14,77$, mientras que en el caso de pacientes no fumadores se determinó un título medio de $39,67 \pm 16,17$. Mientras que en el grupo control, se observó un título medio de $34,69 \pm 17,23$ para el grupo de fumadores y $34,91 \pm 14,91$ para el grupo de no fumadores. Al comparar el título de anticuerpos anti-VCA dentro del grupo de pacientes y controles fumadores, se determinó una tendencia que no fue significativa ($p = 0,0525$, prueba estadística t de student) (**Figura 13 C**). En este caso, podría suponerse que el número muestral de la población ensayada no fue suficiente para obtener diferencias significativas entre los grupos evaluados.

A su vez, se evaluó el título de anticuerpos IgG-EBNA1 en el grupo de pacientes fumadores, donde se estimó un título medio de $34,80 \pm 9,69$, mientras que en el caso de pacientes no fumadores se determinó un título de anticuerpos medio de $35,95 \pm 10,53$. En cuanto al grupo control, se observó un título medio de $30,62 \pm 10,58$ para el grupo de fumadores y $33,02 \pm 11,93$ para el grupo de no fumadores. Finalmente, al comparar el título de anticuerpos anti-EBNA1 dentro del grupo de pacientes y controles fumadores, no se determinó una diferencia significativa ($p > 0,05$, prueba estadística t de student) (**Figura 13 D**).

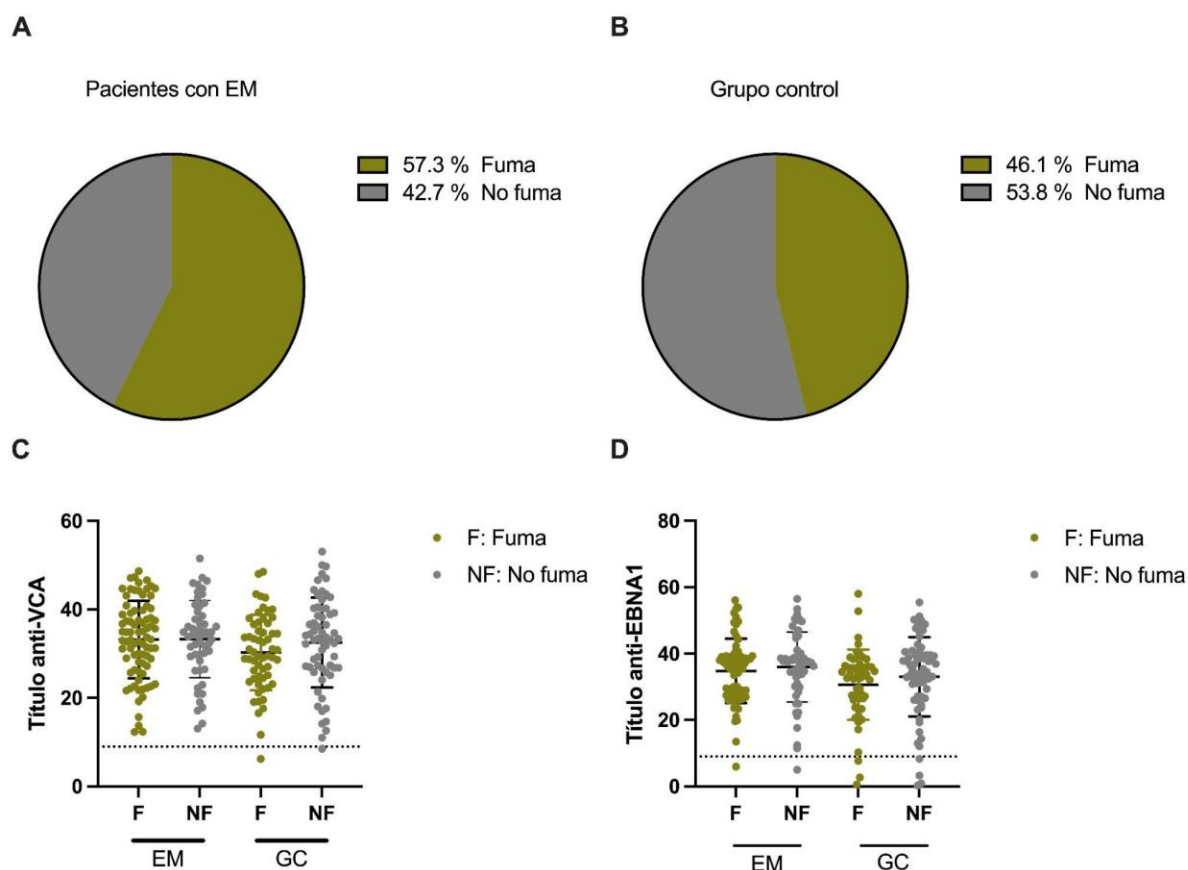


Figura 13: Gráficos de torta y dispersión considerando el estatus del hábito tabáquico de los pacientes con EM y el grupo control de Fleni. A) Porcentaje de pacientes con EM según estatus de tabaquismo. B) Porcentaje de individuos del grupo control según estatus de tabaquismo. C) Título de anticuerpos IgG anti-VCA según estatus de tabaquismo. D) Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 según estatus de tabaquismo. En los gráficos C y D, la altura de la barra representa la media del grupo y se grafica la barra de DE. La línea punteada en cada gráfico indica el punto de corte, por debajo del mismo los títulos son negativos, mientras que por encima del mismo son positivos. EM: Pacientes con esclerosis múltiple. GC: Grupo control. En todos los gráficos, verde corresponde a los individuos fumadores y gris corresponde a los individuos no fumadores.

A su vez, se realizó el análisis entre el IMC y el título de anticuerpos anti-EBV. La cohorte en estudio presentó un porcentaje de delgadez del 5,04 % en el caso de los pacientes con EM y 3,88 % en el grupo control, el IMC normal se mantuvo en el 64,03 % y 37,98 % de los pacientes y controles respectivamente. Mientras que el sobrepeso fue presentado en el 30,94 % de los pacientes y 55,81 % de los controles. Finalmente, en el grupo de pacientes no se detectó ningún individuo con obesidad y en el grupo control el 2,33 % fue considerado obeso (**Figura 14 A y B**). En primera instancia se comparó el IMC entre pacientes y controles, donde se determinó que el IMC medio de los pacientes fue de $23,81 \pm 3,59$ mientras que el IMC medio de los controles fue de $26,39 \pm 5,19$. La diferencia entre las cohortes fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$, prueba de Mann Whitney) ver **figura 14 C**. Por otro lado, y teniendo en cuenta que el IMC de los hombres es usualmente mayor que el de mujeres, y considerando

que la diferencia vista con anterioridad podría verse influenciada por el sexo cromosómico de los individuos, se decidió agrupar a los pacientes y controles según su sexo (**Figura 14 D**). En este caso, se observó que la diferencia en el IMC entre pacientes y controles fue estadísticamente significativa en los individuos de sexo cromosómico hombre ($p < 0,0001$, prueba de Mann Whitney), mientras que en el sexo cromosómico mujer no se observaron diferencias entre pacientes y controles ($p > 0,05$, prueba de Mann Whitney). El IMC medio en los pacientes y controles de sexo cromosómico hombre resultó $25,04 \pm 3,74$ y $28,06 \pm 4,71$, respectivamente. Mientras que en los pacientes y controles de sexo cromosómico mujer resultó $22,93 \pm 3,22$ y $23,80 \pm 4,87$, respectivamente.

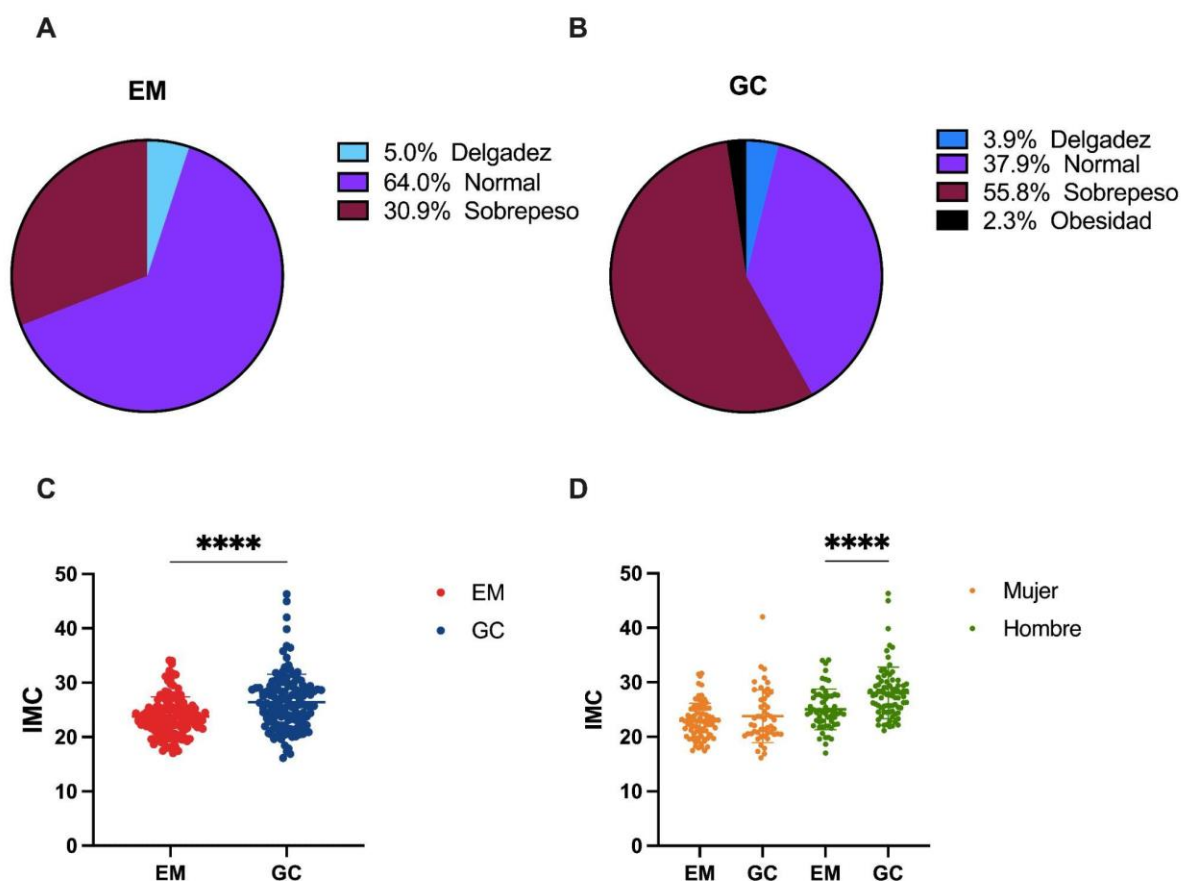


Figura 14: Gráfico de torta y de dispersión considerando el IMC de los pacientes con EM y los controles de Fleni. A) Porcentaje de pacientes con EM según IMC. B) Porcentaje de individuos del grupo control según IMC. C) Comparación de IMC entre pacientes con EM y el grupo control. D) Comparación de IMC entre pacientes con EM y el grupo control según el género. En el gráfico C y D, la línea horizontal representa la media del grupo y se grafica la barra de DE. EM: Pacientes con esclerosis múltiple representado por el color rojo. GC: Grupo control representado por el color azul. Particularmente en el gráfico D, Amarillo representa al sexo cromosómico mujer. Verde representa al sexo cromosómico hombre.

Una vez determinada dicha diferencia, se llevó a cabo el análisis del título de anticuerpos, en esta instancia se decidió agrupar a los individuos con sobrepeso y obesidad dado que ambas categorías están asociadas al riesgo de la enfermedad. En cuanto al título de anticuerpos anti-VCA, se estimó un título

medio de $33,66 \pm 8,43$ para el grupo con sobrepeso u obesidad dentro de los pacientes con EM y de $30,26 \pm 10,21$ para el grupo con sobrepeso u obesidad entre los controles. Si bien no se determinó una diferencia significativa entre ambos grupos, sí se observó una tendencia ($p = 0,0767$, prueba estadística t de student) ver **figura 15 A**. Mientras que al evaluar el título de anticuerpos anti-EBNA1 en ambas cohortes, se estimó un título medio de $40,65 \pm 14,58$ para el grupo con sobrepeso u obesidad entre los pacientes con EM y $37,03 \pm 16,40$ para el grupo con sobrepeso u obesidad en el grupo de controles. En este caso se observó una diferencia significativa entre los grupos, donde se determinó un mayor título de anticuerpos anti-EBNA1 en los pacientes con sobrepeso u obesidad ($p = 0,0258$, prueba estadística de Mann Whitney) (**Figura 15 B**).

Teniendo en cuenta que los hombres tienen mayor IMC comparado con las mujeres, se decidió dividir la cohorte de individuos con sobrepeso u obesidad, según su sexo cromosómico (mujer y hombre). En el caso de los títulos IgG anti-VCA, se determinó un título medio de $34,96 \pm 7,08$ en el caso de los pacientes y $29,21 \pm 10,53$ en el caso de los controles. Mientras que para los títulos IgG anti-EBNA1, se estimó un título medio de $35,98 \pm 8,61$ en el caso de los pacientes con EM y $31,23 \pm 10,38$ teniendo en cuenta al grupo control. Luego del análisis del título de anticuerpos, se confirmó que los hombres con EM y sobrepeso tienen mayores títulos de anticuerpos anti-VCA ($p = 0,0392$, prueba t de student) (**Figura 15 C**) comparado con sus contrapartes (controles con sobrepeso). Mientras que no se observaron diferencias significativas en los títulos anti-EBNA1 ($p > 0,05$, prueba de Mann Whitney) (**Figura 15 D**). Finalmente, con la intención de determinar una posible correlación entre el IMC y el título de anticuerpos anti-EBV en los pacientes, se determinaron las correlaciones entre las variables. En este análisis, no se determinaron correlaciones significativas entre el título de anticuerpos anti-EBV y el IMC (**Figura 15 E y F**).

Por su parte, se decidió evaluar los títulos de anticuerpos entre los pacientes con EM y el grupo control, según sexo en los individuos con peso normal y delgadez. En ningún caso, se observaron diferencias significativas entre las cohortes evaluadas ver **figura 16 (A-F)**.

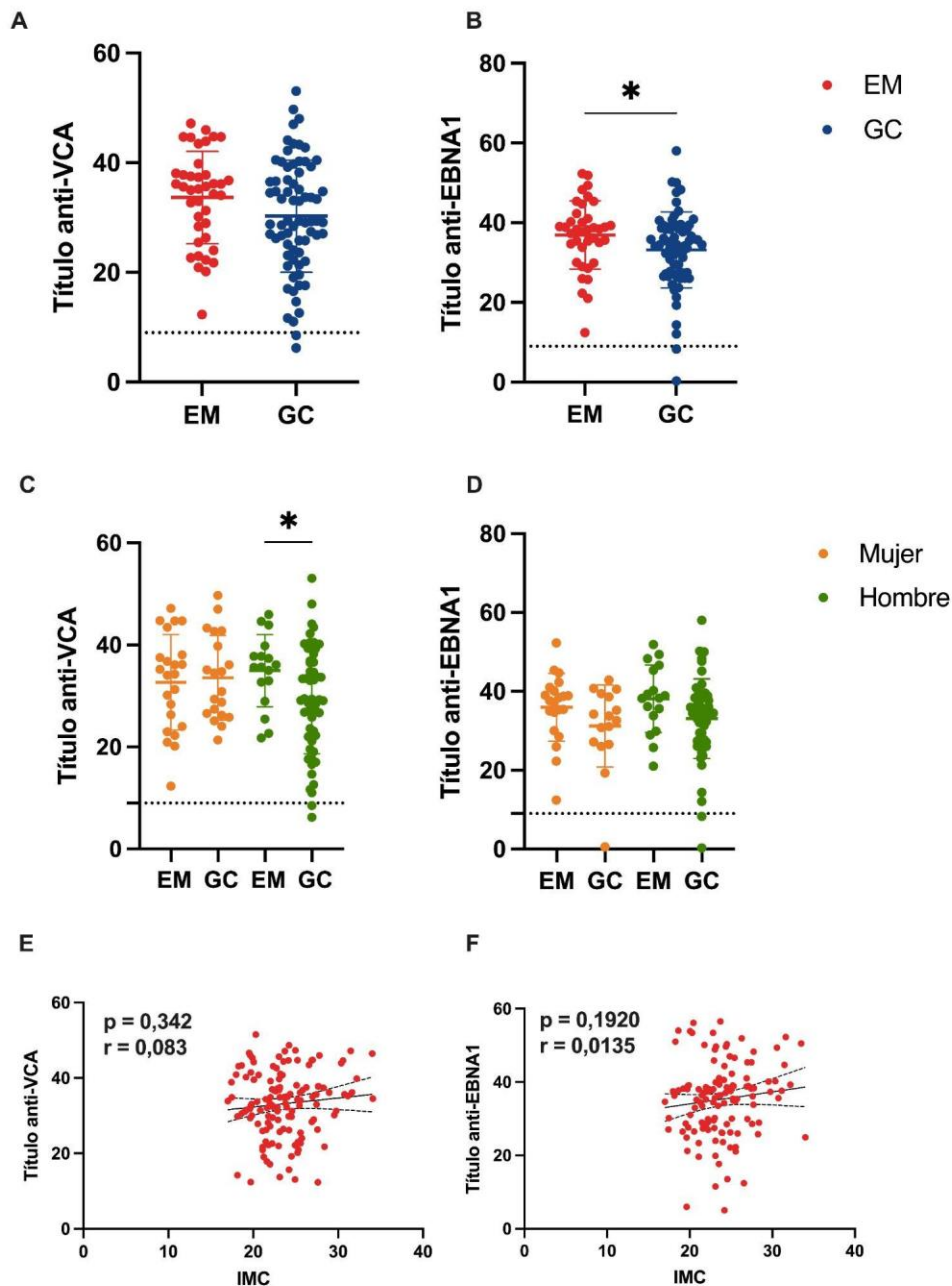


Figura 15: Gráfico de dispersión considerando los pacientes con EM y los controles de Fleni con IMC sobrepeso/obesidad. A) Título de anticuerpos IgG anti-VCA según IMC de los individuos con sobrepeso y obesidad. B) Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 según IMC de los individuos con sobrepeso y obesidad. C) Título de anticuerpos IgG anti-VCA separado por sexo cromosómico (mujer y hombre) según IMC de los individuos con sobrepeso y obesidad. D) Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 separado por sexo cromosómico (mujer y hombre) según IMC de los individuos con sobrepeso y obesidad. E) Título de anticuerpos IgG anti-VCA vs IMC. F) Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 vs IMC. La altura de la barra representa la media del grupo y se grafica la barra de DE. La línea punteada en cada gráfico indica el punto de corte, por debajo del mismo los títulos son negativos, mientras que por encima del mismo son positivos. EM: Pacientes con esclerosis múltiple. GC: Grupo control. En los gráficos C y D, amarillo representa al sexo cromosómico mujer y verde representa al sexo cromosómico hombre.

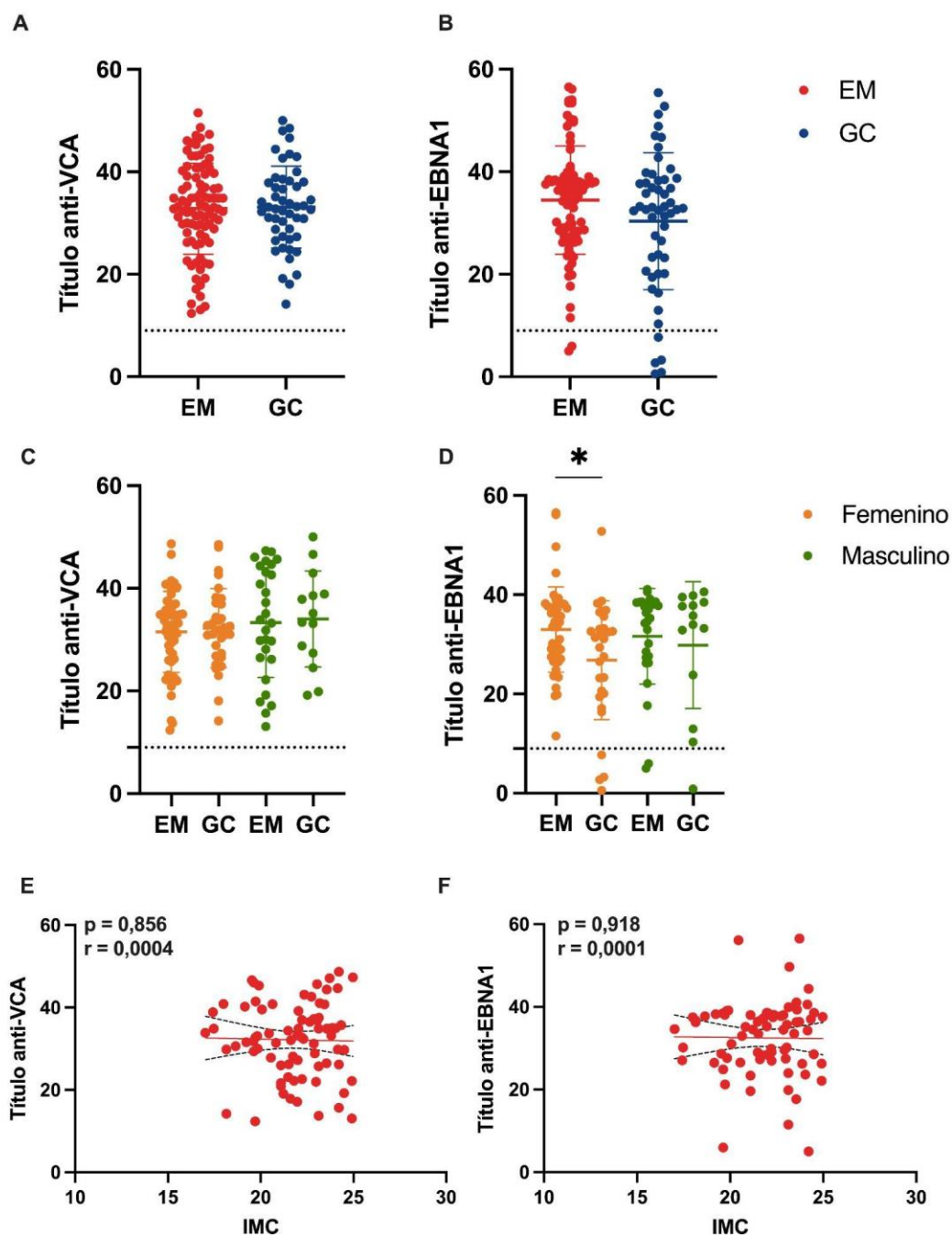


Figura 16: Gráfico de dispersión considerando los pacientes con EM y los controles de Fleni con IMC normal/delgadez. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA según IMC de los individuos con delgadez o peso normal. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 según IMC de los individuos con delgadez o peso normal. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA separado por sexo cromosómico (mujer y hombre) según IMC de los individuos con delgadez o peso normal. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 separado por sexo cromosómico (mujer y hombre) según IMC de los individuos con delgadez o peso normal. **E)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA vs IMC. **F)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 vs IMC. La altura de la barra representa la media del grupo y se grafica la barra de DE. La línea punteada en cada gráfico indica el punto de corte, por debajo del mismo los títulos son negativos, mientras que por encima del mismo son positivos. EM: Pacientes con esclerosis múltiple. GC: Grupo control. En los gráficos C y D, amarillo representa al sexo cromosómico mujer y verde representa al sexo cromosómico hombre.

Teniendo en cuenta que la EM es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida gradual del 0,5 - 1,35 % del volumen del cerebro (atrofia cerebral) por año (Andravizou et al., 2019; Giovannoni et al., 2016), y a su vez, considerando que el título de anticuerpo anti-EBV fue asociado con el daño del cerebro y la neurodegeneración de los pacientes con EM (Zivadinov et al., 2009, 2016a), fue de interés cuantificar las medidas de volumen total de cerebro, fracción de parénquima, volumen de lesiones y volumen de tálamo (derecho e izquierdo) y relacionarlo con el título de anticuerpos de los virus estudiados en este trabajo. Por otro lado, considerando que el volumen del cerebro disminuye con la edad, y que es diferente entre individuos de género femenino y masculino y es modificable según el tipo de tratamiento recibido, se ajustaron todas las correlaciones por edad, género y tratamiento de los pacientes. El análisis solo se realizó en el subconjunto de pacientes que presentaban la forma clínica RR, debido a que el SDA y las formas progresivas de la enfermedad (PP y SP) presentan cambios en el volumen de cerebro distintos de los pacientes RR. Para el título de anticuerpos IgG-VCA, en el grupo de pacientes con EM se estimó un título medio de $33,7 \pm 9,1$. Para el título de anticuerpos IgG-EBNA1 se observó un título medio de $44,2 \pm 208$. Con respecto al título de anticuerpos IgG-CMV, se estimó un título medio de $4,6 \pm 4,7$ IU/ml. Por último, se observó que el título medio de anticuerpos IgG-VZV en el grupo de pacientes era $27,5 \pm 15,6$. Finalmente se realizó la correlación estadística de los parámetros, luego del ajuste por edad, género y tipo de tratamiento. Luego de realizar los ajustes propiamente dichos, se determinó que la fracción de parénquima cerebral correlacionó negativamente con el título de anticuerpos anti-VCA ($p = 0,002$, $r = -0,877$, correlación de Pearson), lo que indica que mientras mayor es el título de anticuerpos anti-VCA, menor es la fracción del parénquima cerebral (**Figura 17 A**). Por su parte, se determinó que el volumen de cerebro, volumen del tálamo y la carga lesional, no correlacionaron con ninguno de los títulos de anticuerpos evaluados ($p > 0,05$ en todos los casos) (**Figura 18,19 y 20**).

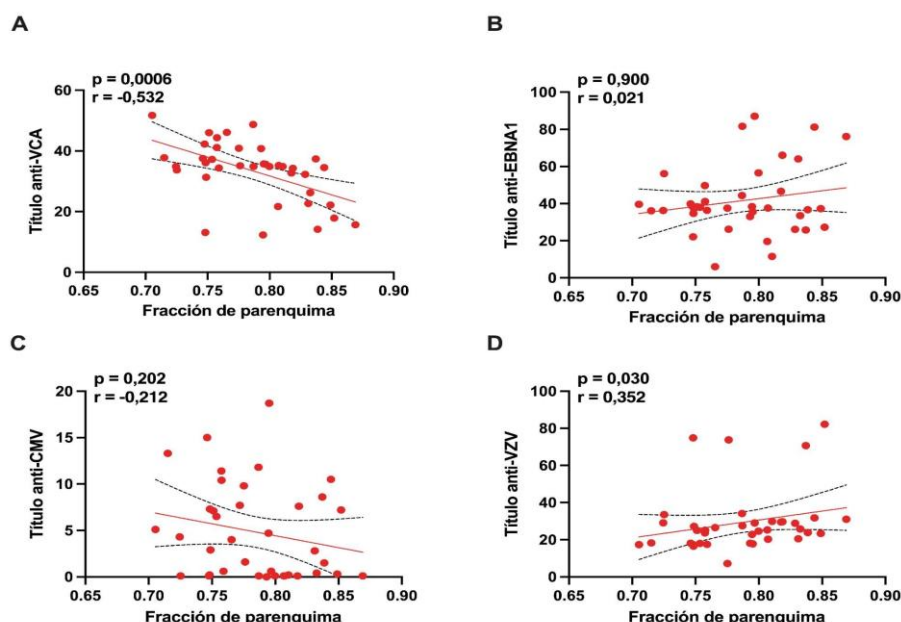


Figura 17: Gráfico de correlación de título de anticuerpos en función de la fracción de parénquima de pacientes con EM. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA vs fracción de parénquima. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 vs fracción de parénquima. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-CMV vs fracción de parénquima. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-VZV vs fracción de parénquima. Los valores de p y r mostrados en la figura corresponden a los valores previos a ser ajustados por edad, tratamiento y género de los individuos.

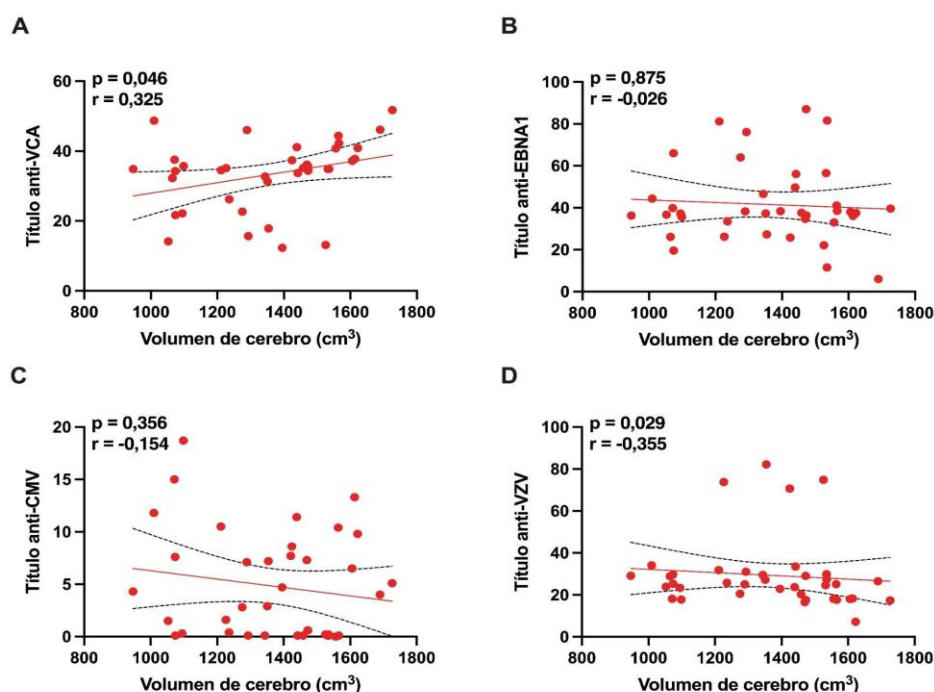


Figura 18: Gráfico de correlación de título de anticuerpos en función del volumen total de cerebro de pacientes con EM. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA vs volumen total de cerebro. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 vs volumen total de cerebro. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-CMV vs volumen total de cerebro. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-VZV vs volumen total de cerebro. Los valores de p y r mostrados en la figura corresponden a los valores previos a ser ajustados por edad, tratamiento y género de los individuos.

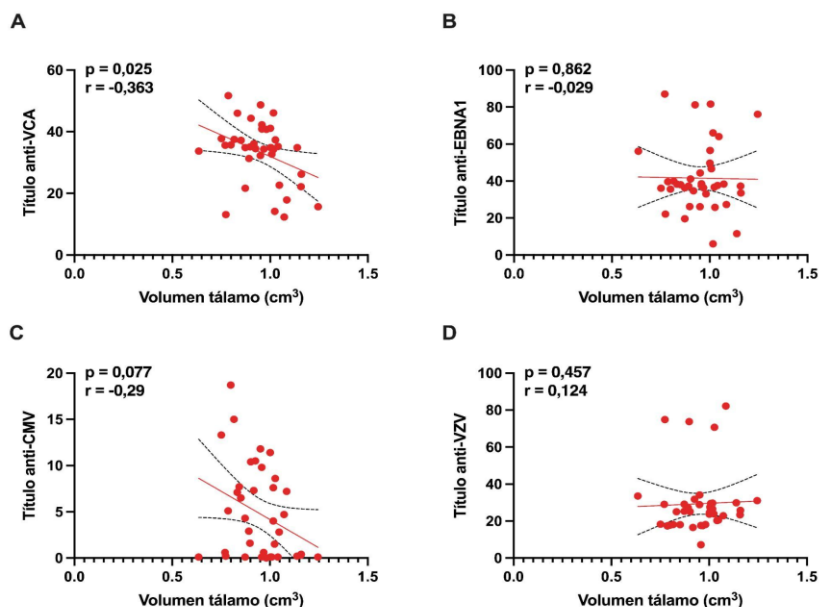


Figura 19: Gráfico de correlación de título de anticuerpos en función del volumen de tálamo de pacientes con EM. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA vs volumen de tálamo. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 vs volumen de tálamo. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-CMV vs volumen de tálamo. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-VZV vs volumen de tálamo. Los valores de p y r mostrados en la figura corresponden a los valores previos a ser ajustados por edad, tratamiento y género de los individuos.

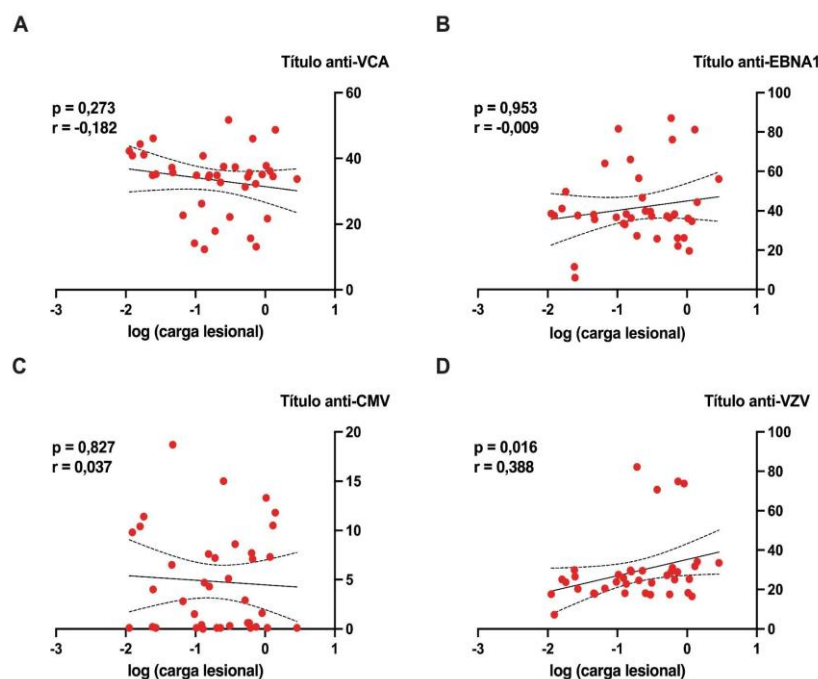


Figura 20: Gráfico de correlación de título de anticuerpos en función del logaritmo de la carga lesional de pacientes con EM. **A)** Título de anticuerpos IgG anti-VCA vs log de la carga lesional. **B)** Título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 vs log de la carga lesional. **C)** Título de anticuerpos IgG anti-CMV vs log de la carga lesional. **D)** Título de anticuerpos IgG anti-VZV vs log de la carga lesional. Los valores de p y r mostrados en la figura corresponden a los valores previos a ser ajustados por edad, tratamiento y género de los individuos.

5.3. Evaluación de carga viral de pacientes con EM y GC

A continuación, y a fin de determinar si el mayor título de anticuerpos anti-EBV en los pacientes con EM se correlacionan con un aumento en la carga viral, la última fue determinada por *qPCR* en CMSP de los pacientes con EM y el grupo control.

5.3.1. Curva estándar

Como se explicó más detalladamente en el inciso 8.2, antes de comenzar a trabajar con las muestras de los pacientes y controles, se elaboró la correspondiente curva estándar utilizando diluciones seriadas (1/10) de un plásmido que contiene un fragmento del gen *BKRF1*, que codifica para el antígeno EBNA1, insertado en su región *polylinker*.

Inicialmente, se graficó la curva de amplificación, a partir de la cual se seleccionó el umbral de detección (82.057) y línea de base (15), parámetros que se mantuvieron constantes en todas las corridas posteriores (**Figura 21**).

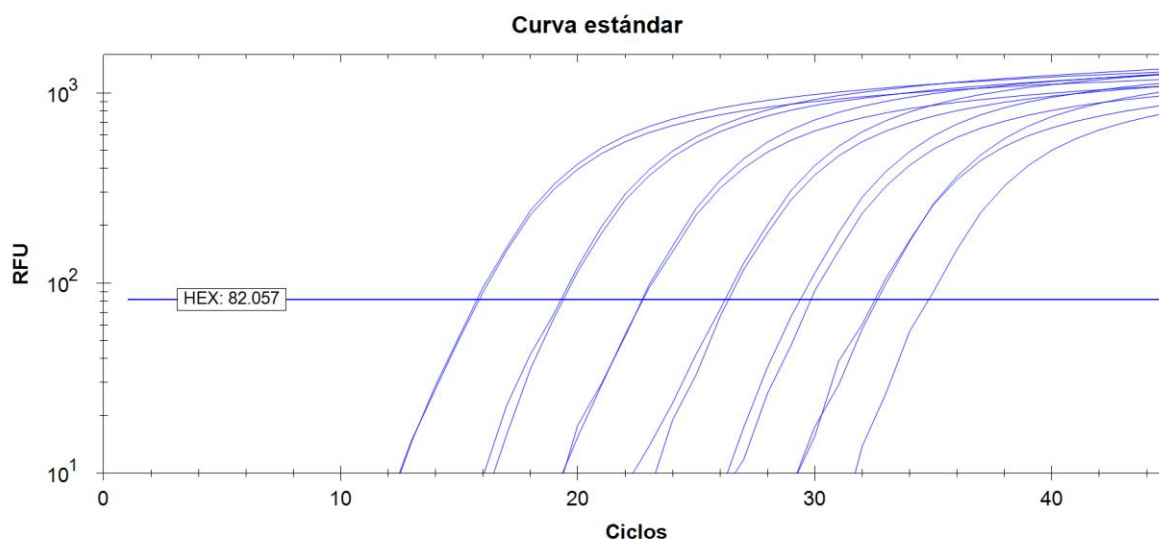


Figura 21: Curvas de amplificación. Se grafica el RFU (Sigla en idioma inglés: *Relative Fluorescence Units*) en función del ciclo de amplificación de las diluciones seriadas al décimo. La línea horizontal representa el umbral seleccionado para la curva.

Por otro lado, los valores de Ct obtenidos para cada dilución de las curvas de calibración se graficaron en función del logaritmo de la cantidad (**Figura 22**). A partir de este gráfico, se determinó un valor de regresión lineal $R^2 = 0,996$, una eficiencia de amplificación de la curva estándar de 101,7 % y una diferencia de 3,3 Ct entre cada dilución 1/10; todos parámetros dentro de los rangos esperados y que demuestran que, luego de cada ciclo de amplificación, el templado se duplicó durante la etapa exponencial del ciclo.

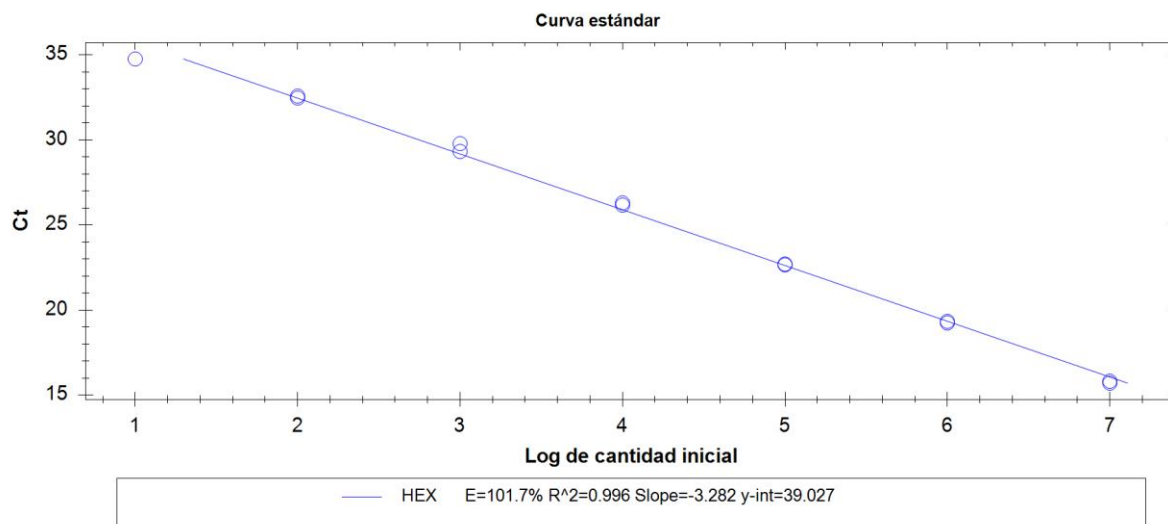


Figura 22: Curva estándar para el plásmido pGEM-T Easy. Se graficó el Ct obtenido en cada dilución seriada en función del logaritmo de la cantidad del número de copias de EBNA1 en cada dilución. Se informan los valores de la eficiencia (E), coeficiente de correlación (R^2), pendiente (*slope*) e intersección con el eje y (y-int).

Una vez obtenida la curva estándar fue posible evaluar la carga viral en un conjunto de 44 pacientes y 29 controles. Dentro del grupo de pacientes analizados, la carga viral resultó detectable en 31/44 (70,5 %) y dentro del grupo control la carga viral resultó detectable en 21/29 (72,4 %). La media de copias de EBV detectada fue de $236 \pm 543,5$ copias de genoma viral por cada μg de ADN total (copias EBV/ μg de ADN) en el caso de los pacientes y $95,6 \pm 134,5$ copias/ μg de ADN en el caso del grupo control, con un rango que varió desde 1 a 2237 copias/ μg de ADN y 4,4 a 502 copias/ μg de ADN, en el grupo de pacientes y el grupo de control, respectivamente. En consecuencia, el análisis estadístico demostró que no existió diferencia significativa entre la carga viral detectada en pacientes y controles ($p > 0,05$, prueba de Mann Whitney) (**Figura 23**).

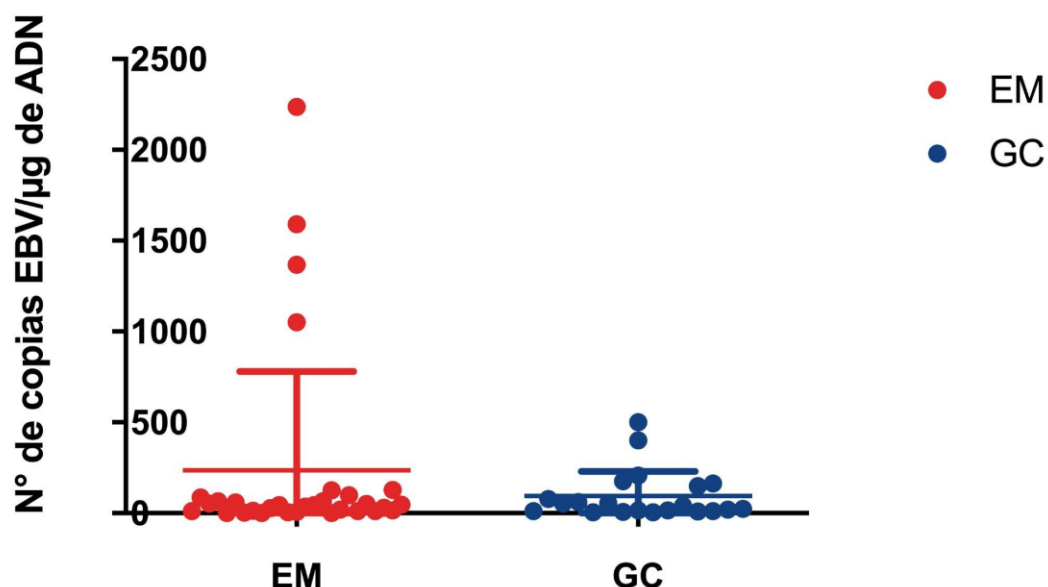


Figura 23: Gráfico de dispersión de la carga viral evaluada en pacientes con EM y grupo control. La altura de la barra representa la media del grupo y se grafica la barra de DE. Se calculó el número de copias de EBV por μg de ADN. EM: Pacientes con esclerosis múltiple (Rojo). GC: Grupo control (Azul).

Con el fin de determinar una posible asociación entre el título de anticuerpos anti-EBV y la carga viral, se evaluó la correlación entre dichas variables. No se detectó una correlación significativa entre las variables en el caso de los pacientes con EM ni tampoco en el caso de los controles ($p > 0,05$, correlación de Spearman) (*Figura 24*).

Por otro lado, y en forma complementaria, se evaluó el efecto de la carga viral de EBV en función del género de los pacientes, el tipo de tratamiento recibido y la manifestación clínica. También se agrupó el título de anticuerpos anti-VCA y anti-EBNA1 según carga viral detectable o carga viral indetectable. En ninguno de los casos anteriormente mencionados, se detectó una diferencia significativa ($p > 0,05$ en todos los casos, prueba t de student para evaluar carga viral en función del género y según carga viral detectable o indetectable, prueba de ANOVA para evaluar carga viral en función del tratamiento recibido y la manifestación clínica; o se muestran los gráficos.

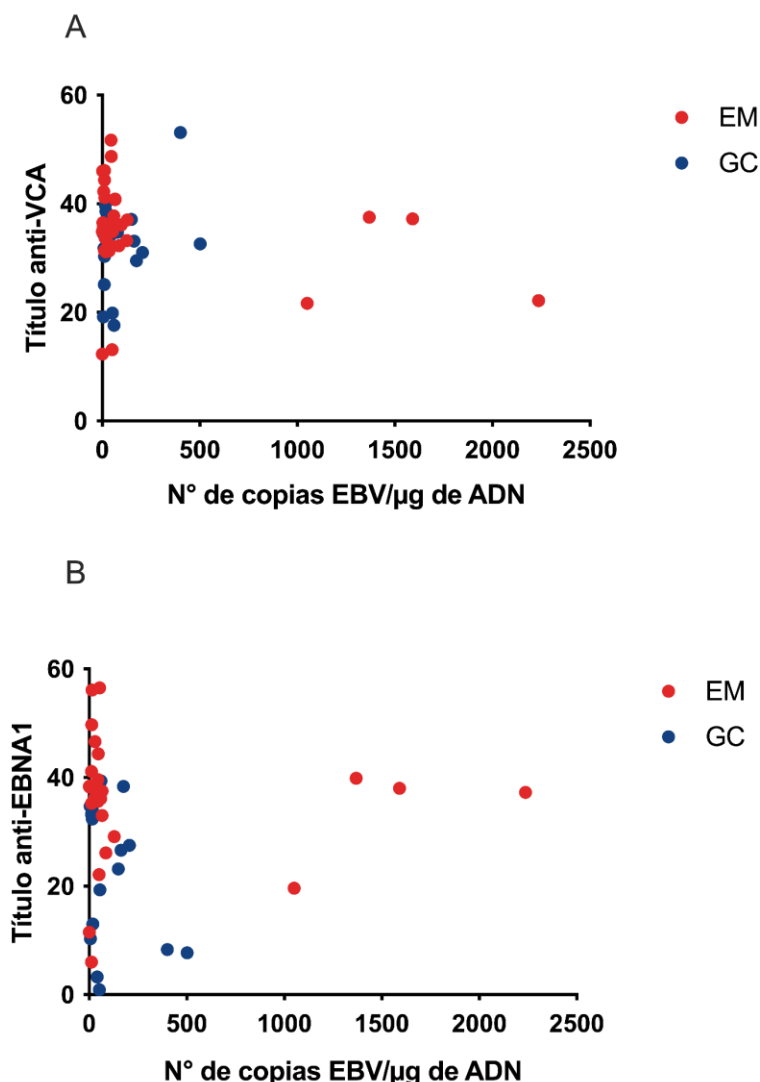


Figura 24: Gráfico de correlación del título de anticuerpos en función de la carga viral evaluada en pacientes con EM y grupo control. A) Título anti-VCA vs el número de copias de EBV por µg de ADN para pacientes con EM y grupo control (GC). B) Título anti-EBNA1 vs el número de copias de EBV por µg de ADN para pacientes con EM y grupo control (GC).

5.4. Caracterización de variantes de EBV

Con el objetivo de evaluar la posible existencia de variantes en determinados genes del EBV que pudieran estar asociados al riesgo de la enfermedad en estudio, o que resultaran protectores frente a la misma, se caracterizaron las variantes de dos genes del EBV en particular: *BCRF1* y *BYRF1*. Por un lado, se seleccionó el gen viral *BCRF1*, que codifica para la interleuquina 10 viral (vIL10), homólogo a la IL-10 humana, ya que la vIL10 es un gen de expresión inmediatamente temprano durante la infección viral y podría participar de la inmunomodulación durante la infección primaria por EBV y así contribuir al establecimiento y progresión de la EM. En paralelo, se seleccionó el gen *BYRF1*, que codifica para el

antígeno nuclear EBNA2, dado que previamente se describieron variantes de este gen asociadas tanto a pacientes con EM como otras asociadas a individuos sanos en determinadas regiones del mundo (Mechelli et al., 2015a; Varvatsi et al., 2021b).

Cabe mencionar que, en una situación de inmunocompetencia, un individuo adulto como los pacientes y controles que participaron en este estudio, no presentan una infección activa por EBV, sólo se espera encontrar 1 de cada 10^4 - 10^5 linfocitos B de memoria infectados por EBV en un estado de latencia 0. Este motivo nos impulsó a implementar estrategias con mayor sensibilidad para detectar el virus. La estrategia seleccionada en este trabajo de tesis fue la PCR anidada seguida de la secuenciación directa (en ambos sentidos), la cual permite aumentar la sensibilidad de detección del virus. Las variantes virales de los genes que codifican para las proteínas vIL10 y EBNA2 se caracterizaron mediante el análisis de los cromatogramas obtenidos por la secuenciación directa de los productos de amplificación.

5.4.1. Caracterización de variantes del gen *BCRF1* que codifica para la proteína viral vIL10

Del total de participantes enrolados, se observó amplificación del gen *BCRF1* mediante la presencia de una banda de 996 pb en gel de agarosa en 32/70 (45,7 %) de los pacientes y 22/59 (37,3 %) de los controles. A pesar de la elección de la técnica de PCR anidada y que la seropositividad del EBV fue del 100 % tanto para pacientes como controles, luego de la purificación del ADN a partir de estas bandas y su posterior secuenciación, se obtuvieron 18/70 (25,7 %) secuencias de pacientes y 11/59 (18,6 %) secuencias de controles. Particularmente, se obtuvo la secuencia tanto del promotor como de la secuencia que codifica para la proteína viral. Si bien en las secuencias de nucleótidos, principalmente en el promotor de vIL10 se detectaron polimorfismos puntuales, no se encontraron alelos específicos asociados con la patología (EM) ni con los individuos del grupo control, ya que los mismos se distribuyeron homogéneamente en las dos poblaciones en estudio ($p > 0,05$ en todos los casos, prueba exacta de Fisher) (**Anexo H**).

En cuanto a los polimorfismos hallados en la secuencia codificante de vIL10, al ser traducido a aminoácidos los cambios resultaron ser sinónimos o silenciosos (**Anexo I**).

5.4.1.1. Reconstrucción filogenética del gen *BCRF1*

Si bien no se encontraron polimorfismos específicos relacionados con la patología, se realizó la reconstrucción filogenética de la región codificante del gen *BCRF1* a fin de evaluar la posible existencia de un clado formado por secuencias aisladas de pacientes con EM. Para llevar a cabo esta reconstrucción primero se eligió el modelo de sustitución de nucleótidos adecuado y luego se realizó la reconstrucción con el modelo elegido y el método de máxima verosimilitud, con 1000 pseudoréplicas a fin de evaluar la significancia mediante la prueba de *bootstrap* (**Figura 25**). En la reconstrucción filogenética no se

observaron clados con soporte estadístico (*bootstrap* > 70), por lo cual se determinó que no se formó un clado de segregación independiente compuesto por secuencias de pacientes con EM ni de controles. La región codificante del gen *BCRF1* resultó poseer poca variabilidad genética, y por ende resultó ser poco informativa para definir variantes virales.

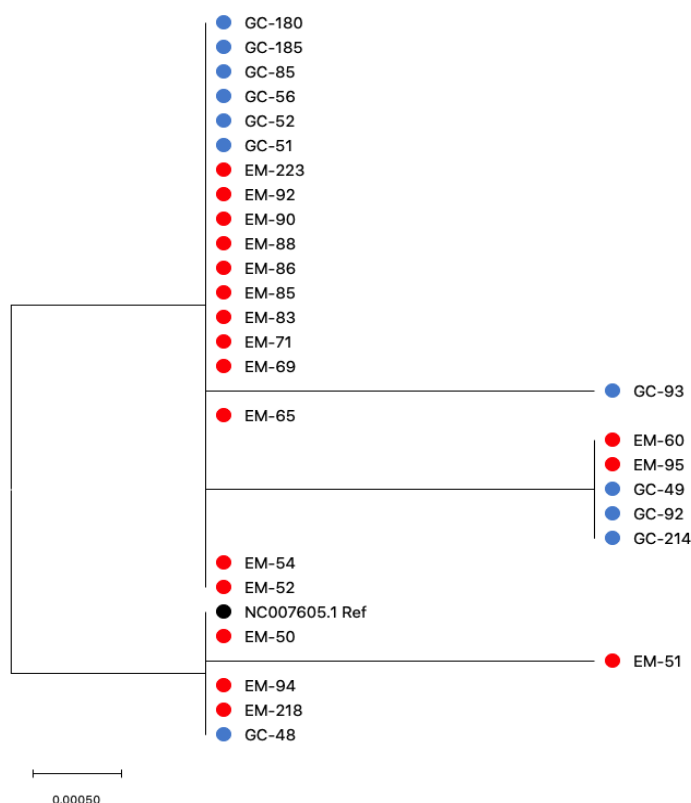


Figura 25: Reconstrucción filogenética obtenida a partir del alineamiento realizado con las secuencias de la región codificante del gen *BCRF1* proveniente de pacientes con EM y del grupo control (GC). Se incluyó la línea de referencia NC007605.1 con el fin de analizar el agrupamiento de los aislamientos obtenidos en este trabajo. En la reconstrucción filogenética no se observaron clados con soporte estadístico, todos los *bootstrap* < 70. La escala indica el número de sustituciones por sitio. EM: Esclerosis Múltiple (círculos rojos). GC: grupo control (círculos azules). NC007605.1: Referencia EBV salvaje (círculo negro).

5.4.2. Caracterización de variantes del gen *BYRF1* que codifica para la proteína viral *EBNA2*

Para la amplificación del gen *BYRF1*, se optó por utilizar una estrategia de *PCR* semi-anidada a fin de amplificar una región de 499 pb del gen, dado que esta región había sido previamente descrita como la región que concentra la mayor variabilidad y permite clasificar variantes de EBNA2. A partir de un subgrupo de 169 pacientes y 141 controles, se logró obtener un producto de amplificación visualizado en gel de agarosa correspondiente al gen de interés *BYRF1* en 72/169 (42,6 %) de los pacientes y 59/141 (41,8 %) de los controles. Luego de la purificación del ADN a partir de estas bandas y su posterior secuenciación, se obtuvieron 45/169 (26,63 %) secuencias de pacientes y 30/141 (21,28 %) secuencias

de controles. En forma similar a lo observado previamente para el gen *BCRF1*, el éxito de la secuenciación de *BYRF1* no fue del 100 %. Como puede visualizarse en la **figura 26**, en algunos casos las bandas de amplificación obtenidas eran muy tenues, si bien esas bandas fueron recuperadas del gel y se purificó el ADN, en varios casos, la masa obtenida no fue suficiente para ser secuenciada.

Del análisis de las secuencias obtenidas, fue posible caracterizar variantes virales; sin embargo, todas las variantes identificadas se distribuyeron homogéneamente en las dos poblaciones en estudio. En consecuencia, no se encontraron alelos específicos relacionados con la EM ni de circulación preferencial en el grupo control ($p > 0,05$ en todos los casos, prueba exacta de Fisher). El alineamiento completo, con la totalidad de las secuencias, se encuentra en el **Anexo J**.

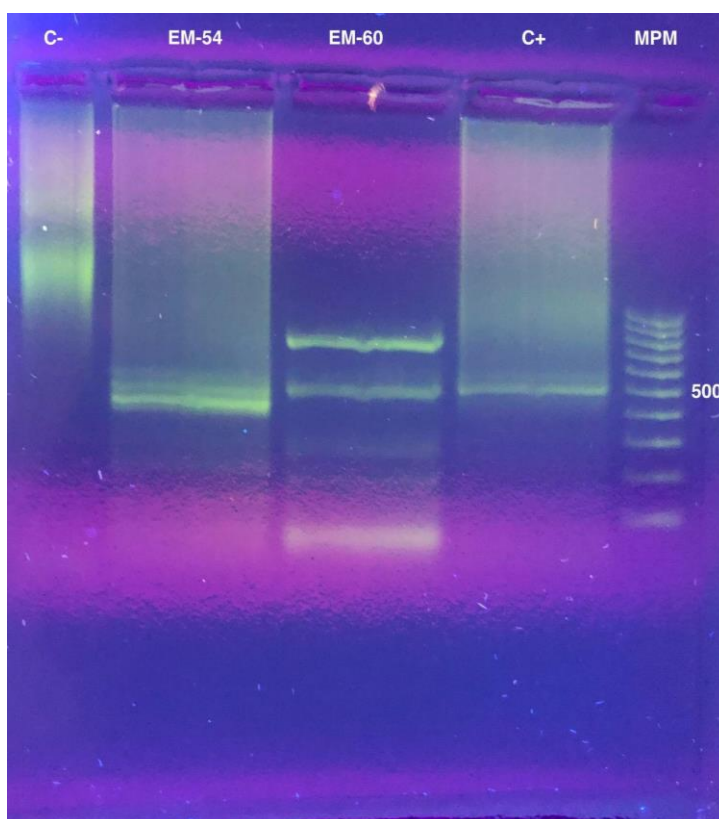


Figura 26: Fotografía de gel de agarosa 2 % representativo de la puesta a punto de la amplificación del fragmento de 499pb correspondiente a la región amplificada del gen *BYRF1*. En orden de izquierda a derecha: Calle 1: Control negativo (C-; línea celular K562), Calles 2 y 3: Muestras de pacientes con EM (EM-54 y EM-60), Calle 4: Control positivo (C+; línea celular B95.8), Calle 5: Marcador de peso molecular (MPM).

En este trabajo se detectaron variantes previamente descriptas por otros grupos de trabajo y también se encontraron variantes relacionadas con las variantes previamente publicadas. En relación con las últimas, y dado que no existe un criterio unificado de nomenclatura de variantes de EBV, se optó por denominarlas variantes relacionadas debido a que, si bien comparten polimorfismos característicos de la variante, no poseen 100 % de identidad con las variantes publicadas, pero las secuencias no difirieron

en forma sustancial como para identificarlas como una nueva variante. Dichas variantes relacionadas, en algunos casos no contenían todas las sustituciones patrón, o *hallmark*, que identifica a la variante ya caracterizada, mientras que en otros casos contenían sustituciones adicionales.

La nomenclatura utilizada para la caracterización de las variantes fue la introducida por Mechelli y col. (Mechelli et al., 2015a). Según esta nomenclatura, las secuencias son clasificadas en cinco variantes (1.1, 1.2A, 1.2B, 1.3A y 1.3B). El resto de las secuencias fueron clasificadas por su similitud a secuencias de referencia como Raji y GD1.

Entre las variantes caracterizadas en este trabajo, se encontró la variante 1.1, que posee 100 % de identidad con la secuencia de referencia de EBV derivada de la línea celular B95.8. Dicha variante fue detectada en 2/45 secuencias provenientes de los aislamientos de pacientes con EM de Argentina y 2/30 secuencias provenientes de los aislamientos del grupo control. A su vez, se caracterizaron variantes relacionadas a 1.1 en 3/45 (EM) y 1/30 (GC). A modo de ejemplo se muestra la secuencia de un caso representativo en la **figura 27**.

En paralelo, se identificaron variantes relacionadas al alelo 1.2 en 11/45 secuencias provenientes de los aislamientos de pacientes con EM de Argentina y 9/30 secuencias provenientes de los aislamientos del grupo control. En particular, en 4/11 aislamientos de pacientes con EM y 1/9 aislamientos de controles similares al alelo 1.2, se caracterizó la sustitución c.505G>A, que a nuestro mejor entender no fue reportada con anterioridad en la literatura científica (**Figura 27**). En forma independiente, aunque también dentro del grupo de variantes 1.2, se observaron variantes relacionadas al alelo 1.2A en 3/11 y 5/9 aislamientos provenientes de pacientes y controles, respectivamente. Dichas secuencias contenían la sustitución c.733C>T (presente en el alelo 1.2A y ausente en el alelo 1.2B); sin embargo, ninguna de las secuencias analizadas contenía la sustitución c.766G>A, presente tanto en el alelo 1.2A como en el 1.2B (**Figura 27**).

Simultáneamente se caracterizaron variantes relacionadas a la variante 1.3 originalmente descrita por Mechelli y col. en el año 2015, en 15/45 secuencias provenientes de los aislamientos de pacientes con EM y 7/30 secuencias provenientes de los aislamientos del grupo control. Se detectó el polimorfismo c.721A>C en 3/15 y 1/7 secuencias de pacientes y controles, respectivamente. En forma similar a lo previamente descrito este cambio no fue reportado con anterioridad en la literatura. Por otro lado, en todas estas secuencias provenientes de aislamientos de pacientes y controles, se detectó la inserción de un codón CTC entre las posiciones nucleotídicas 633 y 634. Dentro del subgrupo relacionado a 1.3, se observaron variantes relacionadas particularmente al alelo 1.3A en 5/15 y 1/7 de las secuencias provenientes de pacientes y controles respectivamente, dado que presentaron el polimorfismo c.616C>G (presente en el alelo 1.3 A y ausente en el alelo 1.3B). Finalmente, ninguna de las secuencias presentaba el cambio c.766G>A, que se encuentra presente en el alelo 1.3B (**Figura 27**).

Respecto al resto de las secuencias obtenidas, en 10/45 secuencias de pacientes y 5/30 secuencias de controles se observó una secuencia relacionada a la línea celular GD1. En 4/45 secuencias de pacientes

y 6/30 secuencias de controles se observó una secuencia relacionada a la línea celular Raji (**Figura 27; Tabla 19**).

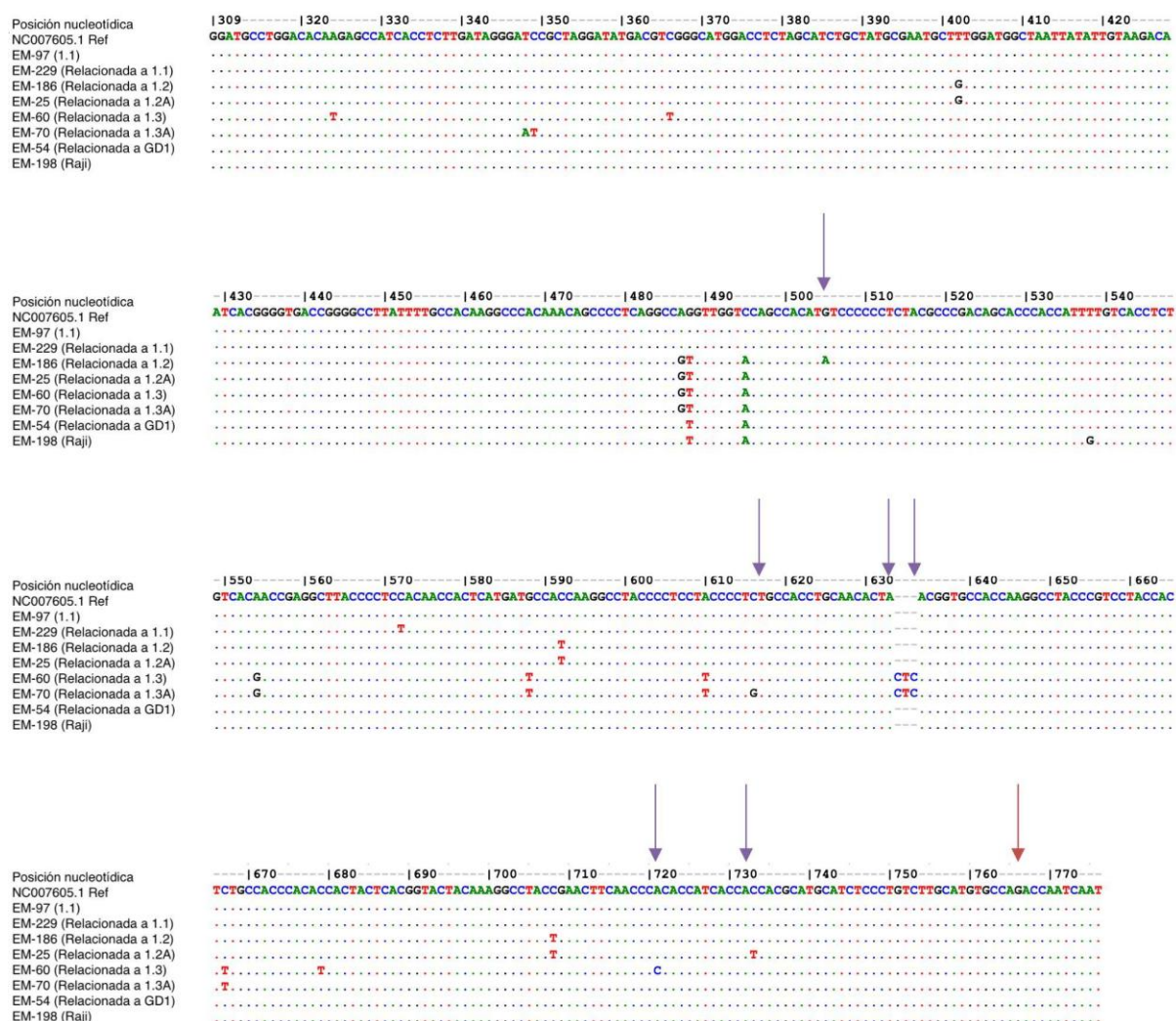


Figura 27: Alineamiento representativo de secuencias de ADN de la región comprendida entre los nucleótidos 309 y 776 del gen BYRF1 que codifica para la proteína EBNA2. Se muestran alineadas una selección de variantes caracterizadas en este trabajo, que fueron iguales o relacionadas a los alelos previamente descritos (1.1, 1.2, 1.2A, 1.3A o a secuencias de las líneas celulares Raji y GD1). La posición nucleotídica en la parte superior del alineamiento se refiere a la secuencia de referencia, línea celular B95.8. Las flechas violetas indican las posiciones con sustituciones de nucleótidos respecto a la línea de referencia NC007605.1, mientras que las flechas rojas indican las posiciones donde se esperaba detectar una sustitución patrón, la cual no fue detectada.

Tabla 19: Descripción de los alelos caracterizados a partir de la secuenciación del gen *BYRF1* en los aislamientos de pacientes con EM y controles sanos de Argentina.

Alelos	EM, n (%) (n=45)	CS, n (%) (n=30)	p valor
Variante 1.1	2 (4,4)	2 (6,7)	> 0,05
Variantes relacionadas a 1.1	3 (6,7)	1 (3,3)	> 0,05
Variantes relacionadas a 1.2	7 (15,5)	8 (26,7)	> 0,05
Variante relacionada a 1.2A	4 (8,9)	1 (3,3)	> 0,05
Variantes relacionadas a 1.3	10 (22,2)	6 (20)	> 0,05
Variantes relacionadas a 1.3A	5 (11,1)	1 (3,3)	> 0,05
Variantes relacionadas a GD1	10 (22,2)	5 (16,7)	> 0,05
Variante relacionada a Raji	4 (9,1)	6 (20)	> 0,05

Tal como ocurrió con las secuencias nucleótidos, a partir del análisis de las secuencias proteicas obtenidas, si bien se identificaron cambios aminoacídicos no fue posible caracterizar variantes virales particulares relacionadas con el grupo de pacientes con EM ni con el grupo de controles ($p > 0,05$ en todos los casos, prueba exacta de Fisher). El alineamiento proteico completo, con la totalidad de las secuencias, se encuentra en el *Anexo K*.

En cuanto a la variante 1.1, a nivel de secuencia proteica fue exactamente igual a la referencia utilizada, mientras que en las secuencias relacionadas a la variante 1.1 se detectaron cambios sin sentido a nivel aminoacídico.

Con respecto a la secuencia de aminoácidos de alelos asociados a 1.2, tanto la sustitución c.505G>A como c.733C>T representaron cambios en los aminoácidos distintos al de la secuencia de la línea de referencia p.V168I y p.P244S, respectivamente. La sustitución c.766G>A presente en los alelos 1.2A y 1.2B, originalmente descriptos por Mechelli y col., representa un cambio de aminoácido p.N255D en la secuencia de referencia. Sin embargo, dicha sustitución no fue observada en los aislamientos argentinos (*Figura 28*).

Respecto a la secuencia de aminoácidos de alelos relacionados a 1.3, el polimorfismo c.616C>G se tradujo en un cambio aminoacídico p.L205V, respecto de la secuencia de referencia. A su vez, se observó la inserción de una leucina entre las posiciones aminoacídica 210 y 211, en todos los pacientes y controles: p.L210_T211InsL. El polimorfismo c.721A>C representó un cambio de aminoácido p.T240P respecto de la secuencia de referencia. La sustitución c.766G>A presente en el alelo 1.3B de

referencia representó un cambio aminoacídico p.N255D respecto de la secuencia de referencia; sin embargo, dicho cambio no fue detectado en los aislamientos argentinos (**Figura 28**).

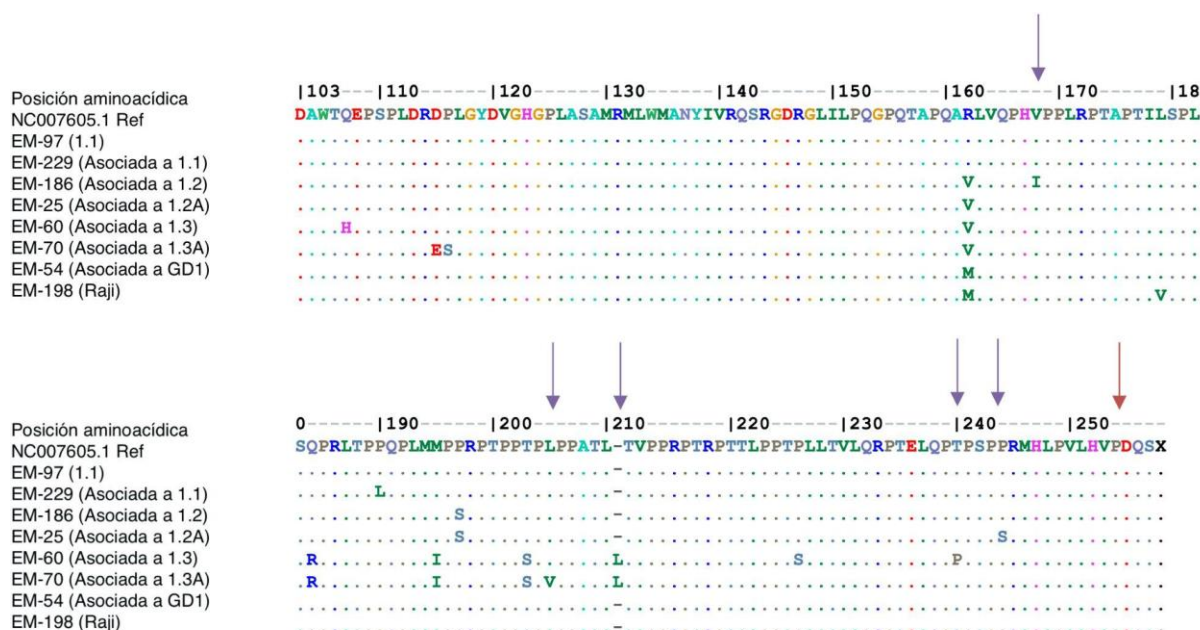


Figura 28: Alineamiento en aminoácidos de la región comprendida entre el aminoácido 103 y 258 de la proteína EBN A2. Se muestran alineadas una selección de variantes caracterizadas en este trabajo, que fueron iguales o relacionadas a los alelos previamente descritos (1.1, 1.2, 1.2A, 1.3A o a secuencias de las líneas celulares Raji y GD1). La posición aminoacídica en la parte superior del alineamiento se refiere a la secuencia de referencia, línea celular B95.8. Las flechas violetas indican las posiciones con sustituciones de aminoácidos respecto a la línea de referencia NC007605.1, mientras que las flechas rojas indican las posiciones donde se esperaba detectar una sustitución patrón, la cual no fue detectada.

5.4.2.1. Reconstrucción filogenética del gen BYRF1

Si bien no se detectaron polimorfismos específicos relacionados con la patología, se realizó la reconstrucción filogenética de la región codificante del gen *BYRF1* a fin de estudiar la segregación de los alelos. Para llevar a cabo esta reconstrucción primero se eligió el modelo de sustitución de nucleótidos adecuado y luego se realizó la reconstrucción con el modelo elegido con el algoritmo de máxima verosimilitud ver **figura 29**.

En la reconstrucción filogenética, se visualizó un clado con soporte estadístico significativo (*bootstrap* > 70) que corresponde a los alelos 1.2A y 1.2B, previamente descritos. Sin embargo, no se observó un clado de segregación independiente compuesto preferencialmente por secuencias de pacientes con EM o del grupo control. Por lo tanto, se confirmó que en este conjunto de secuencias obtenidas en Argentina no existe un alelo asociado a un riesgo aumentado de desarrollo y/o progresión de la EM. En forma similar, tampoco se identificó un alelo que se encuentre presente solo en los controles y que pudiera suponerse protector frente a la enfermedad.

Dado que no se encontró una asociación con la patología, se analizó la posible asociación de variantes del gen que codifica para EBNA2 con la geografía, debido a que se reportó para otros genes del EBV una asociación de variantes virales con el origen geográfico de los aislamientos. Para dicho fin, se construyó un *dataset* de secuencias balanceado por geografía, que contenía las secuencias de Argentina (EM y GC), las referencias (B95.8, Raji y GD1), los alelos (1.1, 1.2A, 1.2B, 1.3A y 1.3B) y al cual se le adicionaron secuencias descargadas de *GenBank* provenientes de diferentes regiones geográficas del mundo (Europa, Asia, Asia Occidental, África, Estados Unidos, Australia, Indonesia y Papúa Nueva Guinea); Indonesia y Papúa Nueva Guinea se consideraron como una misma región. En este análisis sólo se incluyeron secuencias de aislamientos de EBV de tipo I, debido a que los cebadores utilizados en este trabajo permitieron la amplificación de EBV de tipo I y no de EBV de tipo II. Por su parte, para

llevar a cabo la reconstrucción filogenética primero se eligió el modelo de sustitución de nucleótidos adecuado y luego se realizó la reconstrucción con el modelo elegido y con el algoritmo de máxima verosimilitud, ver *figura 30*.

Luego de la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las secuencias del mencionado *dataset*, se observó en el árbol filogenético la existencia de 4 clados con sustento estadístico (*bootstrap* > 70). En primer lugar, cabe resaltar la existencia de un clado con soporte de *bootstrap* = 95, compuesto casi en forma exclusiva por aislamientos de Asia y de Indonesia y Papua Nueva Guinea. En este sentido, este clado se compuso de 9 aislamientos de Asia, 13 de Indonesia y Papúa Nueva Guinea y 1 secuencia de Europa, lo cual refleja la escasa variabilidad genética de estos aislamientos asiáticos. Un segundo clado, con soporte de *bootstrap* = 94, fue conformado por 7 aislamiento de Argentina y compartió un ancestro común reciente con el clado asiático arriba mencionado; lo cual refleja la introducción en Argentina de variantes de EBV desde Asia, producto de diversas olas migratorias. Los dos clados restantes (soporte de *bootstrap* = 94 y 90) fueron conformados sólo por dos aislamientos cada uno. Respecto de los 23 aislamientos restantes de Argentina, los mismos se encontraron distribuidos a lo largo de toda la topología del árbol filogenético, junto con aislamientos de América del Norte, Europa, África y Australia, pero sin conformar clados de segregación con soporte de *bootstrap*; hecho que demuestra el carácter cosmopolita de las mencionadas regiones que, a lo largo de los años, han registrado diversas oleadas migratorias.

En el contexto del mencionado clado cosmopolita, si bien sin soporte de *bootstrap*, se podría mencionar que la variante 1.3B se encontraría predominantemente relacionada con otros aislamientos de Europa. De forma similar, los aislamientos de Argentina demostrarían mayor identidad de secuencia con los alelos de referencia 1.2A y 1.2B. Por otro lado, el alelo 1.3A pertenecería a un clado donde predominan secuencias de Argentina, Europa y Australia. Raji estaría en un clado formado principalmente por secuencias argentinas. El alelo 1.1 y la línea B95.8 agruparían juntas en un clado con secuencias de todas las regiones estudiadas. GD1 también agruparía en un gran clado con secuencias de todo el mundo.

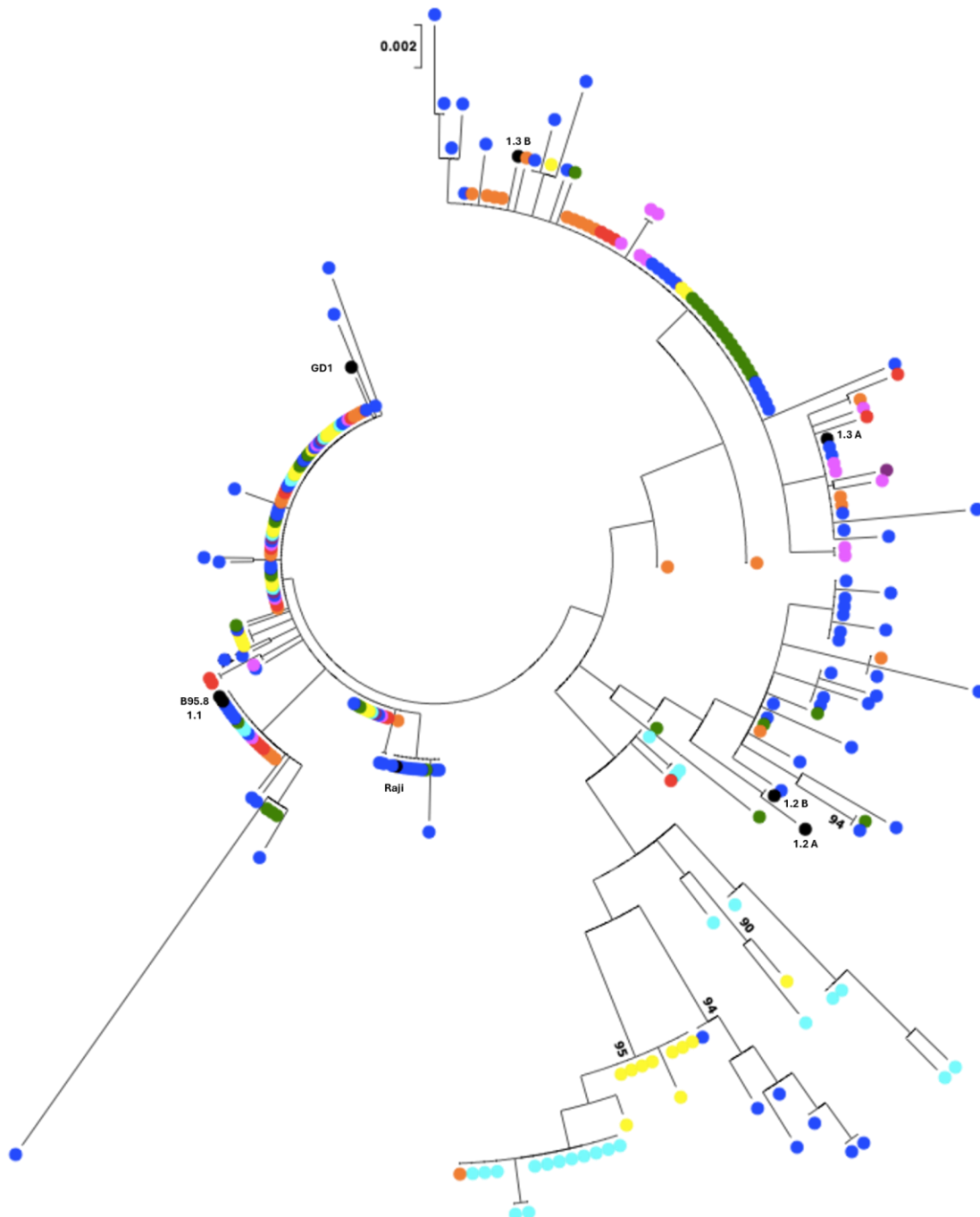


Figura 30: Reconstrucción filogenética obtenida a partir del alineamiento realizado con las secuencias de la amplificación del gen *BYRF1* de pacientes con EM, controles sanos, secuencias de referencia, alelos y secuencias de aislamientos de diversas regiones geográficas descargadas de GenBank. Agrupamiento por geografía de los aislamientos obtenidos en este trabajo y los descargados de GenBank. La escala indica el número de sustituciones por sitio. Referencias y alelos (círculo negro), Argentina (círculo azul), África (círculo verde), Asia (círculo amarillo), Papúa Nueva Guinea e Indonesia (círculo celeste), Asia Occidental (círculo violeta), Australia (círculo magenta), Estados Unidos (círculo rojo) y Europa (círculo naranja).

Por otro lado, y dada la escasez de secuencias de EBNA2 provenientes de aislamientos de pacientes con EM se decidió analizar si existía alguna similitud con secuencias pertenecientes a aislamientos de otras

patologías asociadas con el EBV. Para dicho fin, se extrajeron secuencias de *GenBank* que pertenecían a aislamientos de diversas patologías neoplásicas como linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos, desórdenes linfoproliferativos postrasplante o de aislamientos de sujetos con mononucleosis infecciosa y, por último, muestras no patológicas, provenientes de dadores sanos. Por lo tanto, además de analizar el agrupamiento de secuencias según el origen geográfico, se analizó el agrupamiento de las secuencias según la patología: por patología linfoproliferativa (linfomas), infección benigna (MI y dadores sanos) y enfermedad neurodegenerativa (EM) ver **figura 31**. Si bien el árbol es el mismo que se describió en el inciso anterior, en este caso se pudo observar si las secuencias se agrupaban por patologías. Según lo observado en los 4 clados con sustento estadístico (*bootstrap* > 70), el clado que contiene una secuencia de África y una Argentina corresponde a dos secuencias malignas (*bootstrap* = 94), el clado que contiene una secuencia de Asia y una de Indonesia y Papúa Nueva Guinea corresponde a una secuencia benigna y la otra no identificada (*bootstrap* = 90), el clado que contiene 7 secuencias de Argentina corresponde a 5 secuencias malignas (*bootstrap* = 94), una benigna y un aislamiento del grupo control de este trabajo y finalmente el clado que contiene 9 secuencias de Asia, 13 secuencias de Indonesia y Papúa Nueva Guinea y 1 secuencia europea corresponde a 16 secuencias malignas y 5 secuencias benignas (*bootstrap* = 95). En lo referente a las líneas celulares y los alelos previamente descritos, aunque sin soporte estadístico estadístico, se observó que todos se encuentran en clados mixtos con secuencias de origen neoplásico, neurodegenerativo e infección benigna o portadores sanos, por lo tanto, ninguno de los alelos estudiados resultó asociado a la EM, ni tampoco se identificó un alelo protector que segregue preferencialmente con secuencias benignas o con el grupo control.

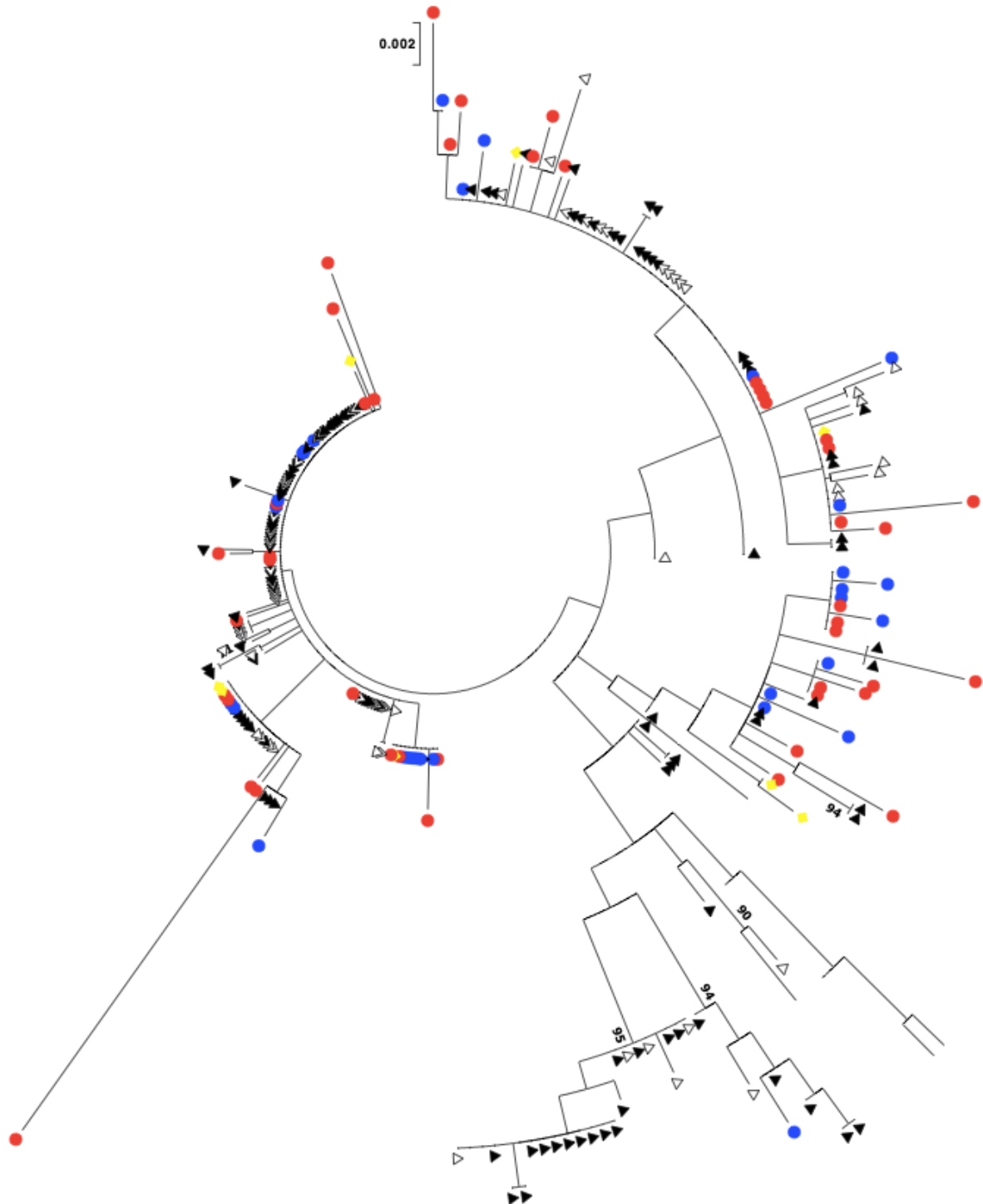


Figura 31: Reconstrucción filogenética obtenida a partir del alineamiento realizado con las secuencias de la amplificación del gen BYRF1 de pacientes con EM, controles sanos, secuencias de referencia, alelos y secuencias de distintos aislamientos de mundo descargadas de GenBank. Agrupamiento por patología de los aislamientos obtenidos en este trabajo y los descargados de GenBank. La escala indica el número de sustituciones por sitio. Secuencias de referencia y alelos descriptos (rombo amarillo), EM de Argentina (círculo rojo), grupo control de Argentina (círculo azul), patologías neoplásicas (triángulo negro), portadores con infección benigna (triángulo blanco).

A modo de aclaración, si bien el material genético utilizado como templado para llevar a cabo las *PCR* y la posterior secuenciación de los productos de amplificación fue el mismo, no en todos los casos fue posible secuenciar ambos genes (*BCRF1* y *BYRF1*). En total, entre la secuenciación para *BCRF1* y *BYRF1* se obtuvieron 50 secuencias de pacientes y 37 secuencias de controles sanos. En algunos casos sólo fue posible secuenciar el gen *BCRF1* (5/50 EM y 7/37 CS) y en otros casos sólo fue exitosa la secuenciación del gen *BYRF1* (31/50 EM y 22/37 CS). Se logró la secuenciación directa de ambos genes en 13/50 pacientes con EM y en 4/37 controles sanos.

5.5. Respuesta transcripcional en linfocitos B infectados por el EBV.

Dado que los linfocitos B son el reservorio del EBV en estado de latencia, se decidió investigar la respuesta transcripcional en dichos linfocitos infectados por el EBV. A fin de separar la población de linfocitos de interés por citometría de flujo, se incluyeron controles de autofluorescencia (células sin marcación) y los controles de isotipos correspondientes, según se detalló en la sección de metodología. A partir de estos controles se determinaron los cuadrantes correspondientes que permitieron separar a los linfocitos B según su estatus de infección. De esta forma se seleccionó la población CD20⁺ EBNA1⁺, linfocitos B de memoria o vírgenes, infectados con el virus Epstein Barr y los linfocitos CD20⁺ EBNA1⁻ que no estaban infectados con el virus. Ambos grupos de células fueron separadas por *cell-sorting*, luego se extrajo el ARN y fueron remitidas como parte de una colaboración, al *Broad Institute* en Massachusetts, Estados Unidos, para analizar su perfil transcripcional por secuenciación masiva del ARNm (*RNA-seq*).

Debido a que la cantidad de células sorteadas en el grupo CD20⁺ EBNA1⁺ fue muy escasa, se decidió hacer un *pool* con las muestras de linfocitos B de memoria y vírgenes. Siendo que aun así la cantidad de ARN era menor a la requerida para el ensayo de *RNA-seq* para la población de linfocitos B totales infectados por el EBV, finalmente se optó por realizar un nuevo *pool* con las muestras de linfocitos B totales de todos los pacientes y las muestras de linfocitos B totales de todos los controles. De esta forma, se obtuvieron 4 grupos en total: (1) linfocitos B totales CD20⁺ EBNA1⁺ del grupo de pacientes con esclerosis múltiple; (2) linfocitos B totales CD20⁺ EBNA1⁻ del grupo de pacientes con esclerosis múltiple; (3) linfocitos B totales CD20⁺ EBNA1⁺ del grupo de controles y; (4) linfocitos B totales CD20⁺ EBNA1⁻ del grupo de controles.

En colaboración con el laboratorio del Dr. Francisco Quintana en el *Brigham and Women's Hospital*, se realizó el ensayo de *RNA-seq* y el análisis bioinformático comparando estos 4 grupos de interés.

El primer análisis que se realizó fue el de análisis de componentes principales (ACP, o *PCA Principal Component Analysis*, por sus siglas en inglés), donde se aprecia cómo agruparon las muestras en base a su similitud (**Figura 32**). A partir de dicho gráfico, se observó que el componente principal 1 (PC1) permite diferenciar las poblaciones de linfocitos B EBV positivos (H7 y H8) de las poblaciones EBV

negativos (H3 y H4). A su vez el componente principal 2 (PC2) permite diferenciar las poblaciones de linfocitos B EBV negativos de los pacientes con EM de los linfocitos B del grupo control (H3 y H4, respectivamente). Si bien era esperable que la población $CD20^+ EBNA1^+$ difiriera entre pacientes y controles, H8 y H7, respectivamente, esto no fue observado. Este último hecho podría deberse a la escasa cantidad de eventos separados durante la citometría de flujo.

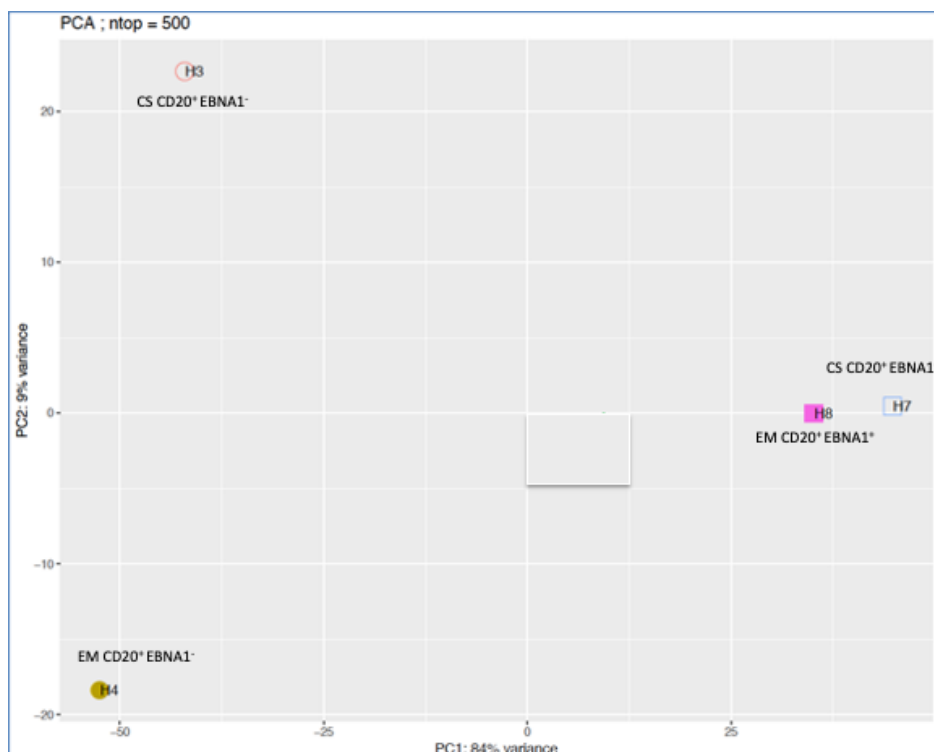


Figura 32: Análisis de componentes principales a partir de los resultados del ensayo de RNA-seq. En el gráfico se ven 4 poblaciones: Controles $CD20^+ EBNA1^-$ (H3). Pacientes con EM $CD20^+ EBNA1^-$ (H4). Controles $CD20^+ EBNA1^+$ (H7). Pacientes con EM $CD20^+ EBNA1^+$ (H8).

Luego se graficó un mapa de calor (*heatmap*) que permite visualizar e interpretar los datos de expresión de los transcritos. En este *heatmap*, cada fila representa un transcrito, mientras que cada columna representa una muestra. Los colores y su intensidad representan los cambios en la expresión del transcrito (rojo = sobreexpresión, azul = baja expresión) (**Figura 33**). Dado que finalmente solo se tuvo una muestra por grupo, no se pudo calcular la variabilidad dentro de los grupos (FDR, *false discovery rate*, por sus siglas en inglés). Se observa en el *heatmap* que existe diversidad de transcritos con expresión diferencial entre los grupos. Dado que la expresión diferencial de genes en linfocitos B de pacientes con EM y controles fue ampliamente descrita a lo largo de los años, este análisis sólo se focalizó en la comparación de linfocitos $CD20^+ EBNA1^+$ entre pacientes y controles. Al tratarse de más de 50 genes que se encontraban diferencialmente expresados entre las poblaciones de interés, se realizó una búsqueda más específica. Con la ayuda de un especialista en bioinformática, se seleccionaron del listado inicial aquellos transcritos con polimorfismo de nucleótido único (*SNP Single-nucleotide*

polymorphism, por su sigla en inglés) previamente descriptos como asociados a EM en bases de datos (Beecham et al., 2013; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2011; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019a). Luego de esta búsqueda, el listado de transcritos se redujo a sólo un gen, el gen *IQGAP1* que codifica para la proteína IQGAP1. En este caso, se determinó que el ARNm de *IQGAP1* tenía una expresión significativamente menor en linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁺ de pacientes con EM comparado con linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁻ de pacientes con EM ($p = 0.03$), mientras que en el resto de los grupos comparados no se vieron diferencias significativas.

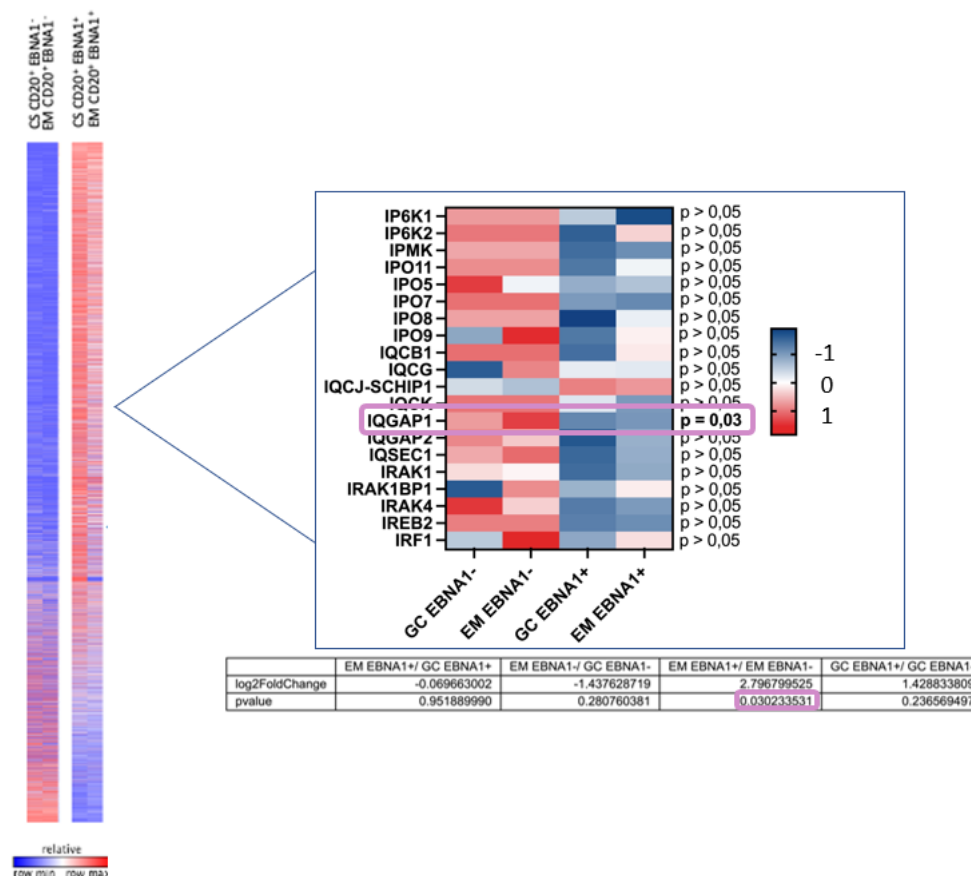


Figura 33: Heatmap a partir de los resultados del RNA-seq. En las columnas de izquierda a derecha se visualiza: Controles CD20⁺ EBNA1⁻, Pacientes con EM CD20⁺ EBNA1⁻, Controles CD20⁺ EBNA1⁺, Pacientes con EM CD20⁺ EBNA1⁺. En el panel de la derecha se ve el zoom de los genes, haciendo particular enfoque en *IQGAP1* que se encuentra diferencialmente expresado.

5.6. Ensayos in vitro - Silenciamiento de *Iqgap1*

Dado que en los resultados del *RNA-seq* se observó una disminución en la expresión del ARNm de *IQGAP1*, en los linfocitos B de pacientes con EM EBNA1⁺ en comparación con los linfocitos B de pacientes con EM EBNA1⁻, se decidió realizar ensayos *in vitro*, silenciando *IQGAP1* con un ARN de silenciamiento. Por lo tanto, se silenció el gen *Iqgap1* en linfocitos B de ratón (una situación que

representa lo observado en linfocitos B EBNA1⁺ de los pacientes con EM) y se los comparó con linfocitos B de ratón sin silenciar (situación que representa a los linfocitos B EBNA1⁻).

5.6.1. Efectividad del silenciamiento de *Iqgap1*

Como primer paso se verificó que el ARN de silenciamiento elegido, efectivamente hubiera silenciado parcialmente al gen *Iqgap1*. Cabe mencionar que el sistema utilizado no inactiva por completo al gen de interés, sino que es un sistema de disminución parcial de la expresión del gen. En este caso, era de interés que la disminución de la expresión fuera parcial, dado que en el ensayo de *RNA-seq* se observó que si bien los linfocitos B EBNA1⁺ de los pacientes expresaban el gen, su expresión estaba disminuida comparado con los linfocitos B EBNA1⁻. Se decidió corroborar el silenciamiento parcial del gen *Iqgap1* utilizando la técnica de *qPCR*.

Tanto para esta *qPCR* como para las siguientes, se realizaron los pasos de validación explicados con anterioridad en el inciso 8.2 En todos los casos el gen endógeno seleccionado fue *Gapdh*. A modo de ejemplo se describe el proceso de puesta a punto y validación para *Iqgap1* y *Gapdh*. En base a las curvas de amplificación ensayadas para *Gapdh* e *Iqgap1*, se determinaron los parámetros correspondientes al umbral y a la línea de base. En el caso de *Gapdh* el umbral seleccionado fue 0,29 y la línea de base 20, mientras que para *Iqgap1* el umbral seleccionado fue 0,17 y la línea de base 17 (**Figura 34**).

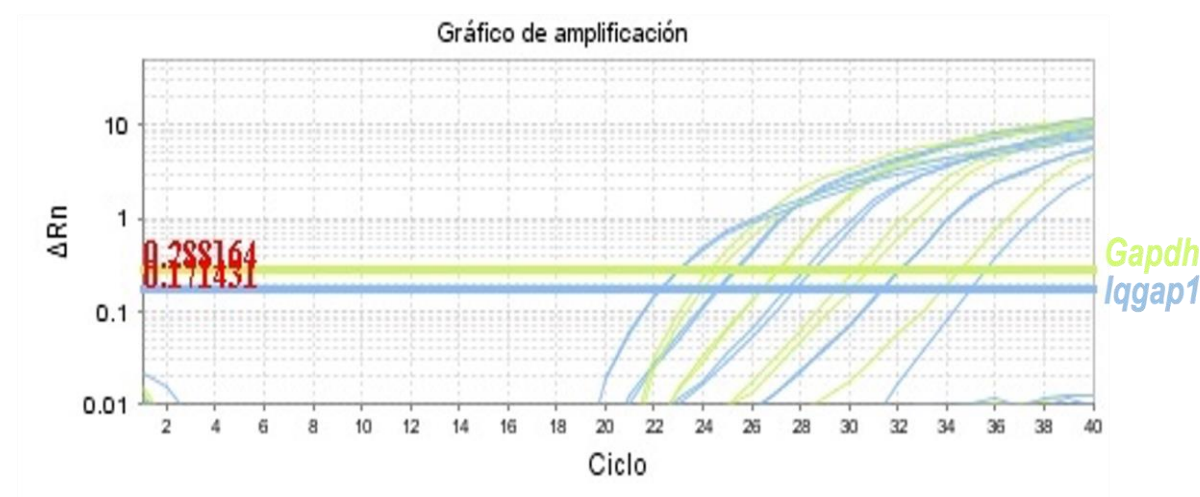


Figura 34: Curvas de amplificación para los transcritos de *Gapdh* e *Iqgap1*. Gráficos correspondientes a las curvas de amplificación, con sus respectivos duplicados. En cada caso, se grafica el cambio de fluorescencia (ΔRn , en unidades arbitrarias) en función del ciclo en el que se alcanza el valor umbral para las diluciones seriadas al décimo. El valor del umbral se determinó a partir del gráfico en escala logarítmica (línea verde para el transcripto de *Gapdh*, línea celeste para el de *Iqgap1*).

Con respecto a las curvas de disociación (*melting*), en todos los casos se observó un pico correspondiente a cada producto de amplificación, y un pico de tamaño despreciable que correspondería a los dímeros de cebadores (*Figura 35*).

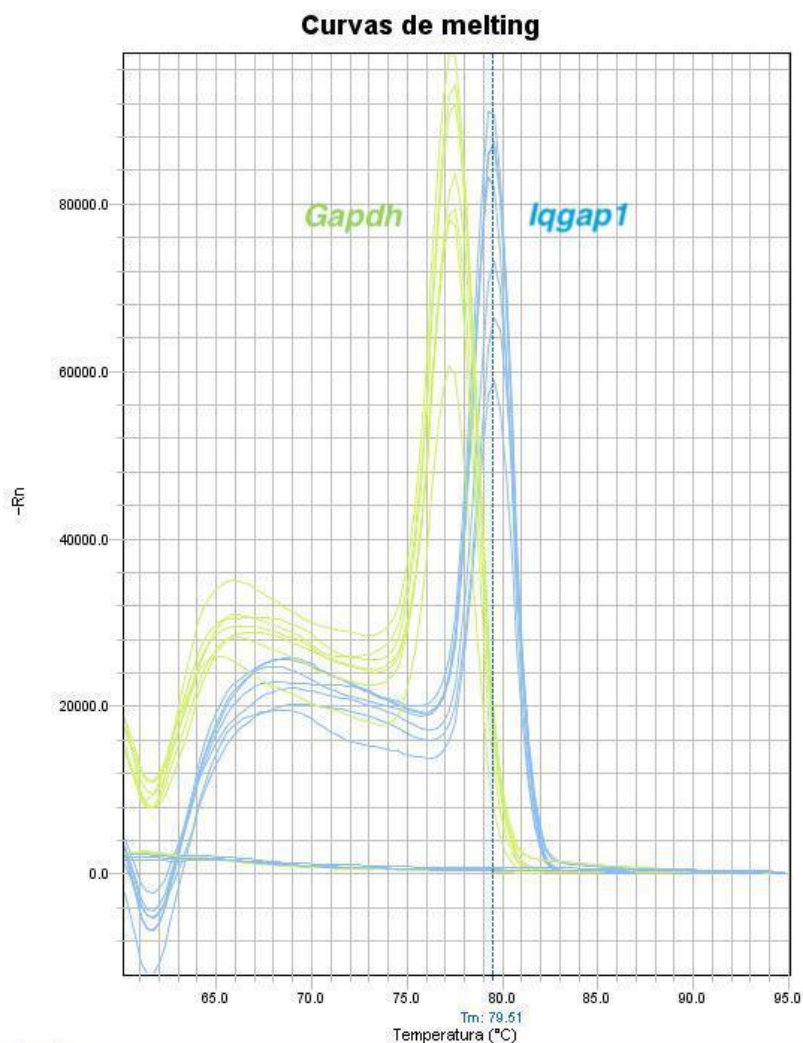


Figura 35: Curvas de melting para los transcritos de *Gapdh* e *Iqgap1*. Se graficaron las curvas de melting asociadas a las curvas de amplificación obtenidas para *Gapdh* e *Iqgap1*. Curva verde para el transcrito de *Gapdh*, curva celeste para el transcrito de *Iqgap1*.

Luego se graficaron los valores de Ct obtenidos para cada dilución de las curvas de calibración en función del logaritmo de dicha dilución (*Figura 36*). Como primera validación, se verificó que las curvas estándares obtenidas para *Iqgap1* y *Gapdh* fuesen paralelas y, a su vez, que la eficiencia de amplificación se encontrase en un rango entre 90 y 110%. Finalmente, se obtuvo el coeficiente de correlación (R^2) para cada una de las curvas estándar. En ambos casos, se obtuvieron valores de R^2 que demostraron un ajuste adecuado de los valores de cada curva estándar, mientras que los valores de las eficiencias se encontraron dentro del rango esperado, lo cual confirma que, luego de cada ciclo de amplificación, el templado se duplica durante la etapa exponencial del ciclo.

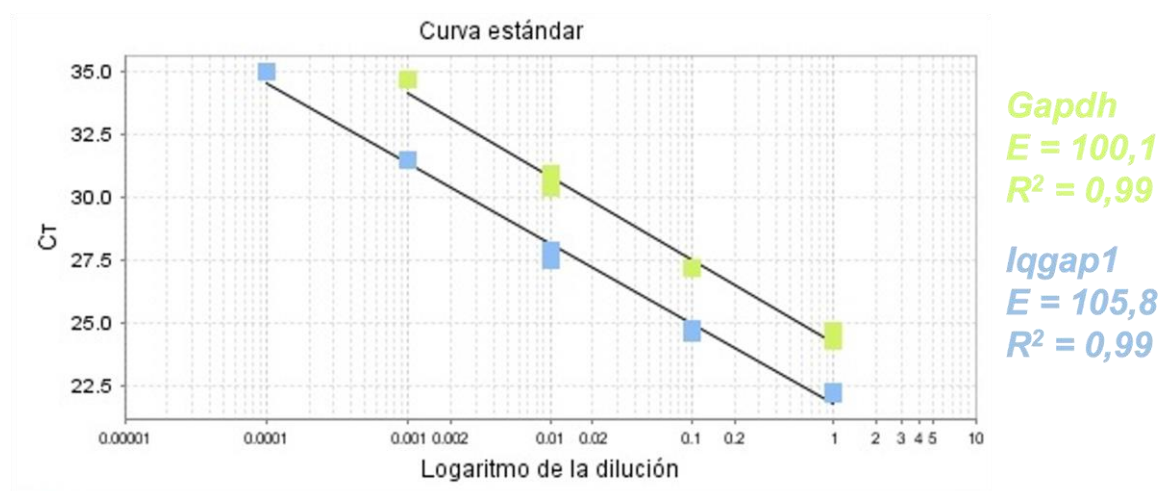


Figura 36: Curvas estándares para los transcritos de *Gapdh* e *Iqgap1*. Se graficó el Ct obtenido en cada dilución seriada en función del logaritmo de dicha dilución. Para el transcrito de *Gapdh* se ilustran los valores correspondientes a las eficiencias (E) y a los coeficientes de correlación (R^2) en color verde. Mientras que para los transcritos de *Iqgap1* se ilustran los valores de E y R^2 en color celeste.

Por último, se graficó el valor ΔCt , entre el valor de Ct del transcrito de *Iqgap1* y el valor de Ct del transcrito de *Gapdh*, en función del logaritmo del factor de la dilución de cada punto de las diferentes curvas estándares (**Figura 37**). A partir de la regresión lineal de los datos, se calculó la pendiente de la recta, parámetro en el cual un valor menor o igual a 0,1 es considerado como aceptable dado que indica que la diferencia en el nivel de amplificación entre los transcritos es constante a lo largo de todas las diluciones.

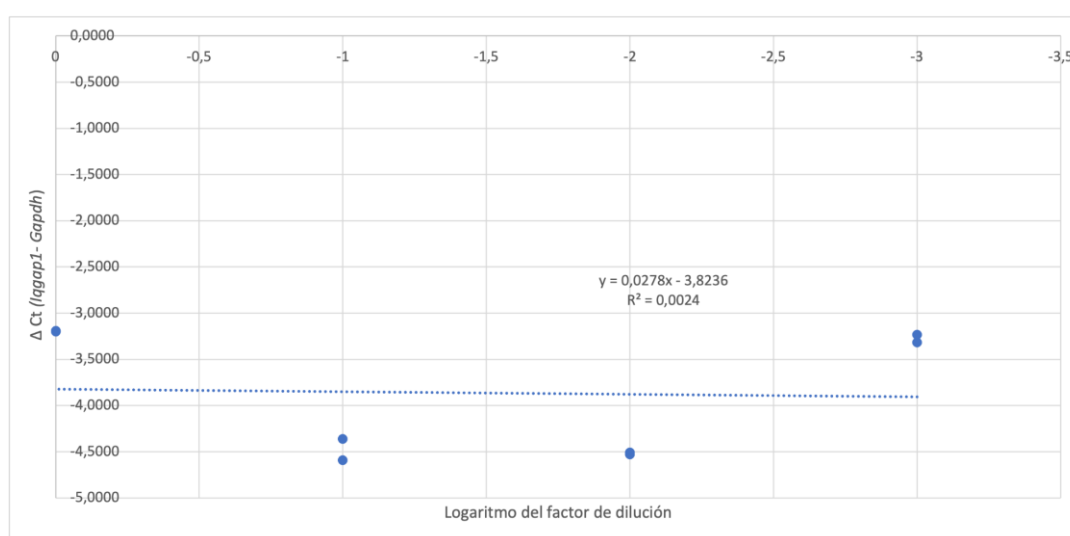


Figura 37: Validación final de *Gapdh* como gen endógeno. Se graficó el ΔCt entre *Iqgap1* y *Gapdh* a partir de los datos obtenidos de las curvas estándar para cada dilución. Se ilustra la línea de tendencia con su correspondiente ecuación.

Según se observa en la **figura 37**, la pendiente de la recta, $m = 0,0278$, resultó menor a 0,1, lo cual confirma que la diferencia entre los distintos puntos de cada curva se mantuvo constante a lo largo de la curva de calibrado. En base a estos resultados, se confirmó la elección del gen *Gapdh* como gen endógeno a utilizar durante todos los experimentos de este trabajo de tesis.

En base a la elección del gen endógeno y utilizando la técnica de *qPCR* se comprobó que la expresión de *Iqgap1* de los linfocitos B aislados de ratón C57BL/6J salvaje luego de 3 días de cultivo, disminuye al usar el ARN de silenciamiento dirigido contra *Iqgap1* (*Iqgap1*-siRNA) con una expresión relativa media de $0,68 \pm 0,03$ comparado con el ARN de silenciamiento que no está dirigido a ningún blanco específico (*scr*-siRNA) con una expresión relativa media de $1,03 \pm 0,03$ y dicha disminución fue significativa estadísticamente ($p = 0,0008$, prueba t de student) (**Figura 38**).

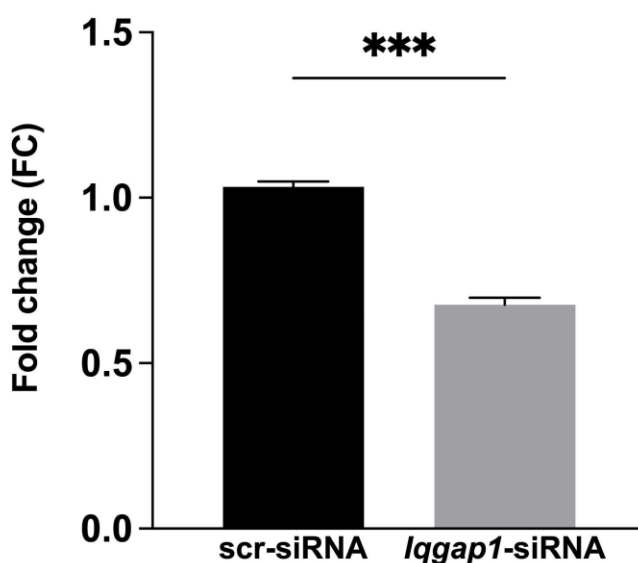


Figura 38: Gráfico de barras comparando la expresión relativa del gen *Iqgap1* utilizando un ARN de silenciamiento que no está dirigido a un blanco específico (*scr*-siRNA) y el ARN de silenciamiento dirigido (*Iqgap1*-siRNA). Silenciamiento de *Iqgap1* luego de 3 días de cultivo de linfocitos B aislados de ratón C57BL/6J salvaje. La altura de la barra representa la media de 6 réplicas y se grafica la barra de DE. *** $p = 0,0008$, prueba estadística t de student.

5.6.2. Proliferación celular

Teniendo en cuenta estudios previos que demostraron que la proteína IQGAP1 está involucrada en la regulación de proliferación celular de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ (Gorman et al., 2012a; Okuyama et al., 2020), y por otro lado, teniendo en cuenta que se reportó que los pacientes con EM presentan un aumento en la proliferación de los linfocitos B vírgenes maduros (Kinnunen et al., 2013), se evaluó cuál es el efecto de la disminución de la expresión de *Iqgap1* en la proliferación de los linfocitos B. Para dicho objetivo, se realizó un ensayo de incorporación de timidina tritiada, tal como se explicó en el inciso 12.

Luego de silenciar parcialmente la expresión de *Iqgap1* en cultivo de linfocitos B de ratones C57BL/6J salvajes se observó un aumento en la incorporación de timidina tritiada (84257 ± 12874 cpm) respecto de los linfocitos B transfectados con el scr-siRNA (47283 ± 12205 cpm), diferencia que resultó estadísticamente significativa ($p = 0,0009$, prueba t de student) (**Figura 39**).

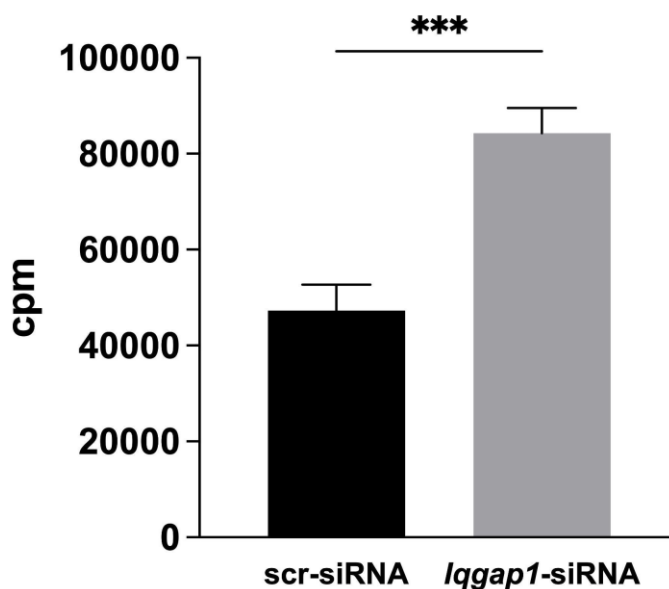


Figura 39: Gráfico de barras comparando la proliferación celular de los linfocitos B. Ensayo de incorporación de timidina tritiada para evaluar proliferación celular en linfocitos B de ratones C57BL/6J salvajes, usando un ARN de silenciamiento control (scr-siRNA) y un ARN de silenciamiento dirigido contra *Iqgap1* (*Iqgap1*-siRNA). cpm (Cuentas por minuto). La altura de la barra representa la media de 6 réplicas y se grafica la barra de DE. *** $p < 0,001$. Prueba estadística t de student.

5.6.3. Evaluación de citoquinas por qPCR.

Una de las funciones más importantes de los linfocitos B es su capacidad de producir citoquinas, lo cual permite modular la respuesta local inmune. Particularmente en la patología de la EM, hay un desequilibrio en la producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, que modifican el ambiente inflamatorio y promueven la activación de macrófagos y linfocitos T. Se reportó que los linfocitos B aislados de sangre de pacientes con EM exhiben un perfil anormal de citoquinas proinflamatorias, con niveles elevados de GM-CSF, IL-6 y TNF α , y menores cantidades de la citoquina antiinflamatoria IL-10, en comparación con dadores sanos (Häusser-Kinzel & Weber, 2019; Jain & Yong, 2022; R. Li & Bar-Or, 2019).

Por lo tanto, una vez comprobado que era posible silenciar el gen *Iqgap1* en linfocitos B en cultivo, y teniendo en cuenta lo descripto previamente, se evaluó la expresión de los ARNm que codifican para las citoquinas proinflamatorias (Csf2, TNF α e IL-6) y antiinflamatoria (IL-10) al silenciar *Iqgap1* por qPCR (**Figura 40**).

Luego de silenciar *Iqgap1* con el siRNA específico, se observó una disminución en la expresión del ARNm de la citoquina proinflamatoria *Csf2* con una expresión relativa media de $0,67 \pm 0,12$ respecto de los linfocitos B transfectados con el scr-siRNA $1 \pm 0,07$, diferencia que resultó estadísticamente significativa ($p = 0,0079$, prueba t de student). Por su parte, la expresión relativa media de la citoquina antiinflamatoria IL-10 fue de $0,53 \pm 0,26$ frente a la expresión de la condición control $1 \pm 0,21$, diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0323$, prueba t de student). No se observaron cambios significativos en la expresión relativa de $TNF\alpha$ ($p > 0,05$, prueba de Mann Whitney) ni IL-6 ($p > 0,05$, prueba t de student).

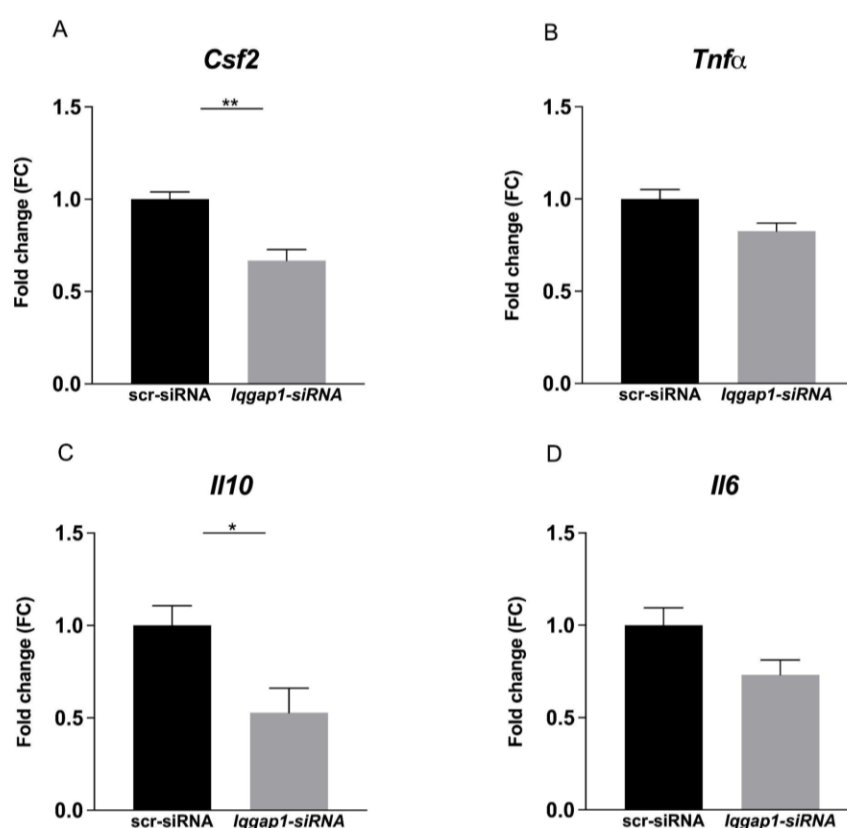


Figura 40: Gráfico de barras comparando la expresión relativa de distintas citoquinas. Ensayo de *qPCR* para evaluar la expresión relativa de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en linfocitos B aislados de ratón C57BL/6J salvaje, usando un ARN de silenciamiento control (scr-siRNA) y un ARN de silenciamiento dirigido contra *Iqgap1* (*Iqgap1*-siRNA). **A)** *Csf2*; **B)** *Tnfα*; **C)** *Il10*; **D)** *Il6*. La altura de la barra representa la media de 4 réplicas y se grafica la barra de DE. Prueba estadística t de student en el caso de *Csf2*, *Il10* e *Il6*. Prueba estadística de Mann Whitney en el caso de *Tnfα*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5.6.4. Evaluación de citoquinas por ELISA

Con el objetivo de evaluar si el efecto del silenciamiento a nivel de ARNm tenía alguna consecuencia a nivel proteico, se evaluó la secreción de citoquinas en el sobrenadante del cultivo luego de silenciar el

gen *Iqgap1* en linfocitos B. Si bien se evaluaron las mismas citoquinas (Csf2, TNF α , IL-6 e IL-10) que se habían analizado con anterioridad por *qPCR*, la cuantificación de Csf2 e IL-10 resultó ser indetectable en el sobrenadante de cultivo. Por otro lado, y al igual que en la *qPCR*, no se detectaron diferencias significativas en la cuantificación de TNF α e IL-6 (en ambos casos $p > 0,05$, prueba de Mann Whitney) (Figura 41).

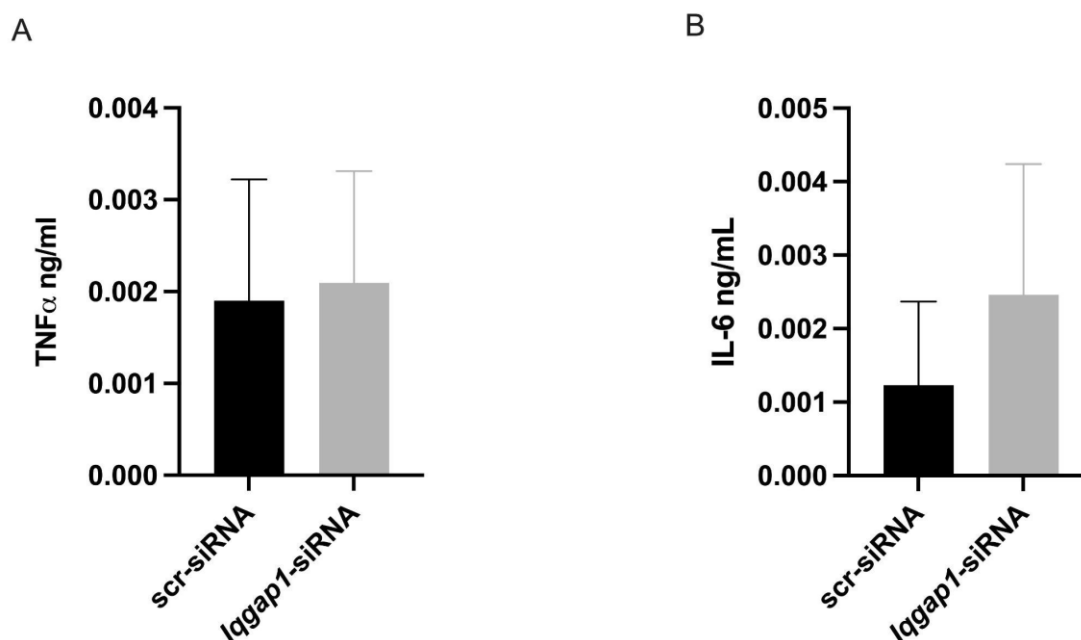


Figura 41: Gráfico de barras comparando la secreción de las citoquinas TNF α e IL-6. Ensayo de ELISA para determinar la cuantificación de citoquinas proinflamatorias **A)** TNF α ; **B)** IL-6 en linfocitos B aislados de ratón C57BL/6J salvaje, usando un ARN de silenciamiento control (scr-siRNA) y un ARN de silenciamiento dirigido contra *Iqgap1* (*Iqgap1*-siRNA). La altura de la barra representa la media de 3 réplicas y se grafica la barra de DE. $p > 0,05$, Prueba estadística de Mann Whitney.

5.6.5. Silenciamiento de *Iqgap1* en linfocitos B y posterior cocultivo con linfocitos T

La presentación antigénica y la coestimulación son funciones cruciales en la interacción de los linfocitos B con los linfocitos T. Luego del reconocimiento y procesamiento de un antígeno por parte de un linfocito B, éste será presentado en la superficie de la célula B en el contexto de las moléculas MHC de clase II a los linfocitos T CD4⁺, los cuales serán activados. A su vez, tanto en pacientes con EM como en el modelo animal de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE, por sus siglas en inglés), se demostró que los linfocitos B producen daño al SNC de forma indirecta, a través de la interacción física con las células T, induciendo la expansión de linfocitos T autorreactivos (Baecher-Allan et al., 2018; Fraussen et al., 2016).

Una vez determinado el efecto del silenciamiento de *Iqgap1* en linfocitos B en forma aislada y teniendo en cuenta la información descrita previamente, se prosiguió a evaluar el efecto del silenciamiento de

Iqgap1 en la interacción con los linfocitos T. A tal fin, se cocultivaron linfocitos B silenciados con la totalidad de linfocitos T. En una segunda etapa, los linfocitos T fueron diferenciados en Th1 y Th17 y se repitió el ensayo de cocultivo.

5.6.5.1. Proliferación celular

Dado que en el inciso 6.4 se describió que los linfocitos B en cultivo con *Iqgap1* silenciado aumentaban su proliferación respecto de los linfocitos B sin silenciar, se estudió el efecto de la mencionada proliferación en cocultivo con linfocitos T provenientes de ratones 2D2 u OTII. Si bien el racional detrás de la elección de estos ratones fue detallado en la sección 11.1 de la Metodología, a modo de recordatorio cabe destacar que estos ratones poseen un receptor TCR re arreglado a fin de poder reconocer el péptido MOG₃₅₋₅₅ y OVA₃₂₃₋₃₃₉ respectivamente y son ampliamente utilizados para el estudio de la biología de los linfocitos T.

Por lo tanto, luego de silenciar *Iqgap1* en linfocitos B y cocultivarlos con los linfocitos T, se evaluó la proliferación celular de los linfocitos T (población CD4⁺) por citometría de flujo mediante la detección del marcador de proliferación celular Ki67⁺, primero se seleccionó la población CD3⁺ (marcador correspondiente a la población total de linfocitos T) y dentro de la misma se seleccionó la población CD4⁺, para finalmente seleccionar la población de células Ki67⁺. Luego de esta estrategia de *gating* CD3⁺CD4⁺Ki67⁺, se determinó que con respecto a los linfocitos T provenientes de los ratones 2D2, al silenciar el gen *Iqgap1* el porcentaje de proliferación fue $8,26 \pm 2,49$ % mientras que al usar el ARN de silenciamiento control scr-siRNA, el porcentaje de proliferación fue de $3,88 \pm 1,06$ %. A su vez, y de forma similar, en los linfocitos T provenientes de los ratones OTII, se estimó un porcentaje de proliferación del $43,06 \pm 6,06$ % al silenciar el gen de interés y $34,88 \pm 3,23$ % cuando se utilizó el ARN de silenciamiento control. Se observó un aumento significativo de la proliferación tanto en linfocitos T provenientes de ratones 2D2 ($p = 0,0177$, prueba t de student), como de linfocitos T provenientes de ratones OTII ($p = 0,0287$, prueba t de student) en cocultivo con los linfocitos B silenciados con *Iqgap1*-siRNA comparados con los linfocitos B sin silenciar (**Figura 42**).

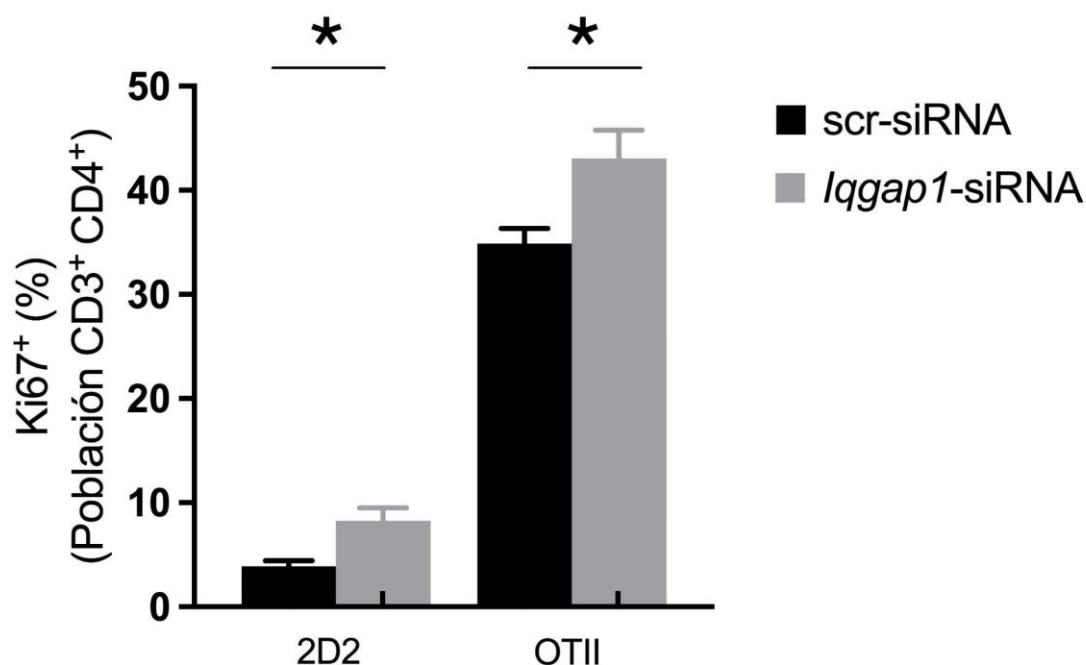


Figura 42: Gráfico de barras comparando la proliferación celular de los linfocitos T. Evaluación de proliferación celular de linfocitos T, evaluado según expresión del marcador Ki67 por citometría de flujo en cocultivo de linfocitos T provenientes de ratones 2D2 u OTII, y linfocitos B silenciados usando un ARN de silenciamiento control (scr-siRNA) o un ARN de silenciamiento dirigido contra *Iqgap1* (*Iqgap1*-siRNA). La altura de la barra representa la media de 5 réplicas y se grafica la barra de DE. * $p < 0,05$; Prueba estadística t de student.

5.6.5.2. Evaluación de marcador de activación

Teniendo en cuenta que al silenciar *Iqgap1* en linfocitos B se observó un aumento en la proliferación tanto de linfocitos B como T, se decidió evaluar el marcador de activación de linfocitos T, CD44, por citometría de flujo. La glicoproteína de membrana de tipo I, CD44, es expresada en distintos tipos celulares y es uno de los marcadores de activación de linfocitos T más utilizados. Luego del reconocimiento de un antígeno, los linfocitos T aumentan rápidamente la expresión de CD44 y dicha expresión puede mantenerse incluso en los linfocitos T de memoria (Budd et al., 1987; Schumann et al., 2015).

Considerando lo anteriormente mencionado, se utilizó como estrategia de *gating*, la selección de los linfocitos T ($CD3^+CD4^+CD44^+$). Con respecto a los linfocitos T provenientes de los ratones 2D2, al silenciar el gen *Iqgap1* el porcentaje de activación estimado fue del $13,45 \pm 4,04$ % mientras que al utilizar el ARN de silenciamiento control, el porcentaje de proliferación fue de $6,26 \pm 1,79$ %. Al mismo tiempo, en los linfocitos T provenientes de los ratones OTII, se determinó un porcentaje de proliferación del $64,80 \pm 4,55$ al silenciar el gen blanco y $53,64 \pm 2,10$ al utilizar scr-siRNA. A partir de la selección se determinó que el aumento en la proliferación celular de los linfocitos T ($CD3^+CD4^+Ki67^+$), se vio

acompañado con un aumento del marcador de activación de linfocitos T CD44 tanto en linfocitos T provenientes de ratones 2D2 como en linfocitos T provenientes de ratones OTII ($p = 0,0174$ y $p = 0,0011$, prueba t de student, respectivamente) cuando se los cocultivaba con los linfocitos B silenciados con *Iqgap1*-siRNA comparados con los linfocitos B sin silenciar (**Figura 43**).

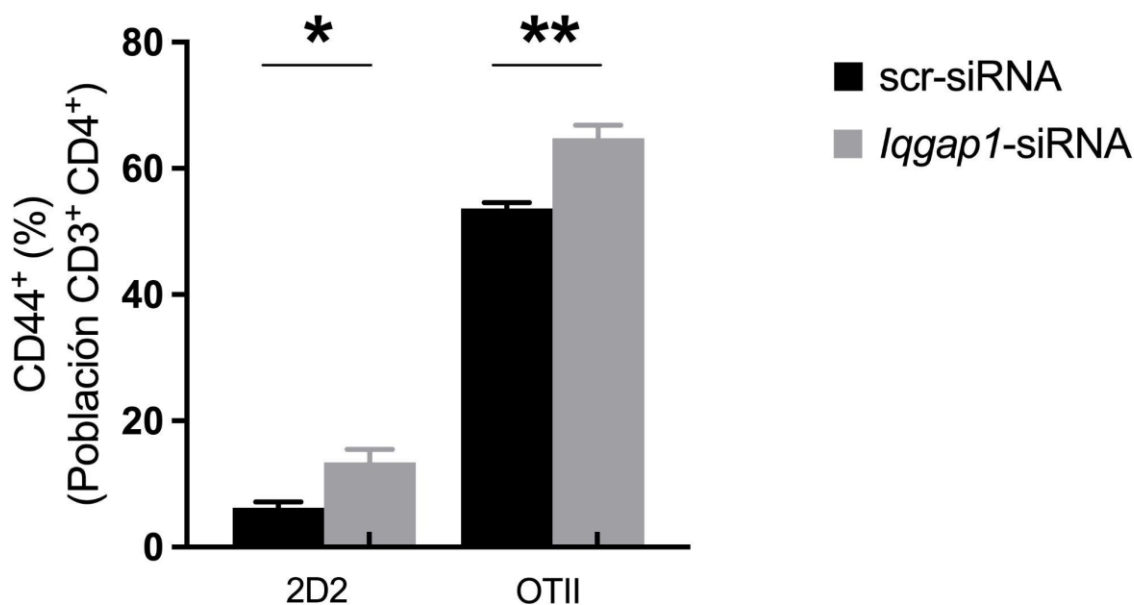


Figura 43: Gráfico de barras comparando la activación celular de los linfocitos T. Evaluación de marcadores de activación celular de linfocitos T, evaluado según expresión del marcador CD44 por citometría de flujo en cocultivo de linfocitos T provenientes de ratones 2D2 u OTII, y linfocitos B silenciados usando un ARN de silenciamiento control (scr-siRNA) o un ARN de silenciamiento dirigido contra *Iqgap1* (*Iqgap1*-siRNA). La altura de la barra representa la media de 5 réplicas y se grafica la barra de DE. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Prueba estadística t de student.

5.6.5.3. Efecto del silenciamiento de *Iqgap1* sobre la presentación antigénica

Dado que silenciar *Iqgap1* en los linfocitos B conduce a una mayor proliferación, tanto de los linfocitos B como T, y que a su vez este aumento está acompañado de un aumento en el marcador de activación CD44, y, por otro lado, sabiendo que los linfocitos B pueden actuar como células presentadoras de antígenos, se evaluó cuál era el efecto del silenciamiento de *Iqgap1* sobre la presentación antigénica de los linfocitos B.

Inicialmente para evaluar dicho efecto, se silenció *Iqgap1* en células B de ratones salvajes y luego se cocultivaron estas células con linfocitos T provenientes de ratones transgénicos (2D2 u OTII) durante 3 días. Posteriormente, mediante citometría de flujo, se determinó el porcentaje de linfocitos B que expresaban los marcadores CD80, CD86 y MHCII, que se encuentran en la superficie de las CPA. Como estrategia de *gating*, se seleccionaron las células $CD19^+CD80^+$, $CD19^+CD86^+$ y $CD19^+MHCII^+$. Al silenciar el gen *Iqgap1* en células B y su posterior cocultivo con linfocitos T de ratones 2D2, el

porcentaje de células $CD19^+CD80^+$ fue del $1,05 \pm 0,11$ mientras que al usar el ARN de silenciamiento control, el porcentaje de la población de células $CD19^+CD80^+$ resultó de $0,74 \pm 0,24$, una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0338$, prueba t de student) (**Figura 44 A**). No se observaron diferencias significativas en los demás marcadores evaluados en ratones 2D2 ni OTII ($p > 0,05$, prueba t de student) (**Figura 44 B y C**).

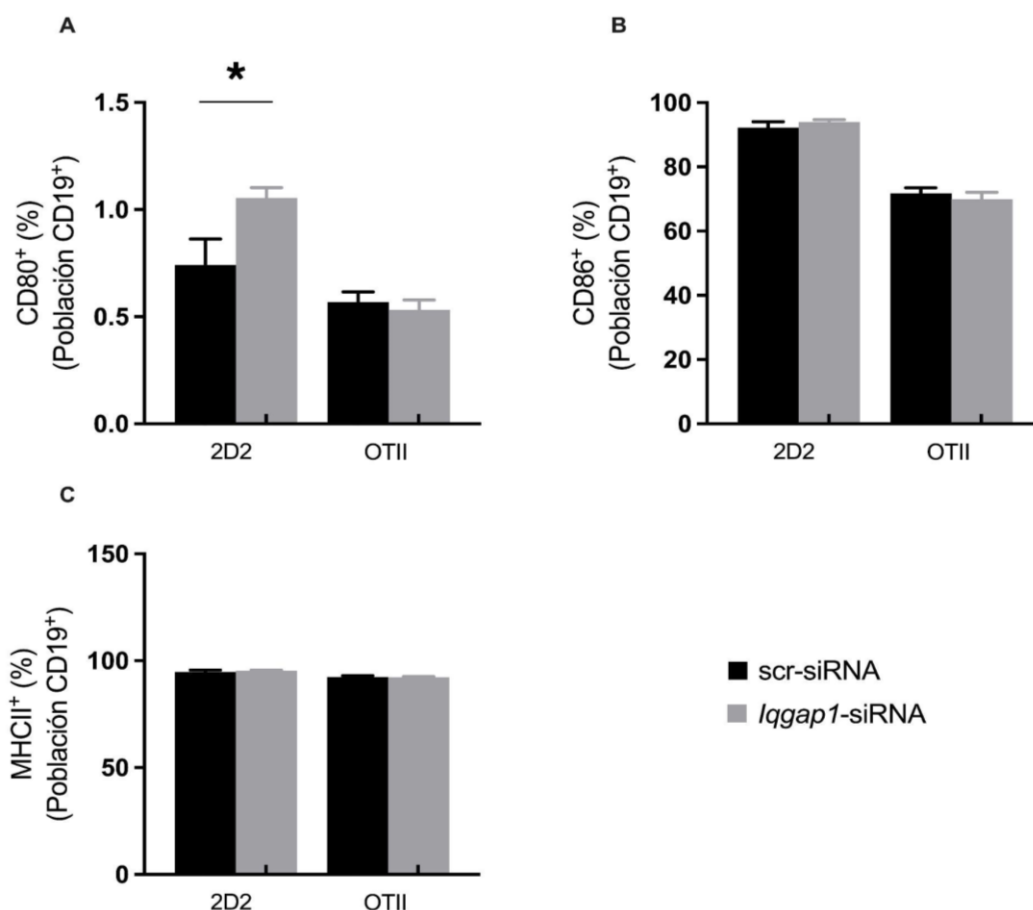


Figura 44: Gráfico de barras comparando el porcentaje de los marcadores de activación de linfocitos B. Evaluación de marcadores de células presentadoras de antígenos por citometría de flujo, en linfocitos B de ratones C57BL/6J salvajes, evaluado según expresión de los marcadores CD80, CD86 y MHCII, por citometría de flujo en cocultivo de linfocitos T provenientes de ratones 2D2 u OTII, y linfocitos B silenciados usando un ARN de silenciamiento control (scr-siRNA) o un ARN de silenciamiento dirigido contra *Iqgap1* (*Iqgap1*-siRNA). **A)** CD80; **B)** CD86; **C)** MHCII. La altura de la barra representa la media de 5 réplicas y se grafica la barra de DE. * $p < 0,05$. Prueba estadística t de student.

5.6.5.4. Evaluación de factores de transcripción de linfocitos T por PCR cuantitativa

Dado que el silenciamiento de *Iqgap1* tuvo un impacto significativo en la proliferación y activación de los linfocitos T, pero que dicho efecto no estuvo involucrado con la presentación antigénica, se decidió determinar si había algún subtipo de linfocito T que estuviera siendo mayormente activado. Las células Th1 y Th17 son los linfocitos T efectores más importantes en la patogenia de la enfermedad. Los linfocitos $CD4^+$ Th1 se caracterizan por la expresión del factor de transcripción T-bet y la secreción de

IFN γ y están asociados con la inmunidad celular (Chitnis, 2007; Dhaiban et al., 2021). Por su parte, los linfocitos CD4⁺ Th17 son caracterizados por la expresión del factor de transcripción ROR γ T y la secreción de la citoquina IL-17 y son comúnmente asociados a la inmunidad contra los patógenos extracelulares (Goverman, 2009; Moser et al., 2020). La interacción entre los linfocitos B y los T, influye en la polarización de los linfocitos T CD4⁺ Th1/Th17. Por otro lado, los linfocitos T reguladores (T_{reg}) se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FoxP3 y tiene un rol importante en la supresión de la respuesta inmune. Sin embargo, según estudios tanto en ratones como en humanos, la población de células T_{reg} puede reprogramarse en una nueva población patogénica IL-17⁺FoxP3⁺, fenotípica y funcionalmente similar a los linfocitos Th17, y que se describió involucrada en patologías como la artritis autoinmune (Du et al., 2014; Komatsu et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se silenció *Iqgap1* en células B de ratones salvajes para luego cultivar estas células con linfocitos T provenientes de ratones 2D2 que previamente habían sido diferenciados a los linajes Th1 y Th17. Finalmente, mediante *qPCR* se determinó la expresión relativa de los ARNm que codifican para los factores de transcripción *Rorc* (ROR γ T en humanos), *Tbx21* (T-bet en humanos) y *Foxp3* (FoxP3 en humanos). En la población de linfocitos Th0 (linfocitos T sin diferenciar) no se detectaron diferencias significativas para ninguno de los marcadores evaluados ($p > 0,05$, prueba t de student). Por otro lado, como era de esperar, en la población Th1 se observó una mayor expresión del factor de transcripción *Tbx21*. El incremento en la expresión relativa media para la condición de silenciamiento de *Iqgap1*, fue $3,22 \pm 0,18$, mientras que, para la condición sin silenciamiento, fue $2,71 \pm 0,19$. Específicamente, al silenciar *Iqgap1*, la expresión de *Tbx21* fue significativamente mayor en comparación a la condición sin silenciar *Iqgap1* ($p = 0,0076$, prueba t de student) (**Figura 45 A**).

Por su parte, en la población Th17 se observó una alta expresión tanto del factor de transcripción *Rorc* como de *Foxp3*. En primera instancia, el cambio en la expresión relativa media para la condición de silenciamiento de *Iqgap1*, fue $120,3 \pm 5,0$; mientras que para la condición utilizando el ARN de silenciamiento control fue de $96,36 \pm 14,69$. En este caso, al silenciar el gen *Iqgap1*, se detectaron diferencias significativas en la expresión del marcador *Rorc* comparado a la condición sin silenciar el gen diana ($p = 0,0215$, prueba t de student) (**Figura 45 B**). Finalmente, con respecto al factor de transcripción *Foxp3*, se observó un cambio en la expresión relativa media de $19,94 \pm 2,21$ al silenciar *Iqgap1* frente a un $16,15 \pm 0,96$ cuando no se silenció el gen de interés. En este contexto, su expresión fue significativamente mayor al silenciar *Iqgap1*, comparado a la condición sin silenciamiento ($p = 0,0199$, prueba t de student). (**Figura 45 C**).

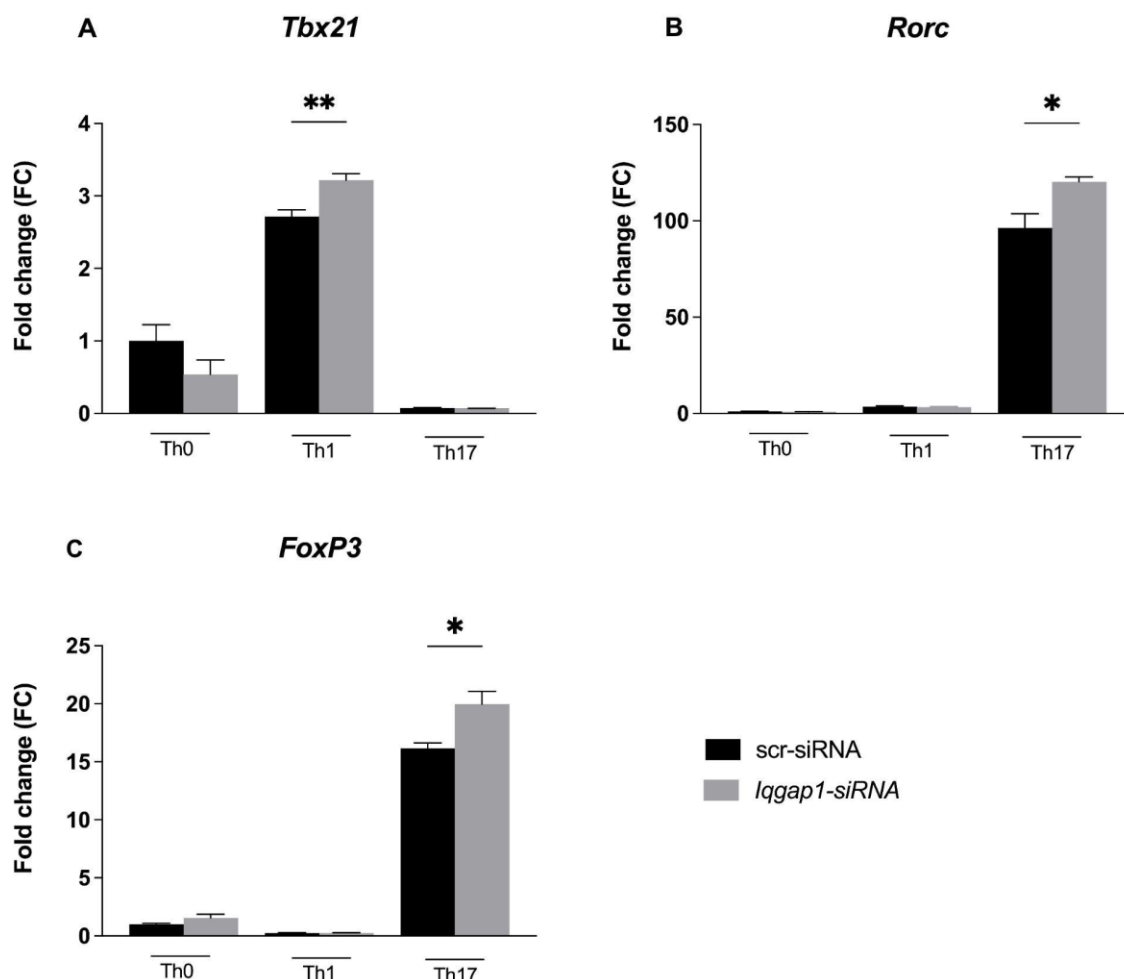


Figura 45: Gráfico de barras comparando el nivel de expresión de los ARNm de factores de transcripción de linfocitos T bajo condiciones de diferenciación. Evaluación de factores de transcripción (*Tbx21*, *Rorc* y *Foxp3*) de linfocitos T por *qPCR*, en cocultivo de linfocitos T provenientes de ratones 2D2 diferenciados en los distintos linajes y linfocitos B silenciados usando un ARN de silenciamiento control (scr-siRNA) o un ARN de silenciamiento dirigido contra *Iqgap1* (*Iqgap1*-siRNA). **A) *Tbx21*; B) *Rorc*; C) *Foxp3*.** La altura de la barra representa la media de 4 réplicas y se grafica la barra de DE. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Prueba estadística t de student.

5.6.5.5. Análisis de expresión de citoquinas de linfocitos T por *qPCR*

Una vez que se determinó cuál era el efecto de silenciar el gen *Iqgap1* en linfocitos B y su efecto sobre la expresión de los factores de transcripción en los linfocitos T, se evaluó por *qPCR*, la expresión de los ARNm que codifican para citoquinas proinflamatorias (INF γ , IL-17 y CSF2) y la citoquina antiinflamatoria (IL-10) que son secretadas por los linfocitos T y B y son importantes para su funcionalidad. Al evaluar por PCR en tiempo real en un cultivo, los valores de los ARNm de las citoquinas evaluadas son totales, provienen tanto de linfocitos B como de linfocitos T.

Se evaluó el efecto del silenciamiento de *Iqgap1* sobre diferentes poblaciones de linfocitos T. A tal fin, como se describió con anterioridad, se partió de un nuevo *pool* de linfocitos T sin diferenciar (Th0) de ratones 2D2, y en pocillos independientes se realizó la diferenciación a linfocitos Th1 o Th17. De este modo se lograron cultivos de las tres poblaciones de linfocitos.

Particularmente en la población de linfocitos B cocultivados con los linfocitos Th17, la expresión relativa media de la IL-17 fue mayor al silenciar el gen *Iqgap1*. En este sentido se determinó que el cambio en la expresión relativa media resultó de $1,7 \pm 0,29$ cuando se silenció el gen *Iqgap1*, mientras que al utilizar el ARN de silenciamiento control la expresión relativa media resultó de $1 \pm 0,22$. Dicho aumento en la expresión del ARNm de IL-17 resultó significativo ($p = 0,0088$, prueba t de student) ver **figura 46 A**. Por su parte y particularmente en la población de linfocitos B cocultivados con los linfocitos diferenciados a Th1, la expresión relativa media de la IL-10 aumentó al silenciar el gen *Iqgap1*, siendo del $31,76 \pm 3,14$, mientras que al utilizar el ARN de silenciamiento control fue de $23,27 \pm 1,73$. La expresión de IL-10 se encontró aumentada significativamente al silenciar el gen *Iqgap1* comparado con la condición control ($p = 0,0032$, prueba t de student) ver **figura 46 B**. Finalmente, no se observaron diferencias significativas para las citoquinas IFN γ y CSF2 en ninguna de las poblaciones celulares evaluadas (en todos los casos $p > 0,05$, prueba t de student) (**Figura 46 C y D**).

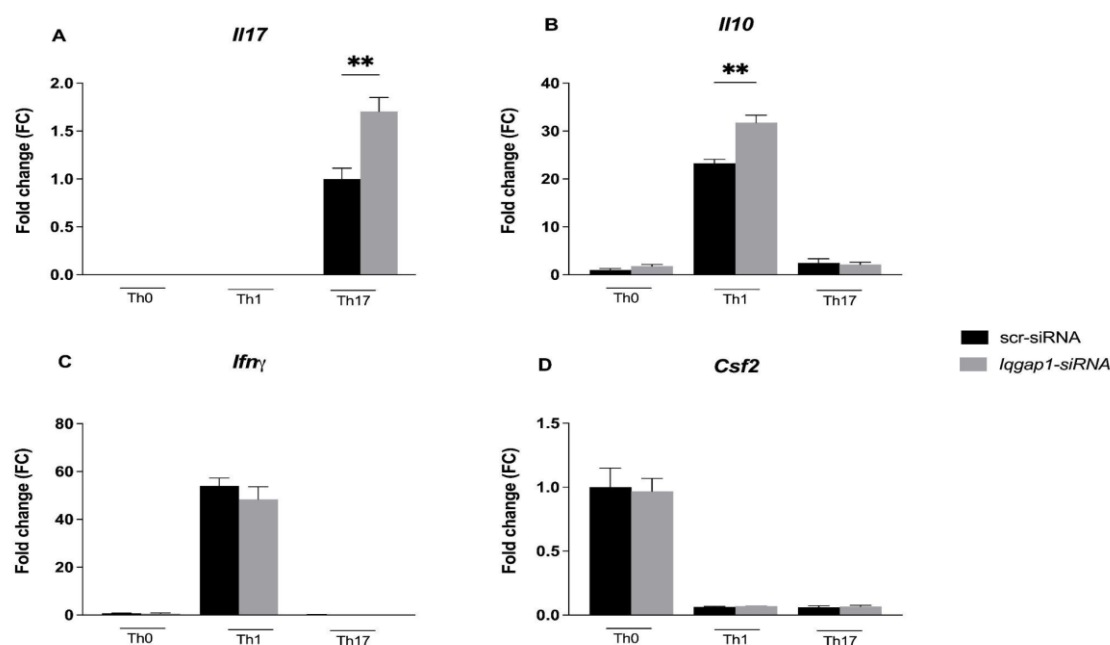


Figura 46: Gráfico de barras comparando el nivel de expresión de los ARNm de las citoquinas evaluadas en diferentes poblaciones de linfocitos T. Evaluación de citoquinas (*Il17*, *Il10*, *Ifn γ* y *Csf2*) por *qPCR*, en linfocitos T provenientes de ratones 2D2 en cocultivo con linfocitos B silenciados usando un ARN de silenciamiento control (scr-siRNA) o un ARN de silenciamiento dirigido contra *Iqgap1* (*Iqgap1*-siRNA). La altura de la barra representa la media de 4 réplicas y se grafica la barra de DE. **A)** *Il17*; **B)** *Il10*; **C)** *Ifn γ* ; **D)** *Csf2*. * $p < 0,01$. Prueba estadística t de student

6. Discusión

Discusión

Durante varios años, se exploró la posibilidad de una conexión entre el virus Epstein Barr (EBV) y la esclerosis múltiple (EM). Una conexión que se basa en gran medida en la evidencia recopilada en las últimas dos décadas a través de estudios epidemiológicos, serológicos y virales realizados en diversos países y que sustentan el concepto de que el EBV desempeña un papel en el origen de la enfermedad (Ascherio & Munger, 2016; Larsen et al., 1985; Levin et al., 2005b; Mohammadzamani et al., 2024; Ruprecht, 2020; Soldan & Lieberman, 2023). En los últimos dos años, los hallazgos cobran mayor relevancia, impulsados principalmente por dos investigaciones clave: una que estableció una relación causal entre el EBV y la EM y otra que identificó un posible mecanismo para dicha asociación. En el primer estudio, Bjornevik y col., llevaron a cabo un análisis longitudinal durante 20 años, donde demostraron que los individuos EBV positivos tenían mayor probabilidad de desarrollar EM, mientras que el riesgo no aumentaba con la infección de otros virus que se transmitían a través de la misma vía, como el CMV (Bjornevik et al., 2022a). Por su parte, el trabajo realizado por Lanz y col., demostró un mecanismo de mimica molecular entre el antígeno EBNA1 y la molécula de adhesión GlialCAM (Lanz et al., 2022), este descubrimiento proveería el enlace de asociación entre la EM y el EBV. Más allá de la clara evidencia que relaciona al EBV con la EM, el principal desafío radica en demostrar que un virus ubicuo como el EBV, que infecta a más del 90 % de la población mundial y que en una amplia mayoría de los casos produce una infección benigna inicial y luego permanece de por vida en forma latente, a su vez, posee la capacidad de actuar como un agente desencadenante, o un factor de riesgo, en el desarrollo de una enfermedad autoinmune como la esclerosis múltiple. Por lo antes expuesto, resulta de sumo interés determinar los mecanismos específicos a través de los cuales el EBV contribuye al desarrollo de la EM. En este estudio prospectivo, realizado entre los años 2018 y 2023, se analizó la serología, carga viral del EBV y se caracterizaron las variantes de la secuencia de la región promotora y codificante del gen *BCRF1* que codifica para el antígeno vIL10 y de la región 3' terminal del gen *BYRF1* que codifica para el antígeno viral EBNA2, tanto en pacientes con esclerosis múltiple como en controles sanos en nuestra región geográfica. En paralelo, dado que los linfocitos B de memoria son el principal reservorio del virus en estado de latencia y que el EBV tiene la capacidad de transformar dichas células (Mrozek-Gorska et al., 2019b), y a su vez teniendo en cuenta que los linfocitos B representan una de las principales células efectoras en la patogénesis de la EM, en este trabajo de tesis se estudiaron los cambios transcripcionales asociados a la infección del EBV en linfocitos B de pacientes con EM. Finalmente, y a partir de los resultados obtenidos, se realizaron estudios *in vitro* a fin de determinar el efecto de la modulación transcripcional observada. De esta manera, este trabajo tuvo como objetivo general, expandir el conocimiento acerca del papel del EBV en la patogénesis de la esclerosis múltiple.

Teniendo en cuenta la evidencia seroepidemiológica disponible hasta la fecha en la literatura especializada, que vincula al EBV con la EM y que sugiere una mayor frecuencia de anticuerpos anti-EBV en pacientes en comparación con los controles, en un primer paso se evaluó el porcentaje de individuos seropositivos dentro de la cohorte de estudio. En nuestro trabajo el 100 % de los pacientes con EM y el 100 % de los individuos del grupo control presentaron anticuerpos anti-VCA y/o anti-EBNA1, y ninguno fue negativo para ambos antígenos. Esta observación resultó diferente a lo previamente reportado en otras regiones geográficas, principalmente en países desarrollados, donde se determinó que la prevalencia de la infección por el EBV en pacientes con EM es mayor que en los controles. Según distintos estudios y un meta-análisis realizado en 2013 por Almohmeed y col., entre el 98 y 100 % de los pacientes con EM fueron seropositivos para el EBV, mientras que sólo el 94 % de los controles lo fueron (Almohmeed et al., 2013; Dobson et al., 2017; Goodin, 2009; Pakpoor et al., 2013, Ascherio & Munger, 2007; Bjornevik et al., 2022a).

Una posible explicación de esta disparidad de resultados podría ser que la edad de contagio con EBV en países en vías de desarrollo como Argentina, es a una muy temprana edad, debido principalmente al hacinamiento en las viviendas de las poblaciones más vulnerables, lo que resulta en un contacto cercano entre los infantes y el intercambio de secreciones orales al compartir biberones, utensilios y juguetes. Aproximadamente el 90 % de la población argentina presenta serología positiva para EBV a los 3 años (Chabay et al., 2016). Coincidente con lo que, visto en Argentina, en países asiáticos como Taiwán, China y Tailandia, la seroprevalencia es del 90 % a temprana edad, entre los 7 y 8 años (Winter et al., 2020.; Ye et al., 2023). Por su parte, según los estudios realizados en Europa y Norteamérica, la seroprevalencia para el EBV aumenta en la adolescencia o adultez temprana y alcanza el 90 % a los 22 años (Dowd et al., 2013; Fourcade et al., 2017; Kuri et al., 2020). Cabe aclarar, que, en los trabajos mencionados previamente y realizados en países desarrollados, las poblaciones son heterogéneas en edad y por lo tanto es comparable. Por su parte, en el metaanálisis publicado por Almohmeed y col, se incluyeron 7 estudios pediátricos y 32 estudios con adultos (Almohmeed et al., 2013b). En el trabajo publicado por Bjornevik y col., donde siguió una cohorte de dadores sanos durante 20 años, con el fin de determinar el momento del inicio de la EM y si este se relacionaba con la infección por el EBV, el 40 % de la cohorte en estudio tenía menos de 26 años y la mayor proporción de individuos tenía entre 15 a 20 años al inicio del estudio (Bjornevik et al., 2022a).

Una hipótesis alternativa para las diferencias observadas previamente mencionadas podría ser que la seroprevalencia de una infección depende de la sensibilidad y especificidad de los métodos aplicados para la detección del virus. Idealmente cuando se detecta un individuo seronegativo para el EBV se recomienda realizar la detección utilizando otra técnica independiente de forma tal de corroborar el resultado, por ejemplo, combinar las técnicas de ELISA e inmunofluorescencia (Abrahamyan et al., 2020; Pakpoor, Disanto, et al., 2013b). Por otro lado, se recomienda ampliamente, determinar por

ELISA más de una serología anti-EBV, debido a que se reportaron diferencias en la seropositividad al detectar un único anticuerpo *vs* detectando 2 o más anticuerpos (Dobson et al., 2017; Kuhle et al., 2015). Esto se debería a que aproximadamente el 6 % de los individuos no desarrollan anticuerpos anti-EBNA1, mientras que los anticuerpos anti-VCA son mayormente detectables en individuos con infecciones pasadas (Ruprecht, 2020). En consecuencia, cuando sólo se utilizó un método de detección o contra un sólo antígeno viral, como en el estudio reportado por Ingram y col, el resultado de seropositividad podría estar sesgado por la presencia de resultados falsos negativos (Ingram et al., 2010).

Siendo que la evidencia actual que relaciona a la EM y el EBV está soportada principalmente en el mayor título de anticuerpos específicos anti-EBV en pacientes comparado con los individuos del grupo control (Bar-Or et al., 2020), se comparó el título de anticuerpos de los individuos de la cohorte en estudio. En forma consistente con lo reportado en otras regiones geográficas, principalmente en Europa y América del Norte (Ascherio et al., 2001; Bjornevik et al., 2022b; Comabella et al., 2024; Lünemann et al., 2010; K. Munger et al., 2011; Ruprecht et al., 2014), en la cohorte estudiada en este trabajo de Tesis también se observaron títulos significativamente mayores de anticuerpos de tipo IgG anti-VCA y anti-EBNA1 en pacientes con EM. Si bien el resultado fue esperable y confirmó lo reportado en otras regiones, cabe resaltar que, a nuestro mejor entender, es el primer estudio de casos y controles que estudia la relación de la patología con el título de anticuerpos en nuestro país. Si bien al día de la fecha no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual los individuos con EM presentan mayores títulos de anticuerpos anti-EBV, es válido suponer que presentan algún tipo de alteración en el montaje de la respuesta inmune frente al virus (Vietzen et al., 2023). En este sentido, Läderach y Münz postularon que la predisposición genética y los factores ambientales podrían impedir el eficiente control inmunológico de las células B infectadas con EBV y a su vez, impulsar la estimulación de las células T autoinmunes así como también la inflamación del SNC (Läderach & Münz, 2022). Por su parte, y en línea con dicha postura, otros trabajos previos reportaron una respuesta celular alterada con una alta frecuencia de linfocitos T CD4⁺ específicos contra EBNA1 y linfocitos T CD8⁺ específicos contra EBNA1 secretores de INF γ , comparada con individuos controles o con otras enfermedades neurológicas (Angelini et al., 2013; Jilek et al., 2008; Lünemann et al., 2006).

En forma similar a lo que se describió para otras enfermedades autoinmunes, la esclerosis múltiple presenta una mayor incidencia en mujeres, con una relación de 3:1 según datos de estudios previos (Gold et al., 2019; Jackson & Short, 2018; Ysrraelit & Correale, 2019). En línea con esta apreciación, otros estudios sugirieron que el aumento en la incidencia podría deberse principalmente al efecto de las hormonas gonadales, entre otras diferencias genéticas devenidas de los cromosomas sexuales (Coyle, 2021; Harbo et al., 2013; R. R. Voskuhl et al., 2020). Atendiendo al mencionado interrogante, se evaluaron las posibles diferencias en el título de anticuerpos IgG anti-VCA y anti-EBNA1 en nuestra cohorte de pacientes y controles de sexo cromosómico hombre y mujer. En ninguno de los casos

(anticuerpos anti-VCA y anti-EBNA1) se observaron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con EM respecto de los casos control, independientemente del sexo cromosómico de los individuos. Por el contrario, se realizaron trabajos en Asia donde se reportaron diferencias significativas entre los grupos evaluados (hombres *vs* mujeres) (Al-Temaimi et al., 2015; Mouhieddine et al., 2015). Respecto a los anticuerpos anti-VCA, un trabajo reportó que en el Líbano las mujeres con EM presentan mayores títulos de anticuerpos IgG anti-VCA comparado con los hombres con EM (Mouhieddine et al., 2015). Por su parte, en cuanto a los anticuerpos anti-EBNA1, un reporte de Kuwait demostró que las mujeres con EM presentaban menores títulos de anticuerpos IgG anti-EBNA1 respecto de los hombres (Al-Temaimi et al., 2015). Por otro lado, en estudios realizados en Estados Unidos y Alemania, donde se evaluó la serología para EBV en cohortes de individuos sanos, se determinó que las mujeres presentaron mayores títulos de anticuerpos anti-VCA comparado con los hombres durante la infancia y la adolescencia (Ford & Stowe, 2013; Jackson & Short, 2018). Inclusive, dicha diferencia persiste durante la adultez, donde las mujeres EBV seropositivas tienen mayores títulos de anticuerpos anti-EBV comparado con los hombres EBV seropositivos (H. J. Wagner et al., 1994). Contrario a lo previamente publicado y concordante con nuestros resultados, en un estudio longitudinal llevado a cabo en España durante 2 años, se determinó que no hay diferencias significativas en los títulos de anticuerpos IgG anti-VCA ni anti-EBNA1 entre individuos de sexo cromosómico hombre y mujer (Domínguez-Mozo et al., 2022). La disparidad de los resultados podría explicarse con la teoría de que los estrógenos promueven una respuesta inmune humoral más eficiente, comparado con el rol inmunosupresor de los andrógenos (Angeloni et al., 2021; R. Voskuhl, 2011). Si bien este enfoque excede el alcance del presente trabajo de Tesis, resultaría de interés estudiar en un futuro el impacto de las hormonas sexuales sobre la respuesta inmune frente al EBV en casos y controles de nuestra región geográfica.

La EM es una afección que se caracteriza por la heterogeneidad de los síntomas desarrollados y el curso de la enfermedad, que se divide en 4 fenotipos dependiendo de la manifestación clínica del paciente: Síndrome desmielinizante aislado (SDA), Esclerosis múltiple remitente-recurrente (EMRR), Esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP) y Esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP) (Engelhardt et al., 2022). SDA se refiere al primer episodio de inflamación desmielinizante en el SNC que podría convertirse en EM si progresa la actividad. RR es el tipo de EM más común que se caracteriza por la desmejora de la función neurológica que es acompañado por nuevos síntomas o el empeoramiento de los síntomas ya existentes, que luego se recupera de forma total o parcial sin aparente progresión de la enfermedad. PP y SP son las formas progresivas de la enfermedad, PP es la desmejora constante de la función neurológica desde el inicio de los síntomas sin recaídas ni remisiones iniciales y SP comienza con un cuadro de remisiones y recaídas, que luego se convierte en una desmejora progresiva (Klineova & Lublin, 2018). Las características y los mecanismos patogénicos y la respuesta terapéutica de los pacientes a los distintos tratamientos demuestran que la neuro e inmunopatología de la enfermedad es muy distinta según la forma clínica manifestada (Lassmann, 2018b; Thompson, Banwell, et al., 2018).

Teniendo en cuenta las diferencias mencionadas entre los distintos subgrupos, resultó de interés evaluar posibles diferencias en el título de los anticuerpos ensayados en los 4 grupos en nuestros pacientes. En este trabajo de Tesis, no se detectaron diferencias significativas en el título de ninguno de los anticuerpos evaluados según la forma clínica manifestada. En línea con los resultados obtenidos, otros trabajos tampoco reportaron diferencias significativas en cohortes de Asia (Emiratos Árabes y Jordania), entre los pacientes con RR y los SDA en la detección de anti-VCA ni anti-EBNA1 (Gieß et al., 2017a). En concordancia con estos resultados, otros grupos tanto de Europa como Asia tampoco observaron diferencias en la detección de anticuerpos anti-VCA ni anti-EBNA1 entre los subgrupos RR, SP y PP (Ingram et al., 2010; Kofahi et al., 2020). Sin embargo, contrario a estos resultados, otros autores reportaron que la respuesta serológica frente al EBV es distinta entre los distintos subgrupos clínicos. Farrell y col, observaron que los pacientes con RR poseían mayores títulos de anticuerpos anti-EBNA1 comparado con los pacientes con las formas clínicas PP o SDA. Y a su vez, describió que los pacientes PP presentaron diferencias significativas en el título de anticuerpos anti-VCA comparado con los SDA (R. A. Farrell et al., 2009). Por su parte, el grupo de Laribi y col. describió un aumento en el título de anticuerpos anti-EBNA1 en pacientes SP comparado con los demás tipos de EM, mientras que el grupo RR presentó mayor título de anticuerpos anti-VCA comparado con los PP y SP (Laribi et al., 2018). Cabe mencionar que si bien en este trabajo de Tesis no se detectaron diferencias significativas en el título de anticuerpos entre los grupos estudiados, no es pertinente descartar la posibilidad de que los pacientes posean distinta respuesta serológica al EBV, dado que la falta de diferencias podría deberse al bajo número de pacientes que presentaron las formas progresivas (PP y SP) de la enfermedad. En consecuencia, sería de interés aumentar la cantidad de pacientes con las formas clínicas progresivas para confirmar o refutar esta observación.

Si bien actualmente no existe una cura definitiva para la EM, existen distintos tratamientos que reducen el número y la severidad de las recaídas, así como también pueden retrasar la progresión de la discapacidad a largo plazo. Muchos de estos tratamientos podrían interferir con la infección del EBV, por ejemplo: 1) el Interferón beta posee actividad antiviral, 2) la teriflunomida inhibe la replicación lítica del EBV, 3) el acetato de glatiramer, fingolimod y natalizumab alteran la composición de linfocitos B, 4) Compuestos como el Rituximab, ocrelizumab y ofatumumab eliminan los linfocitos B CD20 positivos (Dyer et al., 2023; Y. Guan et al., 2019). Teniendo en cuenta lo previamente mencionado, se estudió y comparó el título de anticuerpos según el tratamiento recibido por cada paciente, para dicho fin se clasificaron los distintos tratamientos en tratamientos de primera o de segunda línea. Si bien no se detectaron diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos anti-VCA y el tipo de tratamiento recibido, sí se observó una diferencia significativa en el título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 entre el grupo de pacientes bajo tratamientos de segunda línea (Fingolimod y Natalizumab) y los pacientes sin tratamiento. Contrariamente, estudios previos describieron que los títulos de anticuerpos anti-VCA y anti-EBNA1 no variaron entre los pacientes sin tratamiento versus pacientes tratados con Natalizumab,

Interferón beta o acetato de glatiramer, lo cual sugiere que dichos tratamientos no afectan la respuesta humoral frente al EBV (Castellazzi et al., 2015; Domínguez-Mozo et al., 2022; Raffel et al., 2014). A su vez, otro estudio poblacional realizado en Irak desestimó la relación entre el título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 y los tratamientos tanto de primera como de segunda línea, al no determinar diferencias significativas en los títulos de dichos anticuerpos entre los pacientes bajo tratamiento y los pacientes sin tratamiento (Al-Obaidi et al., 2022). Sin embargo, un estudio longitudinal de 12 meses, en el cual se compararon pacientes con EM (que comenzaron sin tratamiento y luego fueron tratados con teriflunomida) con controles sanos, demostró que el título de anticuerpos anti-VCA y anti-EBNA1 disminuyó significativamente en los pacientes bajo tratamiento, mientras que el título de estos anticuerpos anti-EBV se mantuvo constante en los casos control (Zivadinov et al., 2019). Por su parte, un estudio realizado por Persson Berg y col., demostró que los tratamientos de segunda línea como el Natalizumab reducen de forma moderada el título de anticuerpos anti-EBV en suero (Persson Berg et al., 2022). Considerando que en el presente trabajo sólo se incluyó un paciente bajo tratamiento con Teriflunomida, no se descarta la posibilidad del efecto de dicho tratamiento sobre la respuesta humoral dirigida al virus EBV. Los resultados en este apartado sugieren que mientras el paciente reciba tratamiento de segunda línea, es posible que no ocurra la reactivación del virus EBV o que ocurra de forma menos frecuente, conduciendo a una disminución del título de anticuerpos anti-EBNA1.

Otro de los factores que influyen en el curso de la EM es la edad; en este contexto un estudio que involucró pacientes con más de 65 años demostró que estos poseen mayor predisposición a desarrollar las formas progresivas de la enfermedad (PP o SP) comparado con los individuos jóvenes, quienes suelen desarrollar en su mayoría la forma RR (Capasso et al., 2023; Sanai et al., 2016). Con el fin de evaluar el efecto de la edad sobre el título de anticuerpos anti-EBV, se realizaron correlaciones entre dichas variables. Como resultado, no se observó una correlación significativa entre las variables evaluadas en el grupo de pacientes, así como tampoco en el grupo control. Teniendo en cuenta que el envejecimiento está relacionado con el deterioro de la capacidad de montar una respuesta inmunitaria adecuada, así como también se relaciona con altos niveles de mediadores proinflamatorios (Macaron et al., 2023), hubiese sido esperable observar diferencias significativas en las correlaciones evaluadas. En un trabajo publicado previamente, el título de anticuerpos anti-VCA correlacionó en forma positiva con la edad de pacientes con EM sin tratamiento y controles sanos (a mayor edad, mayor título de anti-VCA); sin embargo, en el mismo trabajo no se detectó una correlación significativa con la edad y el título de anticuerpos anti-EBNA1 en los mismos individuos (Domínguez-Mozo et al., 2022). Un estudio realizado por Mouhieddine y col., también reportó una correlación positiva y significativa entre pacientes con EM (bajo distintos tratamientos) y el título de anticuerpos anti-VCA. De forma similar a lo descrito para el estudio de Domínguez-Mozo, en este trabajo no se determinaron correlaciones significativas referidas a la respuesta serológica contra EBNA1 (Mouhieddine et al., 2015). Por el contrario, Mescheriakova y col, determinaron que el título de anticuerpos IgG-EBNA1 correlacionó en

forma negativa con la edad, demostrando que los pacientes jóvenes con EM presentaron mayores títulos de anticuerpos que los pacientes de edad avanzada con EM (Mescheriakova et al., 2020). En este estudio, Mescheriakova y col. atribuyen esta diferencia al fenómeno de la inmunosenescencia, donde los individuos de mayor edad presentarían una respuesta inmunitaria alterada. Según la bibliografía disponible, las discrepancias respecto de los resultados obtenidos en los distintos estudios podrían deberse a la edad de la primoinfección con el EBV y también podría depender del momento de reactivación del virus, algo que puede ser modulado por las terapias inmunosupresoras (Salzer et al., 2014; Thomasini et al., 2017). En la cohorte en estudio en esta tesis, la edad de los pacientes con EM no resultó ser un factor modulador del título de anticuerpos anti-EBV, probablemente debido a que la edad media de los individuos enrolados fue de 45 años, por lo cual la cohorte enrolada en este estudio no constituye una población con predominio de adultos mayores.

En cuanto al estudio de otros factores ambientales descriptos como asociados al desarrollo de la esclerosis múltiple, fue posible obtener datos sobre el hábito tabáquico y el IMC de la cohorte de pacientes y controles que recibieron atención en el centro neurológico Fleni. En primera instancia, el análisis del título de anticuerpos anti-VCA y anti-EBNA1 demostró que, si bien existió una tendencia a un mayor título de ambos anticuerpos en la población de pacientes fumadores comparado con los controles fumadores, dicha diferencia no fue significativa. Dos estudios previos realizados por Hedström y col. y Simon y col., reportaron una asociación entre los títulos de anticuerpos anti-EBNA1 y el hábito tabáquico, determinando que los individuos fumadores con altos títulos de anticuerpos tuvieron un mayor riesgo de desarrollar EM. En ambos estudios los autores tuvieron en cuenta el hábito tabáquico al momento en que se realizó el diagnóstico de la enfermedad (Hedström, Huang, et al., 2020; Simon et al., 2010). Por su parte, en otros estudios los autores tuvieron en cuenta el historial del hábito tabáquico previo al desarrollo de la enfermedad; en este contexto, los mencionados trabajos desestimaron la relación entre dichos factores (Simon et al., 2015; Sundqvist et al., 2012). Un tercer diseño de este tipo de estudio fue el realizado por Manouchehrinia y col., en el cual cuantificaron el número de cigarrillos consumidos diariamente por $6,2 (\pm 9,1)$ años desde el diagnóstico inicial de la EM (Manouchehrinia et al., 2022b). La disparidad de diseños respecto de este interrogante dificulta la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis con resultados previos. En paralelo, se determinó que aquellos individuos (sanos o con otras patologías asociadas al EBV) con hábito tabáquico poseen títulos elevados de anticuerpos anti-EBV y/o elevada carga viral en saliva respecto de individuos no fumadores (Chan et al., 2018; He et al., 2018, 2019; Nielsen et al., 2007). En concordancia con los mencionados trabajos, otros estudios poblacionales, así como también un análisis *in vitro* donde se usaron líneas celulares expuestas a extracto de cigarrillos, reportaron que el hábito tabáquico induciría la activación persistente del EBV (W.-L. Hsu et al., 2020; Hu et al., 2019; Xu et al., 2012). Teniendo en cuenta dicha información, sería interesante determinar si hay una interacción aditiva o sinérgica entre estos factores o si actúan de forma independiente. En resumen, el diseño extremadamente variable de

los estudios disponibles en la literatura especializada, así como la variación en el tamaño de las cohortes estudiadas y el análisis estadístico implementado, sumado a la falta de resultados significativos en nuestro estudio, probablemente debido al bajo número de pacientes enrolados, nos imposibilitó de elaborar una mayor conclusión respecto de la variabilidad en el título de anticuerpos anti-EBV y el hábito tabáquico.

Por otro lado, en este trabajo de Tesis se determinó que los pacientes con EM presentaron un menor índice de masa corporal (IMC) comparado con los individuos del grupo control. En línea con estos resultados, se reportó en distintas cohortes de pacientes y controles de Europa particularmente en Grecia, Eslovaquia y Holanda que tanto hombres como mujeres con EM poseían un IMC menor comparado con los controles (Dardiotis et al., 2019; Keményová et al., 2015; Nortvedt et al., 2005). Sin embargo, otros autores describieron que los pacientes con EM presentaron un mayor IMC que los controles (Bhargava et al., 2016; Klaren et al., 2016). Con el objetivo de determinar si existía una correlación entre dos factores ambientales (sobrepeso/obesidad y EBV) se analizó el título de anticuerpos anti-EBV en la cohorte teniendo en cuenta su IMC. En primera instancia, observamos que al comparar la población (considerando hombres y mujeres) con EM y sobrepeso/obesidad respecto del grupo control con sobrepeso/obesidad, los pacientes con EM presentaron mayor título de anticuerpos anti-EBNA1; sin embargo, los pacientes con EM no presentaron diferencias significativas respecto al título de anticuerpos anti-VCA. Por su parte, y dado que los hombres poseen un mayor IMC que las mujeres, se decidió separar la población según su sexo. Los hombres con EM y sobrepeso/obesidad presentaron mayores títulos de anticuerpos anti-VCA comparado con los controles masculinos con sobrepeso/obesidad; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el título de anticuerpos anti-EBNA1 entre los mismos hombres. La pérdida de la significancia estadística en este caso podría deberse principalmente a la disminución del número de individuos de la cohorte evaluada al separar los grupos según su género. Por su parte, en cuanto a las mujeres no se determinaron diferencias significativas entre los grupos: mujeres con EM y sobrepeso/obesidad *vs* mujeres control con sobrepeso/obesidad, lo cual podría deberse a que en nuestra población en estudio se enrolaron pocas mujeres con sobrepeso. De forma similar, no se observaron diferencias significativas al comparar los títulos de anticuerpos entre los pacientes con EM y el grupo control, según sexo en los individuos con peso normal y delgadez. Con respecto a la asociación entre el sobrepeso/obesidad y el título de anticuerpos anti-EBNA1, hay evidencia contradictoria, por un lado algunos desestiman relación alguna entre los títulos de anticuerpos y el IMC (Jansen et al., 2016; Winter et al., 2020), mientras que otros describen una asociación positiva fundamentalmente en cohortes de pacientes jóvenes de entre 18-20 años y de ambos sexos (Hagman et al., 2025; Hedström, 2023; Hedström, Brenner, et al., 2020; Hedström et al., 2015; Mohammadi et al., 2024; K. L. Munger et al., 2009). Cabe resaltar que, en este trabajo de Tesis, los datos obtenidos acerca del IMC fueron del estado de los pacientes y controles al momento del enrolamiento y que los individuos de la cohorte en estudio en este trabajo presentaron una edad media de 43-45 años. Sin embargo, según la bibliografía consultada el título de anticuerpos anti-EBNA1 incrementa entre unos 15 a 20 años antes

de desarrollar EM y luego se mantienen constantes a lo largo de la vida de los individuos (DeLorenze et al., 2006). Por lo cual, si bien no podemos confirmar dicha aseveración si podríamos asumir que el título de anticuerpos de los individuos enrolados en este trabajo se mantiene desde hace 15-20 años; si este fuere el caso coincidiría con la bibliografía.

En resumen, si bien no se conoce el mecanismo a través del cual el sobrepeso/obesidad y el título de anticuerpos anti-EBV podrían estar interaccionando, se hipotetiza que la obesidad resulta en un estado de inmunodeficiencia en el cual hay una desregulación de la producción de citoquinas y una alteración en la presentación antigénica, que podrían generar que los individuos con obesidad sean más susceptibles a la infección con agentes como el EBV (Karlsson & Beck, 2010; Mohammadi et al., 2024). Finalmente, y por lo previamente expuesto, resulta de sumo interés determinar el efecto verdadero de los dos factores ambientales analizados en esta sección (hábito tabáquico e IMC) debido a que ambos factores de riesgo son modificables mediante cambios en el estilo de vida, ya sea abandonar el hábito tabáquico o bien llevar adelante una dieta saludable y realizar ejercicio que permita tener un peso sano. De esta forma se podría evitar el progreso de la enfermedad o el empeoramiento de los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes con EM.

La EM es una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por inflamación, pérdida axonal y desmielinización. A su vez, la atrofia cerebral es considerada como una de las características de la EM, principalmente en las etapas tempranas de la enfermedad. Si bien el proceso fisiológico del envejecimiento es acompañado por la atrofia del cerebro, distintos estudios describieron que la mencionada atrofia cerebral ocurre alrededor de 10 veces más rápido en los pacientes con EM en comparación con individuos sanos (Giovannoni et al., 2016; Nijeholt, 2005). Los cambios en el volumen del cerebro son predictores del daño neurológico de los pacientes y está correlacionado con la progresión de la discapacidad (Fragoso et al., 2017; Sämann et al., 2012). A su vez, se observó la presencia del virus EBV en el SNC de pacientes con EM; más precisamente, se describió la formación de folículos de linfocitos B (principal reservorio de EBV) en meninges y lesiones cerebrales, que son áreas donde se produce la pérdida de la mielina o el proceso de desmielinización (Hassani et al., 2018; Magliozzi et al., 2013, 2013). Más aún, en diversos estudios anteriores se hipotetizó que dichos folículos podrían estar asociados a la desmielinización, atrofia cortical y un incremento en la activación de la microglía que, a su vez podría conducir al daño en la sustancia gris (S. R. Choi et al., 2012; Howell et al., 2011, 2015). En base a dicha evidencia, fue de interés en este trabajo conocer la implicancia del EBV en los cambios en el volumen cerebral de pacientes con EM. En el presente trabajo de Tesis, no se observaron correlaciones significativas entre el volumen de las lesiones, el volumen total de cerebro ni el volumen de tálamo con los títulos de anticuerpos evaluados, una vez que los últimos fueron ajustados por edad, tratamiento y género de los individuos. La ausencia de correlación entre los parámetros evaluados podría deberse principalmente al bajo número de individuos enrolados, pero también por el tipo de EM que

presentan los pacientes enrolados, que en su mayoría eran EMRR. El hecho de no obtener un resultado similar a los estudios antes descriptos no resultó llamativo, dado que otros estudios, en particular los publicados por Zivadinov y col. han obtenido resultados contradictorios a lo largo de los años. Mientras que en una publicación reportaron no haber observado asociación entre los anticuerpos anti-EBV y el volumen total de cerebro, en otro trabajo describieron la correlación entre dichas variables (Zivadinov et al., 2014, 2016b). Sin embargo, en estos mismos estudios, los autores determinaron de manera consistente correlaciones entre el título de anticuerpos anti-EBV (VCA y EBNA1), volumen y número de lesiones y también con la atrofia talámica (Zivadinov et al., 2014, 2016b). Una de las diferencias entre el análisis de datos de este grupo y el realizado en esta Tesis, radica en que Zivadinov y col. agruparon el título de anticuerpos en cuartiles y, de esa forma, sólo describieron la correlación entre el título de anticuerpos anti-EBV y el volumen de atrofia en aquellos individuos del cuartil más alto. En este sentido, los autores cuantificaron el volumen de las lesiones bajo el diseño experimental de un estudio longitudinal y cuantificaron la cantidad y volumen de las lesiones al inicio del estudio y nuevamente a los 5 años, contemplando a su vez la acumulación de lesiones nuevas. A su vez, Farrell y col., describieron una correlación entre el título de anticuerpos IgG anti-EBNA1 y el número y el volumen de las lesiones (R. A. Farrell et al., 2009). Por su parte, y de acuerdo con los resultados aquí obtenidos, otros estudios longitudinales tampoco demostraron una correlación entre el título de anticuerpos anti-VCA ni anti-EBNA1 y el número o volumen de las lesiones (Gieß et al., 2017a; K. L. Munger et al., 2015).

Con respecto a la fracción de parénquima cerebral, en este trabajo de tesis se correlacionó negativamente con el título de anticuerpos anti-VCA, lo cual indica que mientras mayor es el título de anticuerpos anti-VCA, menor es la fracción del parénquima cerebral y por lo tanto menor es el volumen del cerebro. Coincidente con dicho resultado, Zivadinov y col., también describieron una correlación de magnitud negativa entre ambas variables (Zivadinov et al., 2009). Si bien un número de estudios publicados hasta el día de la fecha describieron una correlación entre el título de anticuerpos anti-EBV en suero y marcadores de actividad de la enfermedad detectados por resonancia magnética, dichos resultados no son consistentes entre todos los estudios. Algunas de las razones que podrían explicar dichas diferencias, podrían ser inherentes a las diferentes cohortes estudiadas en cada trabajo, en particular lo referente al tipo de EM y el tratamiento recibido por los individuos. La inclusión de pacientes con SDA (individuos que todavía no fueron diagnosticados con EM definitiva) o individuos con las formas progresivas de la enfermedad (PP o SP) que presentan mayores niveles de atrofia que los EMRR, podría contribuir a una falsa asociación positiva entre los niveles de anticuerpos anti-EBV y los parámetros de actividad de la enfermedad de la EM (Pichler et al., 2016). Al mismo tiempo, los diferentes tratamientos no solo controlan los procesos inflamatorios, sino que también detienen la progresión de la atrofia y la neurodegeneración (Andravizou et al., 2019; Luessi et al., 2012). Previamente, se publicaron estudios consistentes acerca de la eficiencia de distintos tratamientos para reducir la atrofia; por ejemplo, el Fingolimod (Calabresi et al., 2014; Cohen et al., 2010) y el dimetilfumarato (Dupuy et al., 2016;

Nakamura et al., 2022). En consecuencia, en el presente trabajo no se descarta la posibilidad de que el EBV esté implicado en los mecanismos mediante los cuales se produce atrofia en la fracción de parénquima; sin embargo, a fin de resolver este interrogante hay que tener en cuenta que las medidas de atrofia cerebral son influenciadas por varios factores tanto biológicos como técnicos. Como factores biológicos se incluyen inflamación, edad, hábitos, carga genética; mientras que como factores técnicos se pueden mencionar la calidad de adquisición de las imágenes y los softwares utilizados para realizar los análisis (Chylińska et al., 2023; Rojas et al., 2016). Por lo tanto, sería necesario tener en cuenta todos estos factores y llevar a cabo un estudio epidemiológico, longitudinal y con un mayor número de individuos que permitan realizar una interpretación certera. La presencia del EBV en el cerebro, tal como fue descripto por Hassani y col y Moreno y col., podría representar un desafío continuo al sistema inmunitario mediante diversos eventos de reactivación, durante los cuales la proliferación de linfocitos B induciría la activación de células T autorreactivas (Hassani et al., 2018; Moreno et al., 2018). Dichos eventos podrían ser los causantes de la producción de citoquinas proinflamatorias con la consecuente inflamación en las lesiones activas de los pacientes con EM y la muerte celular de distintas células en el cerebro (Guan et al., 2019; Kvistad et al., 2014).

Adicionalmente, a fin de comprobar que los efectos observados a nivel de serología eran debidos exclusivamente al EBV, en este trabajo se estudiaron los títulos de anticuerpos para otros herpesvirus estrechamente relacionados con el EBV. En particular, se eligió al CMV porque es un herpesvirus, que puede ser transmitido a través de la saliva y es uno de los agentes etiológicos del síndrome mononucleósico. A su vez, se seleccionó al virus VZV, debido a que es un herpesvirus que tiene una alta seroprevalencia en la población, tal como ocurre con el EBV.

Con respecto al CMV, en este trabajo no se evidenció una diferencia significativa en la seroprevalencia entre los pacientes con EM y los individuos del grupo de dadores sanos. Si bien hasta el momento el porcentaje de seropositividad del CMV en individuos con EM no fue documentado en Latinoamérica, según estudios realizados en la población adulta sana de México y Brasil, la seroprevalencia de CMV varía entre el 59,1 y el 91,3 %, dependiendo del país en estudio y del componente socio-económico de la población estudiada (Alvarado-Esquivel et al., 2017; De la Tejera Hernández et al., 2015; Tiguman et al., 2020). En Argentina, en la región del noroeste, estudios previos documentaron una seroprevalencia del 80 % en la población general, mientras que, en la provincia de Tucumán en particular, se demostró que la seroprevalencia de CMV fue de 96,9 % (Marín et al., 2014; Salmerón & Barrenechea, 2021). No obstante, la información disponible acerca de la seroprevalencia del CMV en la población general del área metropolitana de Buenos Aires (AMBA) es escasa; en particular un estudio realizado en niños entre 1 y 15 años demostró que el 43,6 % de los niños del AMBA había sido infectado por CMV (Damilano et al., 1992). Los valores de seroprevalencia observados en este trabajo de tesis son similares a los determinados para el noroeste argentino; sin embargo, son menores al compararlos

con los valores de seroprevalencia en la Provincia de Tucumán. Como se mencionó anteriormente, las diferencias en las condiciones socio-económicas, de higiene y hacinamiento podrían ser la principal explicación para estas diferencias (Plosa et al., 2012); de hecho se han reportado variaciones del estatus seroepidemiológico de CMV entre países, dentro de un país (entre estados o provincias) y entre subpoblaciones (Cannon et al., 2010; Fowler et al., 2022; Thakolwiboon et al., 2020b). En resumen, la seroprevalencia de CMV sólo indica la presencia del virus en la población y al no determinarse diferencias entre el grupo control y los pacientes con EM en cuanto al porcentaje de individuos infectados, se decidió realizar el análisis cuantitativo del título de anticuerpos. En consecuencia, tras analizar el título de anticuerpos anti-CMV, se determinó una diferencia significativa en el título de anticuerpos IgG anti-CMV entre pacientes y controles, donde los pacientes con EM presentaron un mayor título. La evidencia sobre el rol del CMV en la EM es controversial; si bien existen estudios que postulan que el CMV podría actuar en forma protectora para los pacientes con EM (Bjornevik et al., 2022a; Grut et al., 2021), otros autores postulan una relación negativa entre la infección pasada del CMV y el desarrollo de la EM, donde el CMV podría conducir a la activación de linfocitos T autorreactivos que podrían inducir el desarrollo de una enfermedad autoinmune como la EM (Hussain et al., 2019; Perri et al., 2024; Sedighi et al., 2022; Zivadinov et al., 2006). Sin embargo, hay autores que realizaron meta-análisis exhaustivos y no lograron establecer una relación concluyente entre la infección con el CMV y la EM (Pakpoor, Pakpoor, et al., 2013); o concluyen que habría una asociación regional entre la seropositividad del EBV y que dicha asociación no sería homogénea a lo largo de los países (Thakolwiboon et al., 2020c). En forma más específica y relacionando el título de anticuerpos anti-CMV, un estudio realizado por Zivadinov y col, reportó que mientras mayor era el título de anticuerpos anti-CMV, mayor fue la mejora en la clínica de los pacientes (Zivadinov et al., 2006b). Por el contrario, dos grupos de investigación reportaron que en 2 cohortes de pacientes e individuos control de Irán, un mayor título de anticuerpos anti-CMV en pacientes vs controles, correlacionó con un mayor riesgo de desarrollar EM (Hussain et al., 2019; Sedighi et al., 2022b). A su vez, al analizar los datos de los títulos de anticuerpos teniendo en cuenta el sexo de los individuos, no se observaron diferencias significativas entre el título de anticuerpos anti-CMV en pacientes y controles. En apoyo a dichos resultados, otros estudios en diferentes regiones geográficas tampoco detectaron diferencias en el título de anticuerpos anti-CMV según el sexo entre pacientes con EM y controles (Hussain et al., 2019; Najafi, Ghane, Poortahmasebi, et al., 2016). En cuanto a los subgrupos de casos, teniendo en cuenta el tipo de EM y tratamiento recibido, no se detectaron diferencias significativas en ningún caso. Este resultado coincide con lo publicado previamente, donde se demostró que los títulos de anticuerpos anti-CMV son independientes del tratamiento recibido (Najafi, Ghane, Poortahmasebi, et al., 2016). A su vez, en este trabajo de Tesis, se determinó una correlación positiva entre el título de anticuerpos anti-CMV y la edad, tanto en pacientes como en individuos del grupo control. En un estudio realizado en España, se observó una correlación positiva en dichas variables en pacientes con EM (Dominguez-Mozo et al., 2021); así como también, se determinó que el título de anticuerpos anti-CMV aumenta con la edad en individuos

controles (Lopo et al., 2011; Parry et al., 2016; Staras et al., 2006). Considerando que es un resultado observado en ambas cohortes, podríamos interpretar que, a mayor edad, mayor es la probabilidad de infectarse con el CMV (Alari-Pahissa et al., 2018; Perri et al., 2024). Finalmente, y con respecto a los diferentes factores clínicos estudiados en este trabajo de tesis, no se detectó una asociación significativa entre el título de anticuerpos anti-CMV y el volumen total de cerebro, el volumen de lesiones, volumen de tálamo ni fracción de parénquima. Por el contrario, Zivadinov y col, determinaron una asociación positiva entre el título de anticuerpos IgG anti-CMV y una mejor calidad de vida de los pacientes con EM. Según dicho estudio, pacientes con títulos de anti-CMV más altos desarrollarían EM a una mayor edad, tendrían mayor fracción de parénquima y menor número de lesiones (Zivadinov et al., 2006b). En resumen, a partir de los resultados en el presente trabajo de Tesis, no podemos confirmar ni descartar el rol potencial del CMV en la patogénesis de la EM. Considerando la diferencia encontrada en el título de anticuerpos anti-CMV entre pacientes y controles, se podría postular una relación sinérgica entre el EBV y el CMV, justificada principalmente por una inmunidad heteróloga que resulta en una respuesta inmune a una infección pasada que proporciona una optimización en la respuesta contra una infección diferente pero relacionada (S. Sharma & Thomas, 2014).

A su vez, en el presente trabajo, se estudió la relación del virus VZV con la EM, debido a que es un herpesvirus que tiene una alta seroprevalencia en la población, tal como ocurre con el EBV. Se estimó que el porcentaje de seropositividad del virus VZV fue equivalente entre ambas cohortes: pacientes con EM e individuos del grupo control. En línea con dichos resultados, algunos autores reportaron que no existen diferencias en la seroprevalencia entre los individuos con EM y los individuos del grupo control (Najafi, Ghane, Yousefzadeh-Chabok, et al., 2016; Yoshimura et al., 2012). Sin embargo, otros autores determinaron que la seropositividad en los pacientes con EM es significativamente mayor comparada con los individuos control (Aramideh Khouy et al., 2019; Karampoor et al., 2017; Kofahi et al., 2020). Según un metaanálisis publicado por Rice y col, se determinó que existe una heterogeneidad geográfica para la asociación de la seropositividad del VZV y la EM. En este sentido, el estudio de Rice y colaboradores reportó que la seropositividad del VZV es más común en pacientes con EM comparado con los controles, particularmente en países asiáticos, pero no en países de Europa (Rice et al., 2021). Si bien la variación en la epidemiología de la infección no está clara, una posible explicación es la presencia de distintos componentes genéticos (circulación geográfica de alelos de HLA) y factores ambientales (factores climáticos, condiciones socioeconómicas y prácticas culturales) presentes en las distintas regiones geográficas, que parecerían jugar un rol fundamental en la exposición al VZV (Daulagala & Noordeen, 2018). Por su parte, en este trabajo de tesis no se detectaron diferencias significativas en el título de anticuerpos anti-VZV entre pacientes con EM y los individuos del grupo control. En forma similar, Mescheriakova y col, también desestimaron una posible diferencia entre las cohortes de su estudio (Mescheriakova et al., 2020). Por el contrario, y en forma similar a lo antes discutido para la seropositividad para VZV, en otras regiones geográficas se observó un aumento en el

título de anticuerpos anti-VZV en pacientes con EM comparado con los controles (Burgoon et al., 2009; Karampoor et al., 2017; Kofahi et al., 2020). Así como se describió para el CMV, no se observaron diferencias en el título de anticuerpos anti-VZV entre los individuos de las cohortes según género, edad, ni forma clínica manifestada. Dichos resultados son coincidentes con publicaciones de otros autores (Manouchehrinia et al., 2017; Mescheriakova et al., 2020). En este trabajo de tesis, la única relación observada entre el título de anticuerpos anti-VZV y la EM, fue que los pacientes bajo tratamientos de segunda línea presentaban mayores títulos de anticuerpos comparado con los pacientes sin tratamiento. Dicha observación no fue sorprendente, debido a que los pacientes con EM que deben someterse a tratamientos inmunosupresores como el Fingolimod, se realizan una prueba serológica para dosar anticuerpos anti-VZV y en el caso de que este resultado fuese negativo, se retrasa el inicio del tratamiento hasta que reciban un refuerzo de la vacuna contra la varicela (McGinley et al., 2021; Signoriello et al., 2020). Por su parte, Arvin y col reportaron que los pacientes con EM bajo tratamiento con Fingolimod, presentan mayor reactivación del virus VZV comparado con los pacientes que recibieron un placebo, sugiriendo que el Fingolimod podría afectar la función de los linfocitos T efectores cuyo rol consiste en mantener la infección viral bajo control (Arvin et al., 2015). Por lo tanto, podrían determinarse mayores títulos de anticuerpos anti-VZV en los pacientes bajo tratamiento comparado con los pacientes que aún no recibieron tratamiento. Finalmente, con respecto a las variables clínicas relacionadas con la EM y el título de anticuerpos anti-VZV, no se detectaron asociaciones entre volumen total de cerebro, volumen de lesiones, volumen de tálamo ni fracción de parénquima. Según mi mejor entender, y por la ausencia de bibliografía relacionada con dicha temática, no se determinaron correlaciones entre los volúmenes de cerebro y los títulos de anticuerpos anti-VZV. Tal como ocurre con el CMV los resultados hasta el momento respecto al VZV son inconclusos, si bien algunos autores reportaron una asociación entre el VZV y la EM (Mancuso et al., 2007; Rodríguez-Violante et al., 2009b), otros autores han desestimado dicha asociación (Burgoon et al., 2009; Marrie & Wolfson, 2001b). Por otro lado, vale aclarar que la mayor parte de los estudios que sustentan la asociación entre este virus y la patología estudian la presencia del ADN viral en células mononucleares y líquido cefalorraquídeo de pacientes e individuos control o hacen foco en el estadio de recaídas de los pacientes específicamente (Ordoñez et al., 2010; Sotelo et al., 2007b, 2014). En este trabajo, no se detectó una relación entre la serología del VZV y la EM, pero no se estudiaron los parámetros previamente mencionados, por lo tanto, no se puede descartar dicha asociación.

Por su parte, una vez que se determinó que el título de anticuerpos IgG-EBV fue mayor en pacientes con EM comparado con el grupo control, fue de interés investigar que ocurría con la carga viral del EBV. Suponiendo que las características de la infección por el EBV son distintas entre pacientes y controles, se podría suponer también que la carga viral en las CMSP es mayor por una mayor actividad del virus que lo conduciría a un mayor número de reactivaciones.

En lo referente al análisis de la carga viral del EBV en las células mononucleares de sangre periférica de los individuos del grupo control y pacientes con esclerosis múltiple, y considerando que en un individuo portador sano hay 1 de cada 100.000-1.000.000 de linfocitos infectados por el EBV (Gulley & Tang, 2008; Maurmann et al., 2003). En este trabajo, se decidió utilizar 500 ng de ADN en 5 µl de volumen. Siguiendo este procedimiento se determinó la carga viral en un subgrupo de 21/29 individuos del grupo control y 31/44 pacientes con EM. Si bien la carga viral fue detectable y comparable en el 70,5 % de los pacientes y 72,4 % de los controles, no se vieron diferencias significativas entre los grupos. A partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que los individuos de la cohorte eran infectológicamente sanos, podríamos inferir que la infección del EBV en los linfocitos B tanto en controles como en pacientes no tiene una relevancia clínica ni pronóstica. Dichos resultados son coincidentes con trabajos publicados previamente, donde se evaluó la carga viral en saliva, sangre entera, plasma, líquido cefalorraquídeo y CMSP tanto de pacientes con EM como controles, donde los autores tampoco observaron diferencias significativas (Cocuzza et al., 2014; Gieß et al., 2017; Lindsey et al., 2009; Pereira et al., 2023; H.-J. Wagner et al., 2004). Por el contrario, un trabajo publicado por Ben Fredj y col., sí reportó diferencias significativas, tanto en la proporción de casos con carga viral detectable como en los valores de la carga viral, entre pacientes con EM e individuos del grupo control; siempre con un mayor nivel en pacientes con EM (Ben Fredj et al., 2012). Un resultado que parecía encontrarse en línea con el estudio de Ben Fredj y col. fue el publicado por el grupo de Agostini y col., quienes en un primer estudio reportaron una mayor carga viral en paciente con EM frente a los individuos del grupo control; sin embargo, en un estudio posterior, en el que cambiaron el gen blanco de la *qPCR*, finalmente determinaron que no existió diferencia significativa en el valor de la carga viral entre los grupos estudiados (Agostini et al., 2018a, 2024). Nuevamente, estas discrepancias en los resultados reportados por distintos grupos de trabajo demuestran la necesidad de continuar explorando dichos interrogantes. Si bien la técnica de *qPCR* es ampliamente utilizada y brinda reproducibilidad y sensibilidad, cada laboratorio elabora su propio protocolo, usa equipos distintos, diseña cebadores diferentes, entre otros. En el caso particular del grupo de Agostini y col, la variación entre ambos trabajos mencionados y este trabajo de Tesis podría deberse al uso de cebadores dirigidos contra secuencias de fragmentos repetitivos localizados en el gen EBNA-LP, una estrategia distinta a la utilizada en este trabajo, que se basó en cebadores dirigidos contra el gen EBNA1, un gen de copia única. En este sentido, dependiendo del objetivo del trabajo se pueden seleccionar distintos genes como blancos de amplificación; si se requiere aumentar la sensibilidad de la *qPCR* se puede amplificar una región repetitiva, en cambio si se prioriza obtener una cuantificación precisa de la carga viral, se evitarán las zonas repetitivas y se seleccionará un gen de copia única (Sanosyan et al., 2017).

Por otro lado, autores como Buljevac y col. y Ramroodi y col., aseguraron que la detección del ADN del EBV en pacientes con EM aumenta cuando se realiza la toma de muestras seriadas de pacientes con alta actividad de la enfermedad (confirmado por resonancia magnética), una recaída de la enfermedad o cuando la muestra utilizada es LCR, en lugar de usar saliva o CMSP (Buljevac et al., 2005; Ramroodi

et al., 2013). Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, en la cohorte evaluada en Argentina se podría suponer que la infección productiva del EBV estaría contenida por el sistema inmunitario tanto en los pacientes con EM como en los controles. Si bien en este trabajo se detectaron valores bajos de carga viral, tanto en pacientes como en el grupo control, estos reflejarían episodios eventuales de reactivación viral que son controlados por el sistema inmunitario. Este razonamiento se sustenta en el hecho de que durante una infección lítica en el contexto de una deficiencia del sistema inmunitario, los valores de carga viral suelen alcanzar valores de 19.200 copias/ μ g de ADN, 54.960 copias/ml de plasma o 2842 copias/100.000 linfocitos en CMSP o 10^3 – 10^7 copias/mL de sangre entera, según la unidad en la que se exprese (S. Chakravorty et al., 2022; Gulley & Tang, 2010; Kanakry et al., 2016; Sakamoto et al., 2012). Adicionalmente, en el presente trabajo no se encontró una relación entre el título de anticuerpos anti-EBV y la carga viral en los grupos evaluados (EM vs GC), una correlación que también presenta controversia en la literatura científica. En este sentido, la falta de correlación entre el título de anticuerpos anti-EBV y los valores de carga viral coincide con los resultados reportados por Agostini y col. (Agostini et al., 2018b, 2024); sin embargo, otros autores describieron una correlación positiva entre la carga viral y el título de anticuerpos anti-VCA, tanto en la cohorte de pacientes con EM como en el grupo control (Pender et al., 2017). Cabe mencionar que en otras patologías no relacionadas a la EM, pero en las que se postula al EBV como un potencial cofactor iniciador, como el linfoma de Hodgkin o el carcinoma nasofaríngeo, tampoco se detectó una correlación entre el valor de la la carga viral y el título de diferentes anticuerpos anti-EBV (Besson et al., 2006, Yang et al., 2006), dicho resultado apoya lo visto en esta tesis. Por lo tanto, en el contexto de la EM, según los estudios de la bibliografía y el presente trabajo de tesis, la detección del ADN del EBV no resultaría un factor pronóstico en el seguimiento de la enfermedad.

En paralelo y dada la evidencia previa que sugiere la existencia de variantes del gen que codifica para EBNA2 en pacientes con EM, decidimos estudiar la presencia de variantes específicas del EBV asociadas a la EM. En relación con esta teoría existen trabajos previos que reportaron variantes en distintos genes (BYRF1, BLRF3, BERF1, BNLF1 y BCRF1) del EBV y que fueron asociadas a una mayor ocurrencia en pacientes con EM (Al-Naseri et al., 2019; Mechelli et al., 2015b; Mihailova et al., 2005; Varvatsi et al., 2021a). En este trabajo de Tesis, se utilizó una estrategia de amplificación por PCR anidada seguida de la secuenciación según el método automatizado de Sanger, de los genes virales BCRF1 y BYRF1, con el objetivo de caracterizar las variantes circulantes en nuestra región geográfica y determinar una potencial relación con la patología en estudio. En referencia al gen BCRF1, que codifica para la proteína viral vIL10, en este trabajo se logró un éxito de secuenciación del 18,6 % en las muestras del grupo control y del 25,7 % en muestras provenientes de pacientes con EM. Si bien estos porcentajes parecen reducidos, cabe recordar que al presentar ambos grupos de individuos valores de carga viral reducidos o indetectables, podemos asumir que la cantidad de genoma viral circulante en

sangre y utilizados como templado en la reacción de amplificación específica resultó insuficiente para lograr una masa de ADN amplificado suficiente para ser secuenciado.

En línea con los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, un estudio previo realizado en Canadá por Yea y col. también abordó el estudio de la secuencia del gen BCRF1 por el método de Sanger en pacientes pediátricos con EM y un grupo control (Yea et al., 2013). Si bien en el citado estudio, los autores utilizaron muestras de saliva, el éxito de la secuenciación fue del 19,9 % en el caso de los controles y 50 % en el caso de los pacientes. Las diferencias en los porcentajes observados, específicamente en el grupo de pacientes, podría deberse a la muestra utilizada (saliva vs CMSP) o a la edad de los pacientes (niños vs adultos). En este sentido, una infección primaria por EBV en niños de países desarrollados suele presentar mayor sintomatología clínica y asociarse al desarrollo de la mononucleosis infecciosa y la expresión de partículas virales en saliva suele persistir hasta por un mes post infección primaria, mientras que la viremia es rápidamente controlada por el sistema inmune. Por su parte, en pacientes adultos, la circulación de viriones en sangre y/o en CMSP suele ser rápidamente disminuida por el sistema inmunitario durante una reactivación. Si bien se detectaron polimorfismos puntuales al analizar las secuencias de nucleótidos en la región del promotor del gen, no se caracterizaron alelos específicos relacionados con la EM, ni alelos asociados al grupo control; un resultado que fue confirmado al realizar la reconstrucción filogenética con las secuencias obtenidas dado que no se visualizó la formación de clados independientes conformados por secuencias de pacientes o del grupo control; por el contrario, los alelos identificados se distribuyeron homogéneamente entre las dos poblaciones en estudio. De forma coincidente con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el estudio antes mencionado con pacientes pediátricos en Canadá, Yea y col. tampoco reportaron la asociación de un polimorfismo nucleotídico específico en el promotor del gen BCRF1 con la EM (Yea et al., 2013). Por su parte y con respecto a la secuencia de la región codificante del gen, no se identificaron polimorfismos asociados a la enfermedad luego del análisis de las secuencias y tampoco con el análisis de los árboles filogenéticos. Según Yea y col. en su población en estudio tampoco habría variantes en la secuencia codificantes relacionadas con el desarrollo de la enfermedad (Yea et al., 2013). Por lo tanto y en línea con los resultados obtenidos en este trabajo, podríamos deducir un alto grado de conservación en el gen BCRF1, con muy pocas posiciones nucleotídicas variables y en su mayoría silenciosas, lo cual indica la importancia del gen y sugiere un papel crítico de la vIL10 durante la infección por EBV.

En paralelo, en el estudio de caracterización de polimorfismos en el gen BYRF1, que codifica para la proteína viral EBNA2, el éxito de secuenciación del mencionado gen fue del 21,28 % para los aislamientos provenientes de los controles sanos y 26,63 % para los aislamientos provenientes de los pacientes con EM. En este sentido resultan llamativos los resultados obtenidos en un trabajo previo realizado por Mechelli y col. con una cohorte de pacientes y controles de Italia, en el cual el éxito de secuenciación para el mismo gen fue de 67 % en el caso del grupo control y 58 % en los pacientes con esclerosis múltiple (Mechelli et al., 2015b). En este punto cabe mencionar que en el citado estudio

Mechelli y col. partieron de 40 ml de sangre, mientras que en el presente trabajo se optó por separar 20 ml de sangre por individuo. Otra diferencia en el diseño experimental entre ambos trabajos radica en que en el presente protocolo de trabajo se realizó un enriquecimiento en CMSP mediante centrifugación con ficoll, mientras que Mechelli y col. incluyeron un paso extra de selección y separación de células CD19⁺. De esta manera, los autores se aseguraron de contar con aproximadamente 4 millones de linfocitos B por individuo. Teniendo en cuenta que los linfocitos B son el principal reservorio del EBV, de esta forma lograron enriquecer la muestra en linfocitos B y aumentar sus probabilidades de amplificar el ADN viral. Por su parte en este trabajo de tesis, al partir de CMSP, la cantidad de linfocitos B, potencialmente infectados con EBV, resultó menor. Por otro lado, los cebadores utilizados en el presente estudio al igual que en el trabajo de Mechelli y col., amplificaron EBNA2 de EBV tipo 1 y en el caso que algunos de los individuos de la población hubiesen sido infectados con EBV tipo 2, EBNA2 no hubiera sido amplificable. Si bien se decidió utilizar estos cebadores debido a que el EBV de tipo 1 es predominante en Sudamérica, el menor porcentaje de éxito de secuenciación respecto del estudio de Mechelli y col. podría deberse, al menos en parte, a la probable circulación del EBV tipo 2 en nuestra población; sin embargo, la razón más probable para explicar la diferencia en el éxito de casos secuenciados radica en el paso de selección de linfocitos B previo a la amplificación de los genes virales.

En cuanto a la circulación diferencial de tipos virales, como se mencionó antes, en América del Sur se describió una circulación mayoritaria de EBV1 (Blazquez et al., 2021; Zanella et al., 2019a). En el caso particular de la Argentina, estudios previos que evaluaron la prevalencia de ambos tipos virales en portadores sanos o niños con infección benigna demostraron una circulación que osciló entre 85 % y el 95 % de casos con EBV1 (Correa et al., 2004; Lorenzetti et al., 2014), y sólo en ciertas regiones tropicales como Colombia o el norte de Brasil, se describió un aumento en la circulación de EBV2, donde su prevalencia se incrementó hasta el 20% de los portadores sanos (Alves et al., 2022; Arturo-Terranova et al., 2020).

Respecto de las variantes de la región terminal del gen BYRF1 detectadas en este trabajo, las mismas se clasificaron en dos categorías: i) variantes reportadas previamente o ii) variantes relacionadas a las anteriores. Se optó por esta nomenclatura a fin de continuar con la nomenclatura de variantes de EBNA2 introducida por Mechelli y col. y se optó por denominar variantes relacionadas a aquellas secuencias que no poseían 100 % de identidad con las variantes publicadas, dado que contenían polimorfismos puntuales que las diferenciaban de las anteriores; sin embargo, estos polimorfismos no eran suficientes como para clasificar a la variante como una nueva variante independiente. Cabe aclarar que no existe un consenso en cuanto al nombre que se asigna a las diferentes variantes de los genes de EBV, ni tampoco existe un consenso que especifique el grado de variabilidad necesario para definir una nueva variante y es por este motivo que diferentes autores utilizan diferentes nomenclaturas (Mechelli et al., 2015b; Shim et al., 1998; Smatti et al., 2018b; Varvatsi et al., 2021a; X. Wang et al., 2012). Si bien en

este trabajo de tesis se caracterizaron distintas variantes del gen (variante 1.1, asociada a 1.1, asociada a 1.2, asociada a 1.2A, asociada a 1.3, asociada a 1.3A, asociada a GD1 o Raji), tanto en pacientes como en controles, ninguna de las variantes resultó significativamente asociada al riesgo de desarrollar esclerosis múltiple. A modo confirmatorio de estos resultados, se realizó la correspondiente reconstrucción filogenética, donde no se observó un clado de segregación independiente compuesto preferencialmente por secuencias de pacientes con EM o del grupo control y que contará con soporte de bootstrap significativo. Por lo tanto, se confirmó que en este conjunto de secuencias obtenidas en Argentina no existe asociación del gen BYRF1 de riesgo para el desarrollo de la EM. De forma similar tampoco se detectó la presencia de un alelo protector contra la enfermedad. Por su parte, también existe controversia en la literatura científica respecto del rol de los alelos del gen BYRF1 y su papel en el desarrollo de la EM. En este sentido, Mechelli y col. reportaron una posición variante asociada al riesgo de padecer EM en su población en estudio, donde determinaron que la variante 1.2 estaría asociada al riesgo de desarrollar EM, mientras que la variante 1.3B, detectada con mayor frecuencia en los portadores sanos, estaría asociada a un menor riesgo de desarrollo de la EM (Mechelli et al., 2015b). Por otro lado, en un estudio realizado por Varvatsi y col. en una cohorte de Chipre y donde secuenciaron genes de latencia del virus EBV tanto en pacientes con EM como en controles sanos, los autores observaron que la variante 1.3A estaba asociada al riesgo de desarrollar EM, mientras que la variante 1.2 estaba asociada con los portadores sanos (Varvatsi et al., 2021a). Este último resultado, referido al papel de la variante 1.2 representa una contradicción entre los dos estudios antes mencionados (Mechelli et al., 2015a; Varvatsi et al., 2021a). Contrario a los resultados anteriores, aunque en línea con los resultados del presente trabajo de Tesis, en un nuevo estudio del mismo grupo de trabajo, que amplió el número de casos enrolados en el trabajo anterior de Mechelli, y en el cual se presentan los resultados de la secuenciación del genoma completo de EBV en pacientes con EM y controles sanos, los autores no encontraron una asociación significativa entre las variantes de EBNA2 y la EM (Chiara et al., 2016). A su vez, según un estudio realizado por Lay y col. en Australia, tampoco se encontraron variantes de EBNA2 asociadas significativamente con pacientes con EM (Lay et al., 2012). Si bien el grupo de Varvatsi y col. planteó la existencia de variantes asociadas a la EM, el consenso en la literatura científica parece indicar que no existirían tales variantes; sin embargo, no se puede descartar que el hecho de no haber encontrado un alelo asociado a la EM en este trabajo de Tesis podría deberse a que el número total de secuencias analizadas pudo no ser suficiente para lograr potencia estadística. Al margen de la caracterización de polimorfismos puntuales que definen variantes virales, en el presente estudio se detectaron nuevos polimorfismos puntuales en las secuencias generadas y que según la revisión bibliográfica realizada no fueron reportados con anterioridad. En particular, vale mencionar que la sustitución c.505G>A se observó en variantes similares al alelo 1.2, tanto en pacientes con EM como en controles. De forma similar, la sustitución c.721A>C también se observó en ambos grupos estudiados, pero siempre en el alelo 1.3 y finalmente, en ningún caso se detectó la sustitución c.766G>A, que fue reportada previamente en ambos grupos por otros autores en otras regiones geográficas (Mechelli et al.,

2015b; Varvatsi et al., 2021a). Dada la elevada variabilidad del gen BYRF1 y teniendo en cuenta que la variabilidad geográfica del EBV ya fue ampliamente descripta, resultaría válido que estas últimas posiciones variables, o la falta de la sustitución c.766G>A, podrían ser polimorfismos puntuales de circulación preferencial en nuestra región geográfica.

Si bien la información disponible acerca de las variantes del gen BYRF1 hasta el momento no resulta concluyente en relación con la EM, en el caso puntual de este trabajo de tesis y a modo de perspectiva de continuidad de la línea de investigación, resultaría necesario aumentar el número de individuos y de secuencias a fin de determinar con certeza que no existen variantes del gen viral asociadas al desarrollo de la EM en nuestra población. De forma similar, y más allá de los trabajos de secuenciación directa de algunos genes biológicamente relevantes para el EBV, como BYRF1 y BCRF1, el avance de las técnicas de secuenciación de alto rendimiento plantea la necesidad futura de secuenciar el genoma viral completo, tanto en pacientes con EM como en portadores sanos a fin de determinar si la sumatoria de distintos polimorfismos en diferentes genes del EBV son lo que brindan una mayor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad o descartar dicha hipótesis.

En este sentido, la identificación de variantes o haplotipos específicos podrían ser de interés en el desarrollo de vacunas y a su vez, podrían ser útiles para el pronóstico de las diversas formas clínicas de la EM y/o entre otros trastornos neurológicos. Por otro lado, la detección y/o ausencia de distintos polimorfismos en EBNA2 de la cohorte argentina, indicaría que tal como se publicó previamente, el EBV presenta una distribución geográfica particular con una circulación de variantes diferente para cada región geográfica (Blazquez et al., 2021; Chang et al., 2009; Chiara et al., 2016; Correia et al., 2018; Palser et al., 2015; Telford et al., 2020). En resumen, la diferencia observada con el trabajo de Varvatsi y col, podría deberse a la distribución geográfica diferencial del EBV alrededor del mundo y los eventos tanto de recombinación como mutación que ocurren en el genoma del EBV en diferentes regiones del globo (Zanella et al., 2019b). Si bien en la cohorte aquí analizada no se detectaron variantes asociadas a la EM, este trabajo representa la prueba de concepto de un estudio epidemiológico que abordó este interrogante en pacientes de nuestra región. Por otra parte, la variabilidad genética del EBV y su relación con las diferentes patologías neoplásicas a las cuales se encuentra vinculado, ha sido y aún hoy es ampliamente estudiado debido a la incidencia variable de dichas neoplasias en las diferentes regiones geográficas del planeta y de la variabilidad en el grado de asociación del EBV con las mismas (Briercheck et al., 2024; Chang et al., 2009; Correia et al., 2018). A modo de ejemplo vale mencionar lo observado para el linfoma de Burkitt, el cual es endémico en África ecuatorial y la asociación con EBV es cercana al 100 %, mientras que su incidencia en otras regiones del mundo (LB esporádico) es menor y la asociación con EBV oscila desde el 20-30 % en sociedades desarrolladas hasta un 90 % observado en ciertas poblaciones, particularmente en el Noroeste de Brasil (Brady et al., 2007b; Mbulaiteye et al., 2009). Un caso similar se describió para el linfoma de Hodgkin, el cual presenta una elevada incidencia en Europa y América del Norte, pero menor en América del Sur y es poco frecuente

en África y en el Sudeste Asiático. La asociación del LH con EBV parece variar según las condiciones socioeconómicas de la región estudiada ya que presenta un mayor porcentaje de asociación en países en vías de desarrollo con respecto a los desarrollados. Sin embargo, en la Argentina se observa un porcentaje de asociación similar al de los países desarrollados (P. Chabay et al., 2016; Chang et al., 2009). Como ejemplo final, el carcinoma nasofaríngeo posee una alta incidencia en el Sudeste Asiático, mientras que la misma en África del Norte es menor y es una entidad poco frecuente en América del Sur. Sin embargo, su estrecha relación con el EBV (100 % de asociación) se observa en todas las regiones geográficas (Chua et al., 2016; Su et al., 2023). En este contexto, se buscó analizar las secuencias virales producidas en este trabajo de Tesis en el contexto de aislamientos de diversas patologías asociadas al EBV y de distintos orígenes geográficos a fin de evidenciar si existían polimorfismos virales asociados al origen geográfico de los aislamientos o a un conjunto de patologías. Al analizar el árbol filogenético según el origen geográfico de las secuencias, se observó la formación de 4 clados con soporte de *bootstrap* significativo, un clado con secuencias provenientes de Papúa Nueva Guinea, Indonesia y Asia, un clado con secuencias de Argentina, un clado con una secuencia argentina y una africana y finalmente un clado con una secuencia de Asia y una de Indonesia. La existencia de un clado de segregación independiente del Sudeste Asiático no resultó sorprendente, dado que estudios previos de secuenciación del genoma completo del EBV también describieron una estrecha relación entre las secuencias de Papúa Nueva Guinea, Indonesia y Asia y, que, a su vez, estas segregaban de forma independiente a las secuencias de las secuencias europeas y africanas (Correia et al., 2018). A su vez, la presencia de un clado con secuencias argentinas (n = 7) podría indicar la presencia de una variante de circulación preferencial en nuestro país, sin embargo, para comprobar dicho interrogante sería necesario aumentar el número de aislamiento secuenciados. Según mi mejor entender, en Latinoamérica no hay reportes sobre la secuenciación del gen *BYRF1*; sin embargo, a través de secuenciación del gen *LMP1* de EBV, se observó la formación de un clado recombinante formado por secuencias de África y Asia, que sería predominante en países de Sudamérica (Brasil, Argentina y Perú) (Alves et al., 2022, Gantuz et al., 2017). A su vez, otros estudios también observaron la existencia de clados con secuencias africanas y argentinas, lo cual podría explicarse por la heterogeneidad genética que existe en nuestro país y que es producto de la migración de distintas regiones del mundo hacia América. En relación con lo antes mencionado, la ascendencia en Argentina es mayormente europea (63-68 %), seguida de indígena americana (22-33 %) y africana (3-4 %) (Avena et al., 2012; Fejerman et al., 2005). En particular, resultó de nuestro interés realizar el análisis por geografía para determinar si los alelos reportados con anterioridad tenían una circulación geográfica preferencial. Si bien los resultados no tuvieron sustento estadístico, en la reconstrucción filogenética se observó que los alelos 1.2A y 1.2B segregaron en un clado donde había predominancia de secuencias argentinas, mientras que el alelo 1.3B se encontraba en un clado donde predominaron secuencias europeas. De acuerdo con Mechelli y colaboradores, se podría suponer que el alelo 1.3B, asociado a los individuos del grupo control, sería el alelo de circulación preferencial en Europa (Mechelli et al., 2015a).

De igual manera, teniendo en cuenta que el EBV está asociado a una amplia variedad de patologías, tanto benignas (mononucleosis infecciosa), como neoplásicas, entre ellas el carcinoma nasofaríngeo, el linfoma de Burkitt y el linfoma de Hodgkin, entre otros (S. Chakravorty et al., 2022; Tralongo et al., 2024); se analizó la relación de las variantes de BYRF1 y las patologías malignas. Con respecto a los clados con sustento estadístico, se determinó que en su mayoría estaban formados por secuencias provenientes de aislamientos de diversas patologías; sin embargo, ninguno de los alelos descriptos del gen que codifica para EBNA2 resultó asociado a la EM ni a otra patología relacionada al EBV. Tampoco se identificó un alelo protector que se agrupe con secuencias benignas ni con el grupo control. Considerando que la incidencia de las enfermedades asociadas al EBV es muy diferente según las poblaciones o regiones geográficas y que anteriormente se reportaron en nuestro país variantes puntuales asociadas con patologías neoplásicas, sería de gran interés conocer la variabilidad del genoma viral en el contexto de la EM. En resumen, contar con información sobre el genoma de EBV, sus variantes genéticas y su posible asociación con la EM, podría ser de utilidad en el desarrollo de una vacuna profiláctica y/o la producción de medicamentos antivirales aplicables al tratamiento de la EM, ya que podría considerarse al virus como un factor ambiental modificable, al contrario de la genética de los individuos que padecen esta patología y que no puede ser modificada.

Dado que la EM es una enfermedad multifactorial y que su desarrollo y progresión se ve influenciada tanto por factores genéticos como ambientales que exceden al posible rol de la variabilidad del EBV, la susceptibilidad genética de los individuos no debe ser menospreciada. En este sentido, al día de la fecha se identificaron 233 posiciones variables asociadas con la susceptibilidad a desarrollar EM. En particular, 32 de los mencionados SNPs se posicionan dentro de la región codificante de genes que componen el sistema HLA, mientras que los 201 restantes se localizan en las regiones adyacentes a estos genes (Goodin et al., 2021; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019b; Shirai & Yamauchi, 2022). Considerando dicha información y habiendo observado la existencia de una respuesta serológica diferente frente al EBV entre los pacientes y el grupo de controles, y que la misma no se relacionó con una variante viral en particular ni con la carga viral del EBV y teniendo en cuenta además que los linfocitos B son el principal reservorio del EBV en estado de latencia, se decidió investigar la respuesta transcripcional en dichos linfocitos infectados por el EBV. Para este fin se decidió separar los linfocitos B según su estado de infección y luego realizó un ensayo de secuenciación masiva del ARNm, *RNA-seq*. Luego del correspondiente análisis bioinformático, se determinó que el ARNm del gen *IQGAP1* presentó una expresión significativamente menor en linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁺ de pacientes con EM comparado con linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁻ de los mismos pacientes. Si bien previamente se realizaron análisis de *RNA-seq* de CMSP de pacientes con EM (Derakhshani et al., 2022; Gafson et al., 2018; Kozin et al., 2022; Schafflick et al., 2020), según mi mejor entender, este fue el primer estudio donde se investigó la respuesta transcripcional en linfocitos B de pacientes con EM e individuos control diferenciados por su estado de infección (infectados o no con el virus EBV). Con respecto al gen

IQGAP1, existen estudios previos que reportaron posiciones variables en este gen relacionadas con el riesgo frente a la EM, pero aún no está claro el mecanismo a través del cual podría aumentarlo (Beecham et al., 2013; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2011; Keshari et al., 2016). Teniendo en cuenta que en los resultados del RNA-*seq* observamos una disminución en la expresión de ARNm de *Iqgap1*, en los linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁺ de pacientes con EM comparado con linfocitos B CD20⁺ EBNA1⁻ de pacientes con EM, nos propusimos evaluar el efecto del silenciamiento de la expresión de *IQGAP1* mediante ensayos *in vitro*, silenciando la expresión de *Iqgap1* en células B de ratones.

Una vez que determinamos que el silenciamiento de *Iqgap1* era efectivo utilizando un ARN de silenciamiento, se evaluó la expresión de distintas citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Según los resultados obtenidos, el silenciamiento de *Iqgap1* regularía negativamente la expresión del ARNm de las citoquinas Csf2 e IL-10, sin embargo, el silenciamiento de estos ARNm no implicó un efecto similar sobre el nivel de expresión de las respectivas citoquinas; demostrado en el ensayo de ELISA donde la cuantificación de Csf2 e IL-10 resultó ser indetectable en el sobrenadante de cultivo. Si bien se conoce que *Iqgap1* se expresa en todos los tipos celulares de forma ubicua (Gorman et al., 2012b; Schmiedel et al., 2018), y se reportó que es posible silenciar *Iqgap1* en los linfocitos B (Lella & Malarkannan, 2023; J. C. Wang et al., 2017) a mi mejor conocimiento, no existen estudios en los cuales se haya evaluado la producción de las citoquinas por parte de los linfocitos B. Sin embargo, en el contexto de la EM, los linfocitos B secretan bajas cantidades de citoquinas como la IL-10 y elevadas cantidades de CSF2. En consecuencia, el déficit de IL-10 estaría asociado con la ocurrencia de recaídas o brotes en la EM, mientras que los elevados niveles de CSF2 estarían relacionados con la inflamación tisular. En base a este conocimiento, podríamos inferir que la infección del EBV en los linfocitos B de los pacientes con EM, podrían inducir la disminución en la expresión del gen *Iqgap1*, lo cual podría estar afectando una vía de señalización que modularía la expresión a nivel del ARNm de las citoquinas Csf2 e IL-10; sin embargo, el efecto en la modulación del ARNm no pudo ser confirmado a nivel proteico.

Con respecto a la proliferación celular, se determinó que al silenciar *Iqgap1* en linfocitos B en cultivo de ratones salvajes, existe un aumento en la proliferación celular de los mismos. Posteriormente en un ensayo de cocultivo de linfocitos B silenciados (*Iqgap1*-siRNA) con linfocitos T, nos permitió determinar que la proliferación de los linfocitos T en cocultivo también cambiaba significativamente luego de silenciar el gen *Iqgap1*, siendo mayor la proliferación de los linfocitos T al silenciar *Iqgap1* en linfocitos B. Este resultado podría explicarse, a través del mecanismo de activación de los linfocitos B, donde dichos linfocitos primero deben reconocer en su BCR un antígeno y luego recibir señales de coestimulación para llevar a cabo su activación. Éstas señales en algunos casos provienen de la interacción con los linfocitos T (activación dependiente de linfocitos T), mientras que en otros casos los

linfocitos B tienen la capacidad de proliferar de forma independiente de los linfocitos T, en este caso las señales de coestimulación las reciben directamente de los antígenos que reconocen. Por lo tanto, podría ocurrir que el silenciamiento de *Iqgap1* en los linfocitos B en el cocultivo esté afectando de cierto modo la interacción entre linfocitos T y B, ayudando a promover principalmente la proliferación de los linfocitos T. Por su parte, cuando se evaluó la proliferación de los linfocitos T en cocultivo con linfocitos B, se observó un aumento significativo de la proliferación tanto en linfocitos T provenientes de ratones 2D2, como de linfocitos T provenientes de ratones OTII. Como se comentó con anterioridad, a mi mejor entender, no fue descrito en la literatura el efecto del silenciamiento de *Iqgap1* en células B y su posterior cultivo con linfocitos T. Por su parte, Gorman y col. analizaron el efecto del silenciamiento de *Iqgap1* en linfocitos T; de esta forma, determinaron que en ratones deficientes del gen *Iqgap1* se observó un aumento en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Gorman et al., 2012b). A su vez Okuyama y col. observaron que al silenciar *Iqgap1* en linfocitos T CD4⁺ de ratones OTII con un vector retroviral (shIQGAP1), también se observó un aumento de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Okuyama et al., 2020). En breve, según los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, la infección del EBV disminuiría la expresión de *Iqgap1*, y de esta forma provocaría un aumento en la proliferación celular de linfocitos B cuando están aislados en cultivo, y a su vez, el silenciamiento de *Iqgap1* en linfocitos B también tendría consecuencias sobre la proliferación de los linfocitos T, hecho que se puso de manifiesto en el ensayo de cocultivo de ambos tipos celulares. Si bien el mecanismo que estaría afectado en esta interacción no fue comprobado, podríamos postular que se está modificando la sinapsis de interacción entre los linfocitos T y B durante la presentación antigénica. Este razonamiento se justifica porque para la formación de la sinapsis inmunológica debe haber una acumulación de F-actina y también debe ocurrir la polarización del centro organizador de microtúbulos (Microtubule Organizing Center, *mTOC*, por sus siglas en inglés) hacia el sitio de contacto de los linfocitos T y la célula CPA. En este contexto, podríamos suponer que el silenciamiento de *Iqgap1* afectaría su rol protagónico como regulador del citoesqueleto, favoreciendo la acumulación de la F-actina en el sitio de la sinapsis.

Luego de evaluar la proliferación celular en linfocitos B y T, se evaluó el efecto del silenciamiento de *Iqgap1* sobre el factor CD44. Al silenciar *Iqgap1* se observó un aumento de CD44 tanto en linfocitos T provenientes de ratones 2D2 como en linfocitos T provenientes de ratones OTII. Dado que la molécula CD44 resulta fundamental para la activación de los linfocitos T, según los resultados observados, *Iqgap1* regularía negativa e indirectamente la activación de los linfocitos T, a través de un mecanismo que involucra la interacción de los linfocitos B y T. Si bien los resultados publicados hasta el momento no son comparables, Okuyama y col. reportaron un aumento en el número de células CD44⁺ en la población de linfocitos T CD4⁺, en ratones deficientes del gen *Iqgap1* (Okuyama et al., 2020). Por su parte, Bourguignon y col. reportaron una posible interacción entre IQGAP1 y CD44, donde ambas proteínas formarían parte del complejo CD44-Cdc42-IQGAP1. Esto último fue confirmado por los mencionados autores al silenciar la expresión de *Iqgap1* mediante un ARN de interferencia y demostrar la inhibición

en la formación del complejo CD44-Cdc42-IQGAP1 (Bourguignon et al., 2005). De forma adicional, más allá de su rol en la activación celular, distintas isoformas de CD44 están implicadas en las interacciones célula-célula y célula-matriz, en la promoción de la diferenciación a linfocitos Th1 y Th17, así como también en la migración de los linfocitos (Bonder et al., 2006; H. Guan et al., 2009, 2011). Esta última aseveración, nos conduce a hipotetizar, que la infección con el EBV induce a la disminución en la expresión de *Iqgap1* en los linfocitos B, que permitiría que se forme con mayor fuerza la sinapsis de unión de linfocitos B:T donde ocurre la presentación antigénica (potencialmente de algún autoantígeno), de esta forma se regularía positivamente la expresión de la molécula CD44, lo cual conduciría a una mayor activación de linfocitos T, y a su vez a una mayor tasa de migración de dichos linfocitos. En consecuencia, en el contexto de la EM, planteamos que las células T autorreactivas (en el hipotético caso de reconocer autoantígenos) migrarían a través de la barrera hematoencefálica y dañarían neuronas, mielina y axones, produciendo lo que se conoce como desmielinización e inflamación del SNC.

Teniendo en cuenta que los linfocitos B pueden actuar como CPA, y en base a los resultados que se obtuvieron previamente, se evaluó el efecto del silenciamiento de *Iqgap1* sobre la presentación antigénica de los linfocitos B cocultivándolos con linfocitos T. Los datos expuestos con anterioridad nos permitieron hipotetizar acerca de la necesidad de la proteína IQGAP1 en el sitio de la sinapsis (B:T) durante la presentación antigénica. A modo de resumen, cuando se cultivaron los linfocitos B silenciados con los linfocitos T de los ratones 2D2, observamos un aumento significativo en el porcentaje del marcador CD80 presente en linfocitos B; pero no se detectaron diferencias significativas en los marcadores CD86 y MHC II. Si bien este resultado apoyaría la teoría del efecto sobre la actividad presentadora de antígeno, no fue posible reproducirlo al diferenciar los linfocitos T en los distintos subtipos de linfocitos T (Th0, Th1 y Th17). Sin embargo, no se puede desconocer la existencia de distintas moléculas denominadas coestimuladoras secundarias que también tendrían implicancia en la presentación antigénica. Una de estas moléculas es la proteína OX40, presente en linfocitos T, y la proteína OX40L, presente en linfocitos B. Según la evidencia publicada, los niveles de ARNm de OX40 en sangre periférica de pacientes con EM son mayores que los niveles de ARNm de individuos del grupo control (Manian et al., 2023). Por su parte, el grupo de Okuyama y col. evaluaron la relación entre IQGAP1, OX40 y OX40L, y determinaron que IQGAP1 es un importante regulador de la co-señalización de OX40, y que promueve el desarrollo de linfocitos T CD4⁺ patogénicos (Okuyama et al., 2020). Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que la infección con el EBV induce la disminución en la expresión de *Iqgap1* presente en los linfocitos B, lo cual regularía la activación y proliferación de los linfocitos T, a través de un mecanismo que involucra la interacción de los linfocitos B y T, pero aún restaría dilucidar cuál es la molécula involucrada en dicha interacción B:T durante la formación de la sinapsis inmunológica al momento de presentar un antígeno. Resultaría de interés

ampliar el estudio a las moléculas: OX40 y OX40L, ya que según la evidencia bibliográfica podrían estar involucrados en la sinapsis inmunológica (Okuyama et al., 2020).

Una vez determinado que el silenciamiento de *Iqgap1* tuvo un impacto significativo en la proliferación y activación de los linfocitos T, se evaluó su efecto sobre los factores de transcripción de linfocitos T. Se observó que al silenciar *Iqgap1* en los linfocitos B y cultivarlos con la población diferenciada a Th1, existía un aumento significativo en el ARNm del marcador *Tbx21* y a su vez, al silenciar *Iqgap1* en los linfocitos B y cultivarlos con la población diferenciada a Th17 también se observó un aumento significativo en los ARNm de los marcadores *Rorc* y *Foxp3*.

Según se mencionó anteriormente, no existen estudios que hayan abordado las consecuencias del silenciamiento de *Iqgap1* en linfocitos B y su posterior cocultivo con linfocitos T; sin embargo, se reportó que la disminución de la expresión de *Iqgap1* en los linfocitos T aumenta la desfosforilación del factor nuclear de activación de linfocitos T (*Nuclear factor of activated T cells, NFAT*, por sus siglas en inglés) y su importación al núcleo (S. Sharma et al., 2011). Teniendo en cuenta dicha evidencia, se podría postular una potencial función de IQGAP1 como promotor de la localización eficiente de distintos factores de transcripción para que interactúen con sus reguladores en el citoplasma o sus genes diana en el núcleo. Por otra parte, si bien no se encontró información que relacione directamente a IQGAP1 con la diferenciación de los linfocitos T, se podría hipotetizar su rol a través de la relación del eje OX40-OX40L, debido a que dichas moléculas si fueron relacionadas con la diferenciación de linfocitos T hacia los subtipos Th1, Th2 y Th17 (N. Fu et al., 2021; Y. Fu et al., 2020). Según dicha hipótesis, se esperaría que la infección con el EBV en los linfocitos B disminuya la expresión de *Iqgap1*, y esto induzca una mayor expresión de la molécula coestimuladora OX40L en los linfocitos B, lo cual permitiría la unión más eficiente a su contraparte OX40 presente en linfocitos T, promoviendo su activación y proliferación, así como también su diferenciación hacia los tipos Th1 y Th17, principales efectores de la EM que se encuentran circulantes tanto en las lesiones del sistema nervioso central como en líquido cefalorraquídeo y la sangre periférica de los pacientes.

Una vez determinado el efecto de silenciar el gen *Iqgap1* en linfocitos B sobre los factores de transcripción de los linfocitos T, se analizó si el silenciamiento de *Iqgap1* en linfocitos B y su posterior cultivo con linfocitos T, tenía un impacto sobre la secreción de citoquinas de las células T. Dicho experimento se planteó, debido a que la mayor presencia de células Th1 y Th17 se ve reflejado por el aumento de los factores de transcripción característicos de cada linaje Th1 (Tbet) y Th17 (ROR γ t), que también se encuentra acompañada por una mayor producción de citoquinas proinflamatorias: INF γ y TNF α en el caso de las células Th1 e IL-17 en el caso de las células Th17 (C. A. Wagner et al., 2019). En cuanto a nivel de ARNm, luego de la diferenciación de los linfocitos T de los ratones 2D2 en Th1 y Th17, la expresión de *il17* se vio aumentada significativamente en la población de linfocitos Th17. Sin embargo, la expresión del ARNm de *il10* se vio aumentado significativamente en la población Th1

previamente cultivados con linfocitos B *Iqgap1*^{-/-}. En base a estos resultados, se podría postular que *Iqgap1* se encuentra involucrado en la diferenciación de los linfocitos T, y, por lo tanto, modifica la expresión de las citoquinas que son producidas por cada subtipo de linfocito T. Si bien, como se mencionaba anteriormente los resultados publicados hasta el momento no son completamente comparables, se observó que el silenciamiento de *Iqgap1* en linfocitos T CD4⁺ en cultivo induce una mayor producción de IL-17 e IFN γ , y el mismo efecto se observó en linfocitos T CD4⁺ de ratones deficientes en el gen *Iqgap1* (Okuyama et al., 2020).

7. Conclusión

Conclusiones

El presente estudio analizó de manera integral la participación del virus Epstein Barr en la esclerosis múltiple en una cohorte argentina, combinando enfoques epidemiológicos, genéticos y funcionales.

- ❖ Se confirmó que tanto pacientes con EM como individuos controles presentaron una seroprevalencia del 100 % para EBV, indicando la ubicuidad del virus en nuestra población. No obstante, se observaron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos IgG anti-VCA y anti-EBNA1 entre ambos grupos, lo que podría reflejar diferencias en la respuesta inmune frente al EBV.
- ❖ Respecto a la carga viral en sangre periférica, no se encontraron diferencias significativas entre pacientes y controles, lo cual sugiere que la carga viral circulante no constituye un biomarcador diferencial en esta patología.
- ❖ El análisis de las variantes genéticas de los genes que codifican para la vIL10 y EBNA2 del EBV no reveló la existencia de variantes que aumenten el riesgo de desarrollar EM, ni una asociación con el origen geográfico de los aislamientos argentinos.
- ❖ A nivel molecular, el análisis transcriptómico (*RNA-seq*) evidenció una disminución en la expresión del ARNm del gen *IQGAP1* en linfocitos B infectados por EBV en pacientes con EM, en comparación con linfocitos B no infectados de dichos pacientes.
- ❖ Complementariamente, los estudios funcionales *in vitro* demostraron que el silenciamiento de *Iqgap1* promueve un aumento en la proliferación de linfocitos T y B, así como en la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y T-bet, moléculas clave en la diferenciación de los linfocitos Th17 y Th1, respectivamente.
- ❖ Finalmente se demostró que existe un aumento en la expresión del ARNm de *il17* e *il10* en la población de linfocitos Th17 y Th1, respectivamente, cuando estos son cocultivados con linfocitos B *Iqgap1*^{-/-}.

Conclusión final

El presente estudio corrobora la ubicuidad del virus Epstein-Barr en la población argentina y pone de manifiesto diferencias inmunológicas relevantes entre pacientes con esclerosis múltiple y sujetos

controles. Si bien la presencia del virus y su carga viral en sangre periférica no constituyen por sí solos factores explicativos del inicio y progresión de la enfermedad, la disminución de la expresión de *IQGAP1* en linfocitos B infectados por EBV sugiere un mecanismo molecular potencialmente implicado en la exacerbación de la respuesta inmune proinflamatoria. Este hallazgo permite postular una vía de interacción entre la infección viral, una respuesta exacerbada y la patogenia de la EM, posicionando al EBV como un cofactor clave en su desarrollo. Finalmente, los resultados obtenidos proponen nuevas perspectivas para la identificación de blancos terapéuticos dirigidos a componentes específicos de la respuesta inmune alterada en esta enfermedad.

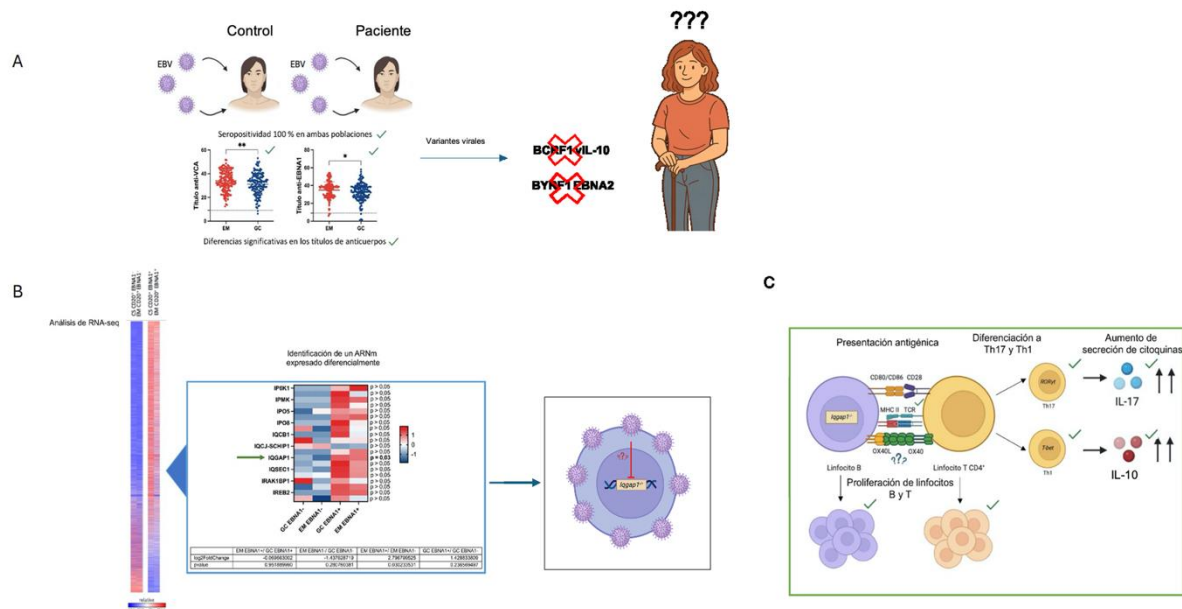


Figura 47: Resumen gráfico de resultados. **A)** En el contexto de la infección con el EBV, se determinó que el 100 % de la población en estudio era seropositiva para el EBV. A su vez, se observó una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos anti-VCA y anti-EBNA1 entre pacientes con EM e individuos del grupo control. Se exploró la posibilidad de la existencia de variantes virales de los genes que codificaban para las proteínas EBNA2 e vIL10; sin embargo, no se encontraron variantes con mayor potencial patogénico asociadas a la EM, ni protectoras asociadas al grupo control, que pudieran explicar el desarrollo o la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. **B)** Una vez aislados los linfocitos B EBV⁺ y EBV⁻ de pacientes y controles, se realizó un análisis de *RNA-seq* para analizar la expresión de los ARN mensajeros. Se observó una disminución significativa del ARNm de *Iqgap1* en los linfocitos B EBV⁺ del grupo de pacientes comparado con los linfocitos B EBV⁻ del mismo grupo de individuos. Sin embargo, no se demostró mediante que mecanismo, la infección del EBV estaría produciendo la disminución de la expresión de *Iqgap1* en los linfocitos B. **C)** Se evaluó la posible alteración del MHC II y de CD80/CD86 (ambas moléculas implicadas en la presentación antigénica) pero la expresión de ninguna de estas moléculas se encontró significativamente alterada. Por lo tanto, postulamos que las moléculas que podrían estar involucradas en esta interacción son OX40-OX40L. Si bien el mecanismo de presentación antigénica no fue dilucidado, como consecuencia de la baja expresión de *Iqgap1* en los linfocitos B, detectamos un aumento en la proliferación de linfocitos B y T. Los linfocitos T se diferencian principalmente a los perfiles Th1 y Th17 y secretan las citoquinas: IL-10 e IL-17 respectivamente.

Perspectivas

Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta tesis abren múltiples interrogantes que permitirán profundizar el conocimiento sobre el papel del EBV en la patogenia de la esclerosis múltiple. En primer lugar, se propone ampliar el análisis transcriptómico mediante *RNA-seq* incrementando el número de pacientes y controles incluidos en la cohorte, con el fin de validar y robustecer los hallazgos observados, especialmente en relación con la expresión de *Iqgap1* en linfocitos B.

Una segunda estrategia técnica con alto valor consistiría en realizar estudios de transcriptómica a nivel de célula única (*single-cell RNA-seq*), comparando linfocitos B infectados por EBV (EBV⁺) y no infectados (EBV⁻), tanto en pacientes con EM como en individuos controles. Esta aproximación permitiría una caracterización más precisa de los perfiles transcripcionales y podría suponer nuevos estudios funcionales con las células implicadas en la respuesta inmune.

Asimismo, a partir de la relevancia emergente de la sinapsis inmunológica en la interacción entre linfocitos T y B, se propone investigar el rol del complejo OX40-OX40L en la presentación antigénica. En particular, se propone determinar si su expresión está regulada por *IQGAPI* y si podría mediar las diferencias funcionales observadas en este estudio. En caso de confirmarse, un próximo paso sería explorar el vínculo entre dicho complejo y la infección por EBV, con especial foco en dos proteínas virales candidatas: EBNA3C y LMP1, las cuales, según evidencia previa, podrían participar en mecanismos de modulación inmunológica relevantes para esta interacción.

Por otro lado, se propone llevar a cabo estudios funcionales *in vivo* utilizando ratones deficientes para *IQGAPI*. Mediante la inducción de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), modelo murino de EM, se podría evaluar la evolución y severidad de la enfermedad comparando animales *knockout* y salvajes, con el objetivo de dilucidar el impacto directo de *IQGAPI* sobre los mecanismos inflamatorios y neurodegenerativos asociados a la EM.

Finalmente, como resultado de las observaciones derivadas de este trabajo, se ha iniciado en el laboratorio CIEN de FLENI una nueva línea de investigación centrada en el virus citomegalovirus (CMV). A futuro, se propone determinar si el CMV podría desempeñar un rol relevante en la patogenia de la EM, así como explorar una posible interacción sinérgica entre el CMV y el EBV, considerando que ambos pertenecen a la familia *Orthoherpesviridae* y podrían desregular rutas inmunopatológicas similares.

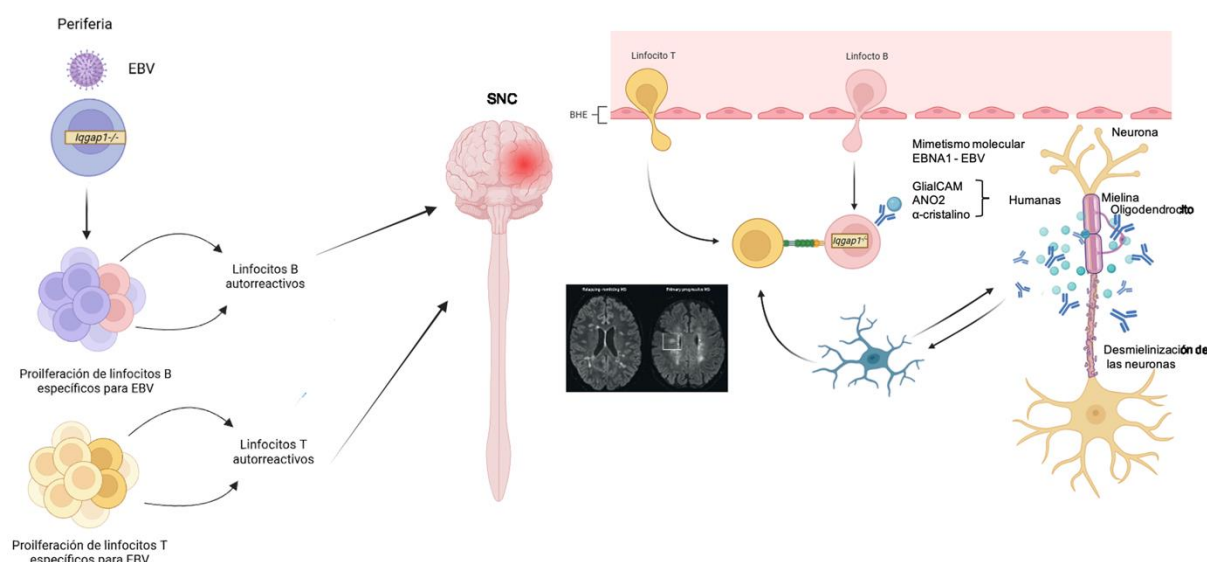


Figura 48: Resumen gráfico de perspectivas. Hipotetizamos que el mecanismo se inicia en la circulación periférica, donde el EBV infecta linfocitos B, y, a través de un mecanismo no dilucidado inhibe la expresión de *Iqgap1*. En respuesta a la infección, en el ganglio linfático los linfocitos B infectados comienzan a proliferar, a su vez los linfocitos T también comenzarán a proliferar a modo de respuesta inmune y se expandirán clonalmente. Es esperable que ambos subtipos celulares —linfocitos B y T— sean específicos para antígenos virales del EBV, aunque una fracción de ellos podría ser autorreactiva, debido a fallas en los mecanismos de tolerancia inmunológica. Estos linfocitos autorreactivos podrían migrar al sistema nervioso central, atravesar la barrera hematoencefálica y reconocer autoantígenos (como GlialCAM, ANO2 o α -cristalino, entre otros), que, mediante un mecanismo de mimetismo molecular, serían reconocidos erróneamente como antígenos virales (por ejemplo, EBNA1). Esto podría desencadenar la activación y expansión de ambos tipos celulares y el inicio de sus funciones efectoras: los linfocitos B secretarían autoanticuerpos dirigidos contra proteínas como la mielina, mientras que los linfocitos T liberarían citoquinas proinflamatorias que contribuirían a un microambiente inflamatorio en el SNC. Como consecuencia, los autoanticuerpos podrían promover la desmielinización a través de la activación del sistema del complemento y la opsonización de la mielina, facilitando su destrucción por células efectoras de la microglía. La pérdida de mielina altera la conducción nerviosa y deja expuestos los axones, haciéndolos más susceptibles al daño y contribuyendo a la disfunción neuronal y la neurodegeneración observadas en la EM. Además, las citoquinas secretadas por los linfocitos T perpetúan el reclutamiento de células inmunes, manteniendo la inflamación crónica en el SNC y alimentando un ciclo que agrava el daño tisular, que puede ser visto como las placas desmielinizantes en una resonancia magnética del cerebro.

8. Bibliografia

Bibliografía

- Abbott, R. J., Pachnio, A., Pedroza-Pacheco, I., Leese, A. M., Begum, J., Long, H. M., Croom-Carter, D., Stacey, A., Moss, P. A. H., Hislop, A. D., Borrow, P., Rickinson, A. B., & Bell, A. I. (2017). Asymptomatic Primary Infection with Epstein Barr Virus: Observations on Young Adult Cases. *Journal of Virology*, 91(21), 10.1128/jvi.00382-17. <https://doi.org/10.1128/jvi.00382-17>
- Abel, A. M., Tiwari, A. A., Gerbec, Z. J., Siebert, J. R., Yang, C., Schloemer, N. J., Dixon, K. J., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018a). IQ Domain-Containing GTPase-Activating Protein 1 Regulates Cytoskeletal Reorganization and Facilitates NKG2D-Mediated Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Activation and Cytokine Gene Translation in Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01168>
- Abel, A. M., Tiwari, A. A., Gerbec, Z. J., Siebert, J. R., Yang, C., Schloemer, N. J., Dixon, K. J., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018b). IQ Domain-Containing GTPase-Activating Protein 1 Regulates Cytoskeletal Reorganization and Facilitates NKG2D-Mediated Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Activation and Cytokine Gene Translation in Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology*, 9, 1168. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01168>
- Abrahamyan, S., Eberspächer, B., Hoshi, M.-M., Aly, L., Luessi, F., Groppa, S., Klotz, L., Meuth, S. G., Schroeder, C., Grüter, T., Tackenberg, B., Paul, F., Then-Bergh, F., Kümpfel, T., Weber, F., Stangel, M., Bayas, A., Wildemann, B., Heesen, C., ... Ruprecht, K. (2020). Complete Epstein Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 91(7), 681-686. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-322941>
- Abusalah, M. A. H., Gan, S. H., Al-Hatamleh, M. A. I., Irekeola, A. A., Shueb, R. H., & Yean Yean, C. (2020). Recent Advances in Diagnostic Approaches for Epstein–Barr Virus. *Pathogens*, 9(3), 226. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030226>
- Afrasiabi, A., Ahlenstiel, C., Swaminathan, S., & Parnell, G. P. (2023). The interaction between Epstein–Barr virus and multiple sclerosis genetic risk loci: Insights into disease pathogenesis and therapeutic opportunities. *Clinical & Translational Immunology*, 12(6), e1454. <https://doi.org/10.1002/cti2.1454>
- Afrasiabi, A., Parnell, G. P., Fewings, N., Schibeci, S. D., Basuki, M. A., Chandramohan, R., Zhou, Y., Taylor, B., Brown, D. A., Swaminathan, S., McKay, F. C., Stewart, G. J., & Booth, D. R. (2019). Evidence from genome wide association studies implicates reduced control of Epstein Barr virus infection in multiple sclerosis susceptibility. *Genome Medicine*, 11, 26. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0640-z>
- Aggarwal, S., Yurlova, L., & Simons, M. (2011). Central nervous system myelin: Structure, synthesis

- and assembly. *Trends in Cell Biology*, 21(10), 585-593.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.004>
- Agostini, S., Mancuso, R., Caputo, D., Rovaris, M., & Clerici, M. (2024). EBV and multiple sclerosis: Expression of LMP2A in MS patients. *Frontiers in Neuroscience*, 18.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1385233>
- Agostini, S., Mancuso, R., Guerini, F. R., D'Alfonso, S., Agliardi, C., Hernis, A., Zanzottera, M., Barizzone, N., Leone, M. A., Caputo, D., Rovaris, M., & Clerici, M. (2018a). HLA alleles modulate EBV viral load in multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 80.
<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1450-6>
- Agostini, S., Mancuso, R., Guerini, F. R., D'Alfonso, S., Agliardi, C., Hernis, A., Zanzottera, M., Barizzone, N., Leone, M. A., Caputo, D., Rovaris, M., & Clerici, M. (2018b). HLA alleles modulate EBV viral load in multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 80.
<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1450-6>
- Alari-Pahissa, E., Moreira, A., Zabalza, A., Alvarez-Lafuente, R., Munteis, E., Vera, A., Arroyo, R., Alvarez-Cermeño, J. C., Villar, L. M., López-Botet, M., & Martínez-Rodríguez, J. E. (2018). Low cytomegalovirus seroprevalence in early multiple sclerosis: A case for the 'hygiene hypothesis'? *European Journal of Neurology*, 25(7), 925-933.
<https://doi.org/10.1111/ene.13622>
- Alfredsson, L., & Olsson, T. (2019). Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(4), a028944.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028944>
- Ali, A., Ohashi, M., Casco, A., Djavadian, R., Eichelberg, M., Kenney, S. C., & Johannsen, E. (2022). Rta is the principal activator of Epstein Barr virus epithelial lytic transcription. *PLOS Pathogens*, 18(9), e1010886. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010886>
- Alinezhad, M., Sadeghi, J., Soroush, M. H., Laghousi, D., Nikanfar, M., & Nikbakht, M. (2021). Frequency of beta toxin and phage Sa3 genes of Staphylococcus aureus in multiple sclerosis patients and healthy nasal carriers. *Gene Reports*, 23, 101060.
<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101060>
- Al-Khreisat, M. J., Ismail, N. H., Tabnjh, A., Hussain, F. A., Mohamed Yusoff, A. A., Johan, M. F., & Islam, M. A. (2023). Worldwide Prevalence of Epstein–Barr Virus in Patients with Burkitt Lymphoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics*, 13(12), Article 12.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13122068>
- Almohmeed, Y. H., Avenell, A., Aucott, L., & Vickers, M. A. (2013a). Systematic Review and Meta-Analysis of the Sero-Epidemiological Association between Epstein Barr Virus and Multiple Sclerosis. *PLOS ONE*, 8(4), e61110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061110>
- Almohmeed, Y. H., Avenell, A., Aucott, L., & Vickers, M. A. (2013b). Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple

- sclerosis. *PloS One*, 8(4), e61110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061110>
- Al-Naseri, M. A., Salman, E. D., & Ad'hiah, A. H. (2019). Association between interleukin-4 and interleukin-10 single nucleotide polymorphisms and multiple sclerosis among Iraqi patients. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 40(11), 2383-2389. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-04000-4>
- Al-Obaidi, A. B., Ali, Z. A., Rasool Almashta, S. A., & Faisel Ghazi, H. (2022). THE POTENTIAL ROLE OF EPSTEIN BARR VIRUS IN MULTIPLE SCLEROSIS MOLECULAR AND SEROLOGICAL STUDY. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 75(3), 691-696.
- Alroughani, R., & Boyko, A. (2018). Pediatric multiple sclerosis: A review. *BMC Neurology*, 18, 27. <https://doi.org/10.1186/s12883-018-1026-3>
- Al-Temaimi, R., Alroughani, R., Jacob, S., & Al-Mulla, F. (2015). Gender influence in EBV antibody response in multiple sclerosis patients from Kuwait. *Journal of Neuroimmunology*, 285, 57-61. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.05.021>
- Alvarado-Esquivel, C., Sandoval-Carrillo, A. A., Vazquez-Alaniz, F., Salas-Pacheco, J. M., Hernández-Tinoco, J., Sánchez-Anguiano, L. F., & Antuna-Salcido, E. I. (2017). Lack of association between cytomegalovirus infection and hypertensive disorders in pregnancy: A case-control study in Durango, Mexico. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 7(3), 229-233. <https://doi.org/10.1556/1886.2017.00013>
- Alves, P., Larrate, M., Garcia-Costa, A., Rohan, P., Gama, B. E., Abdelhay, E., Delatorre, E., & Hassan, R. (2022). Spatial Dispersal of Epstein–Barr Virus in South America Reveals an African American Variant in Brazilian Lymphomas. *Viruses*, 14(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/v14081762>
- Amjadi, O., Rafiei, A., Haghshenas, M., Navaei, R. A., Valadan, R., Hosseini-Khah, Z., Omran, A. H., Arabi, M., Shakib, R. J., Mousavi, T., & Ashrafi, G. H. (2017). A systematic review and meta-analysis of seroprevalence of varicella zoster virus: A nationwide population-based study. *Journal of Clinical Virology*, 87, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.12.001>
- Amon, W., & Farrell, P. J. (2005). Reactivation of Epstein Barr virus from latency. *Reviews in Medical Virology*, 15(3), 149-156. <https://doi.org/10.1002/rmv.456>
- Andersson, U., & Tracey, K. J. (2012). Reflex Principles of Immunological Homeostasis. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 313-335. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075015>
- Andravizou, A., Dardiotis, E., Artemiadis, A., Sokratous, M., Siokas, V., Tsouris, Z., Aloizou, A.-M., Nikolaidis, I., Bakirtzis, C., Tsivgoulis, G., Deretzi, G., Grigoriadis, N., Bogdanos, D. P., & Hadjigeorgiou, G. M. (2019). Brain atrophy in multiple sclerosis: Mechanisms, clinical relevance and treatment options. *Autoimmunity Highlights*, 10(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13317-019-0117-5>

- Angelini, D. F., Serafini, B., Piras, E., Severa, M., Coccia, E. M., Rosicarelli, B., Ruggieri, S., Gasperini, C., Buttari, F., Centonze, D., Mechelli, R., Salvetti, M., Borsellino, G., Aloisi, F., & Battistini, L. (2013). Increased CD8+ T Cell Response to Epstein Barr Virus Lytic Antigens in the Active Phase of Multiple Sclerosis. *PLOS Pathogens*, 9(4), e1003220. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003220>
- Angeloni, B., Bigi, R., Bellucci, G., Mechelli, R., Ballerini, C., Romano, C., Morena, E., Pellicciari, G., Reniè, R., Rinaldi, V., Buscarinu, M. C., Romano, S., Ristori, G., & Salvetti, M. (2021). A Case of Double Standard: Sex Differences in Multiple Sclerosis Risk Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3696. <https://doi.org/10.3390/ijms22073696>
- Aramideh Khouy, R., Karampoor, S., Keyvani, H., Bokharaei-Salim, F., Monavari, S. H., Taghinezhad, S., Etemadifar, M., & Esghaei, M. (2019). The frequency of varicella-zoster virus infection in patients with multiple sclerosis receiving fingolimod. *Journal of Neuroimmunology*, 328, 94-97. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.12.009>
- Arjmandi, D., Graeili, Z., Mohammadi, P., Arshadi, M., Tadi, M. J., Ardekani, A., Naeimi, R., Abbasi, F., Marhoommirzabak, E., Mahjour, S., Sartip, B., Prasa, H., Omrani, V. F., & Rostami, A. (2023). Chlamydia pneumonia infection and risk of multiple sclerosis: A meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 77. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2023.104862>
- Arneth, B. (2020). Multiple Sclerosis and Smoking. *The American Journal of Medicine*, 133(7), 783-788. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.03.008>
- Arturo-Terranova, D., Giraldo-Ocampo, S., & Castillo, A. (2020). Caracterización molecular de las variantes del virus Epstein Barr detectadas en la cavidad oral de adolescentes de Cali, Colombia. *Biomédica*, 40(1), 76-88.
- Arvin, A. M., Wolinsky, J. S., Kappos, L., Morris, M. I., Reder, A. T., Tornatore, C., Gershon, A., Gershon, M., Levin, M. J., Bezuidenhoudt, M., & Putzki, N. (2015). Varicella-Zoster Virus Infections in Patients Treated With Fingolimod. *JAMA neurology*, 72(1), 31-39. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3065>
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Annals of Neurology*, 61(4), 288-299. <https://doi.org/10.1002/ana.21117>
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2010). Epstein–Barr Virus Infection and Multiple Sclerosis: A Review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5(3), 271-277. <https://doi.org/10.1007/s11481-010-9201-3>
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2016). Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention—An Update. *Seminars in Neurology*, 36(02), 103-114. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579693>
- Ascherio, A., Munger, K. L., Lennette, E. T., Spiegelman, D., Hernán, M. A., Olek, M. J., Hankinson, S. E., & Hunter, D. J. (2001). Epstein Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: A prospective study. *JAMA*, 286(24), 3083-3088. <https://doi.org/10.1001/jama.286.24.3083>

- Ascherio, A., Munger, K. L., & Lünemann, J. D. (2012). The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.198>
- Ascherio, A., Munger, K. L., White, R., Köchert, K., Simon, K. C., Polman, C. H., Freedman, M. S., Hartung, H.-P., Miller, D. H., Montalbán, X., Edan, G., Barkhof, F., Pleimes, D., Radü, E.-W., Sandbrink, R., Kappos, L., & Pohl, C. (2014). Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA neurology*, 71(3), 306-314. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5993>
- Avena, S., Via, M., Ziv, E., Pérez-Stable, E. J., Gignoux, C. R., Dejean, C., Huntsman, S., Torres-Mejía, G., Dutil, J., Matta, J. L., Beckman, K., Burchard, E. G., Parolin, M. L., Goicoechea, A., Acreche, N., Boquet, M., Ríos Part, M. D. C., Fernández, V., Rey, J., ... Fejerman, L. (2012). Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *PloS One*, 7(4), e34695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034695>
- Awasthi, A., Samarakoon, A., Chu, H., Kamalakannan, R., Quilliam, L. A., Chrzanowska-Wodnicka, M., White, G. C., & Malarkannan, S. (2010). Rap1b facilitates NK cell functions via IQGAP1-mediated signalosomes. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1923-1938. <https://doi.org/10.1084/jem.20100040>
- Ayee, R., Ofori, M. E. O., Wright, E., & Quaye, O. (2020). Epstein Barr Virus Associated Lymphomas and Epithelia Cancers in Humans. *Journal of Cancer*, 11(7), 1737-1750. <https://doi.org/10.7150/jca.37282>
- Ayoade, F., & Kumar, S. (2023). Varicella-Zoster Virus (Chickenpox). En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448191/>
- Ba Abdullah, M. M., Palermo, R. D., Palser, A. L., Grayson, N. E., Kellam, P., Correia, S., Szymula, A., & White, R. E. (2017). Heterogeneity of the Epstein Barr Virus (EBV) Major Internal Repeat Reveals Evolutionary Mechanisms of EBV and a Functional Defect in the Prototype EBV Strain B95-8. *Journal of Virology*, 91(23), e00920-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00920-17>
- Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J., & Weiner, H. L. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*, 97(4), 742-768. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.021>
- Balcerac, A., & Louapre, C. (2022). Genetics and familial distribution of multiple sclerosis: A review. *Revue Neurologique*, 178(6), 512-520. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2021.11.009>
- Balfour Jr, H. H., Dunmire, S. K., & Hogquist, K. A. (2015). Infectious mononucleosis. *Clinical & Translational Immunology*, 4(2), e33. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.1>
- Balnyte, R., Rastenyte, D., Vaitkus, A., Mickeviciene, D., Skrodeniene, E., Vitkauskiene, A., & Uloziene, I. (2013). The importance of HLA DRB1 gene allele to clinical features and disability in patients with multiple sclerosis in Lithuania. *BMC Neurology*, 13(1), 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-13-77>
- Banerjee, T., Saha, M., Ghosh, E., Hazra, A., Das, A., Choudhury, D., Ojha, S., Haldar, A., Mukherjee,

- A., Nandi, S., Ghosh, A., Mukherjee, A., Chatterjee, A., Datta, A., & Purakayastha, S. (2019). Conversion of clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A prospective multi-center study in Eastern India. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*, 5(2), 2055217319849721. <https://doi.org/10.1177/2055217319849721>
- Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R., & Carbone, F. R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and Cell Biology*, 76(1), 34-40. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1998.00709.x>
- Bar-Or, A., Pender, M. P., Khanna, R., Steinman, L., Hartung, H.-P., Maniar, T., Croze, E., Aftab, B. T., Giovannoni, G., & Joshi, M. A. (2020). Epstein Barr Virus in Multiple Sclerosis: Theory and Emerging Immunotherapies. *Trends in Molecular Medicine*, 26(3), 296-310. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.11.003>
- Becher, B., Bechmann, I., & Greter, M. (2006). Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: How T lymphocytes recognize the brain. *Journal of Molecular Medicine*, 84(7), 532-543. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0065-1>
- Beecham, A. H., Patsopoulos, N. A., Xifara, D. K., Davis, M. F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shahi, T. S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., Oturai, A., Saarela, J., Fontaine, B., Hemmer, B., Martin, C., Zipp, F., D'alfonso, S., Martinelli-Boneschi, F., Taylor, B., ... McCauley, J. L. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature genetics*, 45(11), 1353-1360. <https://doi.org/10.1038/ng.2770>
- Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E., & Tzoulaki, I. (2020). Environmental factors and risk of multiple sclerosis: Findings from meta-analyses and Mendelian randomization studies. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 26(4), 397-404. <https://doi.org/10.1177/1352458519872664>
- Ben Fredj, N., Rotola, A., Nefzi, F., Chebel, S., Rizzo, R., Caselli, E., Frih-Ayed, M., Di Luca, D., & Aouni, M. (2012). Identification of human herpesviruses 1 to 8 in Tunisian multiple sclerosis patients and healthy blood donors. *Journal of Neurovirology*, 18(1), 12-19. <https://doi.org/10.1007/s13365-011-0056-z>
- Ben-Zacharia, A. B. (2011). Therapeutics for multiple sclerosis symptoms. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 78(2), 176-191. <https://doi.org/10.1002/msj.20245>
- Berenshtein, A. J., Lorenzetti, M. A., & Preciado, M. V. (2018). Recombination rates along the entire Epstein Barr virus genome display a highly heterogeneous landscape. *Infection, Genetics and Evolution*, 65, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.022>
- Bessède, E., Molina, S., Acuña-Amador, L., Dubus, P., Staedel, C., Chambonnier, L., Buissonnière, A., Sifré, E., Giese, A., Bénéjat, L., Rousseau, B., Costet, P., Sacks, D. B., Mégraud, F., & Varon, C. (2016). Deletion of IQGAP1 promotes Helicobacter pylori-induced gastric dysplasia in mice and acquisition of cancer stem cell properties in vitro. *Oncotarget*, 7(49), 80688-80699.

- <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12486>
- Besson, C., Amiel, C., Le-Pendeven, C., Brice, P., Fermé, C., Carde, P., Hermine, O., Raphael, M., Abel, L., & Nicolas, J.-C. (2006). Positive Correlation between Epstein Barr Virus Viral Load and Anti-Viral Capsid Immunoglobulin G Titers Determined for Hodgkin's Lymphoma Patients and Their Relatives. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), 47-50. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.47-50.2006>
- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H. L., Linington, C., Sobel, R. A., & Kuchroo, V. K. (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(9), 1073-1081. <https://doi.org/10.1084/jem.20021603>
- Bhargava, P., Steele, S. U., Waubant, E., Revirajan, N. R., Marcus, J., Dembele, M., Cassard, S. D., Hollis, B. W., Crainiceanu, C., & Mowry, E. M. (2016). Multiple sclerosis patients have a diminished serologic response to vitamin D supplementation compared to healthy controls. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 22(6), 753-760. <https://doi.org/10.1177/1352458515600248>
- Bierhansl, L., Hartung, H.-P., Aktas, O., Ruck, T., Roden, M., & Meuth, S. G. (2022). Thinking outside the box: Non-canonical targets in multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00477-5>
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022a). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6578), 296-301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022b). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6578), 296-301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
- Bjornevik, K., Münz, C., Cohen, J. I., & Ascherio, A. (2023). Epstein–Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: Mechanisms and implications. *Nature Reviews Neurology*, 19(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00775-5>
- Blazquez, A. C., Berenstein, A. J., Torres, C., Izquierdo, A., Lezama, C., Moscatelli, G., De Matteo, E. N., Lorenzetti, M. A., & Preciado, M. V. (2021). Comprehensive Evolutionary Analysis of Complete Epstein Barr Virus Genomes from Argentina and Other Geographies. *Viruses*, 13(6), 1172. <https://doi.org/10.3390/v13061172>
- Bogosian, A., Morgan, M., & Moss-Morris, R. (2019). Multiple challenges for people after transitioning to secondary progressive multiple sclerosis: A qualitative study. *BMJ Open*, 9(3), e026421. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026421>
- Bonder, C. S., Clark, S. R., Norman, M. U., Johnson, P., & Kubes, P. (2006). Use of CD44 by CD4+

- Th1 and Th2 lymphocytes to roll and adhere. *Blood*, 107(12), 4798-4806. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3581>
- Bornkamm, G. W., & Hammerschmidt, W. (2001). Molecular virology of Epstein Barr virus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 356(1408), 437-459. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0781>
- Bourguignon, L. Y. W., Gilad, E., Rothman, K., & Peyrollier, K. (2005). Hyaluronan-CD44 Interaction with IQGAP1 Promotes Cdc42 and ERK Signaling, Leading to Actin Binding, Elk-1/Estrogen Receptor Transcriptional Activation, and Ovarian Cancer Progression*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11961-11972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411985200>
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Coglian, V., & WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. (2009). A review of human carcinogens--Part B: Biological agents. *The Lancet. Oncology*, 10(4), 321-322. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(09\)70096-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70096-8)
- Brady, G., MacArthur, G. J., & Farrell, P. J. (2007a). Epstein Barr virus and Burkitt lymphoma. *Journal of Clinical Pathology*, 60(12), 1397-1402. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.047977>
- Brady, G., MacArthur, G. J., & Farrell, P. J. (2007b). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Journal of Clinical Pathology*, 60(12), 1397-1402. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.047977>
- Brennan, R. M., Burrows, J. M., Bell, M. J., Bromham, L., Csurhes, P. A., Lenarczyk, A., Sverndal, J., Klintonstedt, J., Pender, M. P., & Burrows, S. R. (2010). Strains of Epstein Barr virus infecting multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 16(6), 643-651. <https://doi.org/10.1177/1352458510364537>
- Briercheck, E. L., Ravishankar, S., Ahmed, E. H., Carías Alvarado, C. C., Barrios Menéndez, J. C., Silva, O., Solórzano-Ortiz, E., Siliézar Tala, M. M., Stevenson, P., Xu, Y., Wohns, A. W., Enriquez-Vera, D., Barrionuevo, C., Yu, S.-C., Freud, A. G., Oakes, C., Weigel, C., Weinstock, D. M., Klimaszewski, H. L., ... Warren, E. H. (2024). Geographic EBV variants confound disease-specific variant interpretation and predict variable immune therapy responses. *Blood Advances*, 8(14), 3731-3744. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023012461>
- Briggs, M. W., & Sacks, D. B. (2003). IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Reports*, 4(6), 571-574. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor867>
- Brownlee, W. J., Swanton, J. K., Altmann, D. R., Ciccarelli, O., & Miller, D. H. (2015). Earlier and more frequent diagnosis of multiple sclerosis using the McDonald criteria. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 86(5), 584-585. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308675>
- Bu, G.-L., Xie, C., Kang, Y.-F., Zeng, M.-S., & Sun, C. (2022). How EBV Infects: The Tropism and Underlying Molecular Mechanism for Viral Infection. *Viruses*, 14(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/v14112372>

- Buckle, G. J., Höllsberg, P., & Hafler, D. A. (2003). Activated CD8+ T cells in secondary progressive MS secrete lymphotoxin. *Neurology*, 60(4), 702-705. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000048204.89346.30>
- Budd, R. C., Cerottini, J. C., Horvath, C., Bron, C., Pedrazzini, T., Howe, R. C., & MacDonald, H. R. (1987). Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 138(10), 3120-3129.
- Buljevac, D., van Doornum, G. J. J., Flach, H. Z., Groen, J., Osterhaus, A. D. M. E., Hop, W., van Doorn, P. A., van der Meché, F. G. A., & Hintzen, R. Q. (2005). Epstein Barr virus and disease activity in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 76(10), 1377-1381. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.048504>
- Burgoon, M. P., Cohrs, R. J., Bennett, J. L., Anderson, S. W., Ritchie, A. M., Cepok, S., Hemmer, B., Gilden, D., & Owens, G. P. (2009). Varicella zoster virus is not a disease-relevant antigen in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 65(4), 474-479. <https://doi.org/10.1002/ana.21605>
- Buschle, A., & Hammerschmidt, W. (2020). Epigenetic lifestyle of Epstein Barr virus. *Seminars in Immunopathology*, 42(2), 131-142. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00792-2>
- Calabresi, P. A., Radue, E.-W., Goodin, D., Jeffery, D., Rammohan, K. W., Reder, A. T., Vollmer, T., Agius, M. A., Kappos, L., Stites, T., Li, B., Cappiello, L., von Rosenstiel, P., & Lublin, F. D. (2014). Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet. Neurology*, 13(6), 545-556. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70049-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70049-3)
- Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*, 20(4), 202-213. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>
- Capasso, N., Virgilio, E., Covelli, A., Giovannini, B., Foschi, M., Montini, F., Nasello, M., Nilo, A., Prestipino, E., Schirò, G., Sperandei, S., Clerico, M., & Lanzillo, R. (2023). Aging in multiple sclerosis: From childhood to old age, etiopathogenesis, and unmet needs: a narrative review. *Frontiers in Neurology*, 14, 1207617. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1207617>
- Casiraghi, C., Citlali Márquez, A., Shanina, I., & Horwitz, M. S. (2015). Latent virus infection upregulates CD40 expression facilitating enhanced autoimmunity in a model of multiple sclerosis. *Scientific Reports*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep13995>
- Cassard, S. D., Fitzgerald, K. C., Qian, P., Emrich, S. A., Azevedo, C. J., Goodman, A. D., Sugar, E. A., Pelletier, D., Waubant, E., & Mowry, E. M. (2023). High-dose vitamin D3 supplementation in relapsing-remitting multiple sclerosis: A randomised clinical trial. *eClinicalMedicine*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.101957>
- Castellazzi, M., Delbue, S., Elia, F., Gastaldi, M., Franciotta, D., Rizzo, R., Bellini, T., Bergamaschi, R., Granieri, E., & Fainardi, E. (2015). Epstein Barr Virus Specific Antibody Response in

- Multiple Sclerosis Patients during 21 Months of Natalizumab Treatment. *Disease Markers*, 2015, 901312. <https://doi.org/10.1155/2015/901312>
- Cencioni, M. T., Mattoscio, M., Magliozzi, R., Bar-Or, A., & Muraro, P. A. (2021). B cells in multiple sclerosis—From targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nature Reviews Neurology*, 17(7), 399-414. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00498-5>
- Chabay, P. A., & Preciado, M. V. (2013). EBV primary infection in childhood and its relation to B-cell lymphoma development: A mini-review from a developing region. *International Journal of Cancer*, 133(6), 1286-1292. <https://doi.org/10.1002/ijc.27858>
- Chabay, P., Preciado, M. V., Chabay, P., & Preciado, M. V. (2016). Epidemiology of Epstein Barr virus-associated pediatric lymphomas from Argentina. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 73(1), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2015.12.002>
- Chakravorty, A., Sugden, B., & Johannsen, E. C. (2019). An Epigenetic Journey: Epstein Barr Virus Transcribes Chromatinized and Subsequently Unchromatinized Templates during Its Lytic Cycle. *Journal of Virology*, 93(8), e02247-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02247-18>
- Chakravorty, S., Afzali, B., & Kazemian, M. (2022). EBV-associated diseases: Current therapeutics and emerging technologies. *Frontiers in Immunology*, 13, 1059133. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1059133>
- Chan, K. C. A., Chu, S. W. I., & Lo, Y. M. D. (2018). Ambient Temperature and Screening for Nasopharyngeal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 378(10), 962-963. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1800433>
- Chang, C. M., Yu, K. J., Mbulaiteye, S. M., Hildesheim, A., & Bhatia, K. (2009). The extent of genetic diversity of Epstein Barr virus and its geographic and disease patterns: A need for reappraisal. *Virus Research*, 143(2), 209-221. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.005>
- Chao, Y., Jing, Y., Jia, Y., Wang, Y., Zhao, C., & Luo, B. (2011). Conservation and mutation of viral interleukin-10 gene in gastric carcinomas and nasopharyngeal carcinomas. *Journal of Medical Virology*, 83(4), 644-650. <https://doi.org/10.1002/jmv.22091>
- Chen, E., Barile, B., Durand-Dubief, F., Grenier, T., & Sappey-Marinier, D. (2023). Multiple sclerosis clinical forms classification with graph convolutional networks based on brain morphological connectivity. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1268860. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1268860>
- Chen, H., Lin, S., Wang, Y., Fu, S., Ma, Y., Xia, Q., & Lin, Y. (2022). Paper-based detection of Epstein Barr virus using asymmetric polymerase chain reaction and gold silicon particles. *Analytica Chimica Acta*, 1197, 339514. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339514>
- Chiara, M., Manzari, C., Lionetti, C., Mechelli, R., Anastasiadou, E., Chiara Buscarinu, M., Ristori, G., Salvetti, M., Picardi, E., D'Erchia, A. M., Pesole, G., & Horner, D. S. (2016). Geographic Population Structure in Epstein Barr Virus Revealed by Comparative Genomics. *Genome Biology and Evolution*, 8(11), 3284-3291. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw226>

- Chitnis, T. (2007). The Role of CD4 T Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. En *International Review of Neurobiology* (Vol. 79, pp. 43-72). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)79003-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)79003-7)
- Chiu, Y.-F., & Sugden, B. (2016). Epstein Barr Virus: The Path from Latent to Productive Infection. *Annual Review of Virology*, 3(1), 359-372. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042358>
- Choi, S., & Anderson, R. A. (2016). IQGAP1 is a phosphoinositide effector and kinase scaffold. *Advances in Biological Regulation*, 60, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.10.004>
- Choi, S. R., Howell, O. W., Carassiti, D., Magliozzi, R., Gveric, D., Muraro, P. A., Nicholas, R., Roncaroli, F., & Reynolds, R. (2012). Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 10), 2925-2937. <https://doi.org/10.1093/brain/aws189>
- Chua, M. L. K., Wee, J. T. S., Hui, E. P., & Chan, A. T. C. (2016). Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet (London, England)*, 387(10022), 1012-1024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00055-0)
- Chylińska, M., Komendziński, J., Wyszomirski, A., & Karaszewski, B. (2023). Brain Atrophy as an Outcome of Disease-Modifying Therapy for Relapsing-Relapsing Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis International*, 2023, 4130557. <https://doi.org/10.1155/2023/4130557>
- Cocuzza, C. E., Piazza, F., Musumeci, R., Oggioni, D., Andreoni, S., Gardinetti, M., Fusco, L., Frigo, M., Banfi, P., Rottoli, M. R., Confalonieri, P., Rezzonico, M., Ferrò, M. T., & Cavaletti, G. (2014). Quantitative Detection of Epstein Barr Virus DNA in Cerebrospinal Fluid and Blood Samples of Patients with Relapsing-Relapsing Multiple Sclerosis. *PLoS ONE*, 9(4), e94497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094497>
- Cohen, J. A., Barkhof, F., Comi, G., Hartung, H.-P., Khatri, B. O., Montalban, X., Pelletier, J., Capra, R., Gallo, P., Izquierdo, G., Tiel-Wilck, K., de Vera, A., Jin, J., Stites, T., Wu, S., Aradhye, S., Kappos, L., & TRANSFORMS Study Group. (2010). Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 362(5), 402-415. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907839>
- Comabella, M., Hegen, H., Villar, L. M., Rejdak, K., Sao-Avilés, A., Behrens, M., Sastre-Garriga, J., Mongay, N., Berek, K., Martínez-Yelamos, S., Pérez-Miralles, F., Abdelhak, A., Bachhuber, F., Tumani, H., Lycke, J., Carbonell-Mirabent, P., Valls-Carbó, A., Rosenstein, I., Alvarez-Lafuente, R., ... Lünemann, J. D. (2024). Increased EBNA1-specific antibody response in primary-progressive multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 272(1), 26. <https://doi.org/10.1007/s00415-024-12763-w>
- Comi, G., Bar-Or, A., Lassmann, H., Uccelli, A., Hartung, H.-P., Montalban, X., Sørensen, P. S., Hohlfeld, R., & Hauser, S. L. (2021). The role of B cells in Multiple Sclerosis and related disorders. *Annals of neurology*, 89(1), 13-23. <https://doi.org/10.1002/ana.25927>
- Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *The Lancet*, 372(9648), 1502-1517.

- [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)
- Correa, R. M., Fellner, M. D., Alonio, L. V., Durand, K., Teyssié, A. R., & Picconi, M. A. (2004). Epstein Barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *Journal of Medical Virology*, 73(4), 583-588. <https://doi.org/10.1002/jmv.20129>
- Correale, J., & Farez, M. F. (2015). The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Frontiers in Neurology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2015.00180>
- Correale, J., Ysraelit, M. C., & Gaitán, M. I. (2009). Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 132(Pt 5), 1146-1160. <https://doi.org/10.1093/brain/awp033>
- Correia, S., Bridges, R., Wegner, F., Venturini, C., Palser, A., Middeldorp, J. M., Cohen, J. I., Lorenzetti, M. A., Bassano, I., White, R. E., Kellam, P., Breuer, J., & Farrell, P. J. (2018). Sequence Variation of Epstein Barr Virus: Viral Types, Geography, Codon Usage, and Diseases. *Journal of Virology*, 92(22), e01132-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01132-18>
- Cortese, M., Riise, T., Bjørnevik, K., & Myhr, K.-M. (2018). Body size and physical exercise, and the risk of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 24(3), 270-278. <https://doi.org/10.1177/1352458517699289>
- Cossu, D., Yokoyama, K., & Hattori, N. (2018). Bacteria–Host Interactions in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02966>
- Coyle, P. K. (2021). What Can We Learn from Sex Differences in MS? *Journal of Personalized Medicine*, 11(10), 1006. <https://doi.org/10.3390/jpm11101006>
- Cristiano, E., Patrucco, L., Miguez, J., Giunta, D., Correale, J., Fiol, M., Ysraelit, M. C., Cáceres, F., Liguori, N. F., Saladino, M. L., Garcea, O., Silva, B., Alonso, R., Carrá, A., Curbelo, M. C., Martinez, A., Steinberg, J., Giachello, S., Melcom, M. O., & Rojas, J. I. (2016). Increasing prevalence of multiple sclerosis in Buenos Aires, Argentina. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 9, 91-94. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.07.007>
- Cristiano, E., & Rojas, J. I. (2017). Multiple sclerosis epidemiology in Latin America: An updated survey. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*, 3(2), 2055217317715050. <https://doi.org/10.1177/2055217317715050>
- Cristiano, E., Rojas, J., Romano, M., Frider, N., Machnicki, G., Giunta, D., Calegaro, D., Corona, T., Flores, J., Gracia, F., Macias-Islas, M., & Correale, J. (2013). The epidemiology of multiple sclerosis in Latin America and the Caribbean: A systematic review. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(7), 844-854. <https://doi.org/10.1177/1352458512462918>
- Crowley, A., Connell, J., Schaffer, K., Hall, W., & Hassan, J. (2012). Is There Diagnostic Value in Detection of Immunoglobulin G Antibodies to the Epstein–Barr Virus Early Antigen? *BioResearch Open Access*, 1(6), 291-296. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0274>
- Damania, B., Kenney, S. C., & Raab-Traub, N. (2022). Epstein Barr virus: Biology and clinical disease.

- Cell*, 185(20), 3652-3670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.026>
- Damilano, G., Juárez, M. C., Carballal, G., & Arana, R. A. (1992). Prevalence of anti-cytomegalovirus antibodies in a children population of Buenos Aires. *Medicina*, 52(2), 116-118.
- Dardiotis, E., Tsouris, Z., Aslanidou, P., Aloizou, A.-M., Sokratous, M., Provatas, A., Siokas, V., Deretzi, G., & Hadjigeorgiou, G. M. (2019). Body mass index in patients with Multiple Sclerosis: A meta-analysis. *Neurological Research*, 41(9), 836-846. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1622873>
- Daulagala, S. W. P. L., & Noordeen, F. (2018). Epidemiology and factors influencing varicella infections in tropical countries including Sri Lanka. *VirusDisease*, 29(3), 277-284. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0459-z>
- De la Tejera Hernández, C., Noyola, D. E., Sánchez Vargas, L. O., Nava Zárate, N., Cruz Mendoza, E. de la, Gómez Hernández, A., & Aranda Romo, S. (2015). Analysis of risk factors associated to cytomegalovirus infection in dentistry students. *Journal of Oral Research*, 4(3), 3.
- De Paschale, M., & Clerici, P. (2012). Serological diagnosis of Epstein Barr virus infection: Problems and solutions. *World Journal of Virology*, 1(1), 31-43. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.31>
- Delgado, E. R., Erickson, H. L., Tao, J., Monga, S. P., Duncan, A. W., & Anakk, S. (2021). Scaffolding Protein IQGAP1 Is Dispensable, but Its Overexpression Promotes Hepatocellular Carcinoma via YAP1 Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 41(4), e00596-20. <https://doi.org/10.1128/MCB.00596-20>
- DeLorenze, G. N., Munger, K. L., Lennette, E. T., Orentreich, N., Vogelmann, J. H., & Ascherio, A. (2006). Epstein Barr virus and multiple sclerosis: Evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Archives of Neurology*, 63(6), 839-844. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.6.noc50328>
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nri3871>
- Derakhshani, A., Asadzadeh, Z., Baradaran, B., Safarpour, H., Rahmani, S., Leone, P., Abdoli Shadbad, M., Hosseinkhani, N., Ghasemigol, M., Ayromlou, H., Ahmadi, H., Pouya, S., Shojaei, M., Tabrizi, N. J., Miraki Feriz, A., Safarzadeh, E., & Racanelli, V. (2022). The expression pattern of VISTA in the PBMCs of relapsing-remitting multiple sclerosis patients: A single-cell RNA sequencing-based study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 148, 112725. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112725>
- Dhaiban, S., Al-Ani, M., Elemam, N. M., Al-Aawad, M. H., Al-Rawi, Z., & Maghazachi, A. A. (2021). Role of Peripheral Immune Cells in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Sci*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/sci3010012>
- Dhib-Jalbut, S., & Marks, S. (2010). Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, 74 Suppl 1, S17-24. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c97d99>
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis – a review. *European Journal of Neurology*,

- 26(1), 27-40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- Dobson, R., Kuhle, J., Middelorp, J., & Giovannoni, G. (2017). Epstein Barr–negative MS: A true phenomenon? *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 4(2). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000318>
- Domínguez-Mozo, M. I., López-Lozano, L., Pérez-Pérez, S., García-Martínez, Á., Torrejón, M. J., Arroyo, R., & Álvarez-Lafuente, R. (2022). Epstein Barr Virus and multiple sclerosis in a Spanish cohort: A two-years longitudinal study. *Frontiers in Immunology*, 13, 991662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.991662>
- Dominguez-Mozo, M. I., Perez-Perez, S., Villarrubia, N., Costa-Frossard, L., Fernandez-Velasco, J. I., Ortega-Madueño, I., Garcia-Martinez, M. A., Garcia-Calvo, E., Estevez, H., Luque Garcia, J. L., Torrejon, M. J., Arroyo, R., Villar, L. M., & Alvarez-Lafuente, R. (2021). Herpesvirus Antibodies, Vitamin D and Short-Chain Fatty Acids: Their Correlation with Cell Subsets in Multiple Sclerosis Patients and Healthy Controls. *Cells*, 10(1), 119. <https://doi.org/10.3390/cells10010119>
- Donati, D. (2020). Viral infections and multiple sclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 32, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2020.02.003>
- Dörr, J., Bäcker-Koduah, P., Wernecke, K.-D., Becker, E., Hoffmann, F., Faiss, J., Brockmeier, B., Hoffmann, O., Anvari, K., Wuerfel, J., Piper, S. K., Bellmann-Strobl, J., Brandt, A. U., & Paul, F. (2020). High-dose vitamin D supplementation in multiple sclerosis—Results from the randomized EVIDIMS (efficacy of vitamin D supplementation in multiple sclerosis) trial. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*, 6(1), 2055217320903474. <https://doi.org/10.1177/2055217320903474>
- Dörr, J., & Paul, F. (2015). The Transition From First-Line to Second-Line Therapy in Multiple Sclerosis. *Current Treatment Options in Neurology*, 17(6), 25. <https://doi.org/10.1007/s11940-015-0354-5>
- Dowd, J. B., Palermo, T., Brite, J., McDade, T. W., & Aiello, A. (2013). Seroprevalence of Epstein Barr Virus Infection in U.S. Children Ages 6-19, 2003-2010. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064921>
- Du, R., Zhao, H., Yan, F., & Li, H. (2014). IL-17+Foxp3+ T cells: An intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(1), 39-48. <https://doi.org/10.1189/jlb.1RU0114-010RR>
- Duda, P. W., Schmied, M. C., Cook, S. L., Krieger, J. I., & Hafler, D. A. (2000). Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(7), 967-976. <https://doi.org/10.1172/JCI8970>
- Dudani, S. J., Kalhan, S., & Sharma, S. P. (2011). Vitamin D and multiple sclerosis: Potential pathophysiological role and clinical implications. *International Journal of Applied and Basic*

- Medical Research*, 1(2), 71-74. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.91146>
- Dupuy, S. L., Tauhid, S., Hurwitz, S., Chu, R., Yousuf, F., & Bakshi, R. (2016). The Effect of Dimethyl Fumarate on Cerebral Gray Matter Atrophy in Multiple Sclerosis. *Neurology and Therapy*, 5(2), 215-229. <https://doi.org/10.1007/s40120-016-0054-4>
- Dyer, Z., Tschärke, D., Sutton, I., & Massey, J. (2023). From bedside to bench: How existing therapies inform the relationship between Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. *Clinical & Translational Immunology*, 12(2), e1437. <https://doi.org/10.1002/cti2.1437>
- Dyment, D. A., Cader, M. Z., Chao, M. J., Lincoln, M. R., Morrison, K. M., Disanto, G., Morahan, J. M., Luca, G. C. D., Sadovnick, A. D., Lepage, P., Montpetit, A., Ebers, G. C., & Ramagopalan, S. V. (2012). Exome sequencing identifies a novel multiple sclerosis susceptibility variant in the TYK2 gene. *Neurology*, 79(5), 406-411. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182616fc4>
- Ehtesham, N., Rafie, M. Z., & Mosallaei, M. (2021). The global prevalence of familial multiple sclerosis: An updated systematic review and meta-analysis. *BMC Neurology*, 21(1), 246. <https://doi.org/10.1186/s12883-021-02267-9>
- Engelhardt, B., Comabella, M., & Chan, A. (2022). Multiple sclerosis: Immunopathological heterogeneity and its implications. *European Journal of Immunology*, 52(6), 869-881. <https://doi.org/10.1002/eji.202149757>
- Fadul, C. E., Mao-Draayer, Y., Ryan, K. A., Noelle, R. J., Wishart, H. A., Channon, J. Y., Kasper, I. R., Oliver, B., Mielcarz, D. W., & Kasper, L. H. (2021). Safety and Immune Effects of Blocking CD40 Ligand in Multiple Sclerosis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 8(6). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001096>
- Farez, M. F., Balbuena Aguirre, M. E., Varela, F., Köhler, A. A., Nagel, V., & Correale, J. (2014). Low familial risks for multiple sclerosis in Buenos Aires, Argentina. *Journal of the Neurological Sciences*, 346(1-2), 268-270. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.09.004>
- Farrell, P. J. (2019). Epstein Barr Virus and Cancer. *Annual Review of Pathology*, 14, 29-53. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023>
- Farrell, R. A., Antony, D., Wall, G. R., Clark, D. A., Fisniku, L., Swanton, J., Khaleeli, Z., Schmierer, K., Miller, D. H., & Giovannoni, G. (2009). Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology*, 73(1), 32-38. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181aa29fe>
- Fejerman, L., Carnese, F. R., Goicoechea, A. S., Avena, S. A., Dejean, C. B., & Ward, R. H. (2005). African ancestry of the population of Buenos Aires. *American Journal of Physical Anthropology*, 128(1), 164-170. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20083>
- Fernández-Fournier, M., López-Molina, M., Torres Iglesias, G., Botella, L., Chamorro, B., Laso-García, F., Puertas, I., Tallón Barranco, A., Otero-Ortega, L., Frank-García, A., & Díez-Tejedor, E. (2023). Antibody Content against Epstein–Barr Virus in Blood Extracellular Vesicles Correlates with Disease Activity and Brain Volume in Patients with Relapsing–Remitting Multiple

- Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms241814192>
- Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N., & Mills, K. H. G. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 162(1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x>
- Ford, J. L., & Stowe, R. P. (2013). Racial–ethnic differences in Epstein–Barr virus antibody titers among U.S. children and adolescents. *Annals of Epidemiology*, 23(5), 275-280. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2013.02.008>
- Fourcade, G., Germi, R., Guerber, F., Lupo, J., Baccard, M., Seigneurin, A., Semenova, T., Morand, P., & Epaulard, O. (2017). Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000–2016. *PLOS ONE*, 12(4), e0175574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175574>
- Fowler, K., Mucha, J., Neumann, M., Lewandowski, W., Kaczanowska, M., Grys, M., Schmidt, E., Natenshon, A., Talarico, C., Buck, P. O., & Diaz-Decaro, J. (2022). A systematic literature review of the global seroprevalence of cytomegalovirus: Possible implications for treatment, screening, and vaccine development. *BMC Public Health*, 22(1), 1659. <https://doi.org/10.1186/s12889-022-13971-7>
- Fragoso, Y. D., Wille, P. R., Abreu, M., Brooks, J. B. B., Dias, R. M., Duarte, J. A., Farage, L., Finkelsztejn, A., Frohlich, A. C., Goncalves, M. V. M., Guedes, B. V. S., Medeiros, L., Oliveira, R. A., Ribas, F. D., da Rocha, F. C. G., Santos, G. A. C., Scorcine, C., da Silva, G. L., Spedo, C. T., ... Brazilian Brain Volume Studies (B-BRAVOS) group. (2017). Correlation of clinical findings and brain volume data in multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 44, 155-157. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.06.006>
- Franciotta, D., Bestetti, A., Sala, S., Perucca, P., Jarius, S., Price, R. W., Di Stefano, A. L., & Cinque, P. (2009). Broad screening for human herpesviridae DNA in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum. *Acta Neurologica Belgica*, 109(4), 277-282.
- Frappier, L. (2021). Epstein Barr virus: Current questions and challenges. *Tumour Virus Research*, 12, 200218. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2021.200218>
- Fraussen, J., Claes, N., Van Wijmeersch, B., van Horsen, J., Stinissen, P., Hupperts, R., & Somers, V. (2016). B cells of multiple sclerosis patients induce autoreactive proinflammatory T cell responses. *Clinical Immunology*, 173, 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.10.001>
- Friberg, A., Thumann, S., Hennig, J., Zou, P., Nössner, E., Ling, P. D., Sattler, M., & Kempkes, B. (2015). The EBNA-2 N-Terminal Transactivation Domain Folds into a Dimeric Structure Required for Target Gene Activation. *PLOS Pathogens*, 11(5), e1004910. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004910>
- Frischer, J. M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C. F., Rauschka, H., Schmidbauer, M.,

- Laursen, H., Sorensen, P. S., & Lassmann, H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132(5), 1175-1189. <https://doi.org/10.1093/brain/awp070>
- Fu, N., Xie, F., Sun, Z., & Wang, Q. (2021). The OX40/OX40L Axis Regulates T Follicular Helper Cell Differentiation: Implications for Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.670637>
- Fu, Y., Lin, Q., Zhang, Z., & Zhang, L. (2020). Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 10(3), 414-433. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.010>
- Fujii, C., Kondo, T., Ochi, H., Okada, Y., Hashi, Y., Adachi, T., Shin-Ya, M., Matsumoto, S., Takahashi, R., Nakagawa, M., & Mizuno, T. (2016). Altered T cell phenotypes associated with clinical relapse of multiple sclerosis patients receiving fingolimod therapy. *Scientific Reports*, 6(1), 35314. <https://doi.org/10.1038/srep35314>
- Fujinami, R. S., von Herrath, M. G., Christen, U., & Whitton, J. L. (2006). Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 80-94. <https://doi.org/10.1128/cmr.19.1.80-94.2006>
- Gafson, A. R., Kim, K., Cencioni, M. T., van Hecke, W., Nicholas, R., Baranzini, S. E., & Matthews, P. M. (2018). Mononuclear cell transcriptome changes associated with dimethyl fumarate in MS. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 5(4), e470. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000470>
- Gajofatto, A., & Benedetti, M. D. (2015). Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, 3(7), 545-555. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i7.545>
- Gantuz, M., Lorenzetti, M. A., Chabay, P. A., & Preciado, M. V. (2017). A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PloS One*, 12(3), e0174221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174221>
- Gärtner, B. C., Hess, R. D., Bandt, D., Kruse, A., Rethwilm, A., Roemer, K., & Mueller-Lantzsch, N. (2003). Evaluation of four commercially available Epstein Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(1), 78-82. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.1.78-82.2003>
- Gershon, A. A., Breuer, J., Cohen, J. I., Cohrs, R. J., Gershon, M. D., Gilden, D., Grose, C., Hambleton, S., Kennedy, P. G. E., Oxman, M. N., Seward, J. F., & Yamanishi, K. (2015). Varicella zoster virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.16>
- Ghasemi, N., Razavi, S., & Nikzad, E. (2017). Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell Journal (Yakhteh)*, 19(1), 1-10.
- Gianfrancesco, M. A., Glymour, M. M., Walter, S., Rhead, B., Shao, X., Shen, L., Quach, H., Hubbard,

- A., Jónsdóttir, I., Stefánsson, K., Strid, P., Hillert, J., Hedström, A., Olsson, T., Kockum, I., Schaefer, C., Alfredsson, L., & Barcellos, L. F. (2017). Causal Effect of Genetic Variants Associated With Body Mass Index on Multiple Sclerosis Susceptibility. *American Journal of Epidemiology*, 185(3), 162-171. <https://doi.org/10.1093/aje/kww120>
- Gieß, R. M., Pfuhl, C., Behrens, J. R., Rasche, L., Freitag, E., Khalighy, N., Otto, C., Wuerfel, J., Brandt, A. U., Hofmann, J., Eberspächer, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., & Ruprecht, K. (2017a). Epstein Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLOS ONE*, 12(4), e0175279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279>
- Gieß, R. M., Pfuhl, C., Behrens, J. R., Rasche, L., Freitag, E., Khalighy, N., Otto, C., Wuerfel, J., Brandt, A. U., Hofmann, J., Eberspächer, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., & Ruprecht, K. (2017b). Epstein Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 12(4), e0175279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279>
- Giovannoni, G., Butzkueven, H., Dhib-Jalbut, S., Hobart, J., Kobelt, G., Pepper, G., Sormani, M. P., Thalheim, C., Traboulsee, A., & Vollmer, T. (2016). Brain health: Time matters in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 9 Suppl 1, S5-S48. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.07.003>
- Glaser, L. V., Rieger, S., Thumann, S., Beer, S., Kuklik-Roos, C., Martin, D. E., Maier, K. C., Harth-Hertle, M. L., Grüning, B., Backofen, R., Krebs, S., Blum, H., Zimmer, R., Erhard, F., & Kempkes, B. (2017). EBF1 binds to EBNA2 and promotes the assembly of EBNA2 chromatin complexes in B cells. *PLOS Pathogens*, 13(10), e1006664. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006664>
- Gold, S. M., Willing, A., Leypoldt, F., Paul, F., & Friese, M. A. (2019). Sex differences in autoimmune disorders of the central nervous system. *Seminars in Immunopathology*, 41(2), 177-188. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0723-8>
- Goodin, D. S. (2009). The causal cascade to multiple sclerosis: A model for MS pathogenesis. *PLoS One*, 4(2), e4565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004565>
- Goodin, D. S., Khankhanian, P., Gourraud, P.-A., & Vince, N. (2021). The nature of genetic and environmental susceptibility to multiple sclerosis. *PLOS ONE*, 16(3), e0246157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246157>
- Gorman, J. A., Babich, A., Dick, C. J., Schoon, R. A., Koenig, A., Gomez, T. S., Burkhardt, J. K., & Billadeau, D. D. (2012a). The Cytoskeletal Adaptor Protein IQGAP1 Regulates TCR-mediated Signaling and F-actin Dynamics. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(12), 6135-6144. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103487>
- Gorman, J. A., Babich, A., Dick, C. J., Schoon, R. A., Koenig, A., Gomez, T. S., Burkhardt, J. K., & Billadeau, D. D. (2012b). The Cytoskeletal Adaptor Protein IQGAP1 Regulates TCR-Mediated

- Signaling and Filamentous Actin Dynamics. *The Journal of Immunology*, 188(12), 6135-6144. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103487>
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature reviews. Immunology*, 9(6), 393. <https://doi.org/10.1038/nri2550>
- Greenfield, A. L., & Hauser, S. L. (2018). B Cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an Era. *Annals of neurology*, 83(1), 13-26. <https://doi.org/10.1002/ana.25119>
- Greter, M., Heppner, F. L., Lemos, M. P., Odermatt, B. M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R. J., & Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nm1197>
- Griffiths, P., Baraniak, I., & Reeves, M. (2015). The pathogenesis of human cytomegalovirus: Pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of Pathology*, 235(2), 288-297. <https://doi.org/10.1002/path.4437>
- Grigoriadis, N., & van Pesch, V. (2015). A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European Journal of Neurology*, 22(S2), 3-13. <https://doi.org/10.1111/ene.12798>
- Gross, T. G., Savoldo, B., & Punnett, A. (2010). Posttransplant lymphoproliferative diseases. *Pediatric Clinics of North America*, 57(2), 481-503, table of contents. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2010.01.011>
- Gruffat, H., Marchione, R., & Manet, E. (2016). Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00869>
- Grut, V., Biström, M., Salzer, J., Stridh, P., Jons, D., Gustafsson, R., Fogdell-Hahn, A., Huang, J., Brenner, N., Butt, J., Bender, N., Lindam, A., Alonso-Magdalena, L., Gunnarsson, M., Vrethem, M., Bergström, T., Andersen, O., Kockum, I., Waterboer, T., ... Sundström, P. (2021). Cytomegalovirus seropositivity is associated with reduced risk of multiple sclerosis—A presymptomatic case-control study. *European Journal of Neurology*, 28(9), 3072-3079. <https://doi.org/10.1111/ene.14961>
- Guan, H., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2009). Role of CD44 in the differentiation of Th1 and Th2 cells: CD44-deficiency enhances the development of Th2 effectors in response to sheep RBC and chicken ovalbumin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(1), 172-180. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802325>
- Guan, H., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2011). CD44 reciprocally regulates the differentiation of encephalitogenic Th1/Th17 and Th2/Treg cells through epigenetic modulation involving DNA methylation of cytokine gene promoters thereby controlling the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(12), 6955-6964. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004043>
- Guan, Y., Jakimovski, D., Ramanathan, M., Weinstock-Guttman, B., & Zivadinov, R. (2019). The role of Epstein Barr virus in multiple sclerosis: From molecular pathophysiology to in vivo imaging.

- Neural Regeneration Research*, 14(3), 373-386. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.245462>
- Gulley, M. L., & Tang, W. (2008). Laboratory assays for Epstein Barr virus-related disease. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 10(4), 279-292. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080023>
- Gulley, M. L., & Tang, W. (2010). Using Epstein Barr Viral Load Assays To Diagnose, Monitor, and Prevent Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 350-366. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-09>
- Gupta, M., & Shorman, M. (2023). Cytomegalovirus. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459185/>
- Hagman, E., Putri, R. R., Danielsson, P., & Marcus, C. (2025). Pediatric obesity and the risk of multiple sclerosis: A nationwide prospective cohort study. *International Journal of Obesity*, 1-6. <https://doi.org/10.1038/s41366-025-01727-3>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41(41), 95-98. <https://www.academia.edu/download/29520866/1999hall1.pdf>
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Dobson, R., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2011). Smoking and Multiple Sclerosis: An Updated Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 6(1), e16149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016149>
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Handunnetthi, L., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2010). An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PloS One*, 5(9), e12496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012496>
- Handunnetthi, L., Ramagopalan, S. V., & Ebers, G. C. (2010). Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1*15. *Neurology*, 74(23), 1905-1910. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181e24124>
- Hanley, P. J., & Bollard, C. M. (2014). Controlling Cytomegalovirus: Helping the Immune System Take the Lead. *Viruses*, 6(6), 2242-2258. <https://doi.org/10.3390/v6062242>
- Hansen, T., Skytthe, A., Stenager, E., Petersen, H. C., Brønnum-Hansen, H., & Kyvik, K. O. (2005). Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: An update of a nationwide study. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 11(5), 504-510. <https://doi.org/10.1191/1352458505ms1220oa>
- Harbo, H. F., Gold, R., & Tintoré, M. (2013). Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(4), 237-248. <https://doi.org/10.1177/1756285613488434>
- Harirchian, M. H., Fatehi, F., Sarraf, P., Honarvar, N. M., & Bitarafan, S. (2018). Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 20, 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.12.015>
- Harroud, A., Manousaki, D., Butler-Laporte, G., Mitchell, R. E., Davey Smith, G., Richards, J. B., & Baranzini, S. E. (2021). The relative contributions of obesity, vitamin D, leptin, and adiponectin to multiple sclerosis risk: A Mendelian randomization mediation analysis. *Multiple Sclerosis*

- (Houndmills, Basingstoke, England), 27(13), 1994-2000.
<https://doi.org/10.1177/1352458521995484>
- Hassani, A., Corboy, J. R., Al-Salam, S., & Khan, G. (2018). Epstein Barr virus is present in the brain of most cases of multiple sclerosis and may engage more than just B cells. *PLOS ONE*, 13(2), e0192109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192109>
- Hauser, S. L., & Cree, B. A. C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *The American Journal of Medicine*, 133(12), 1380-1390.e2. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>
- Häusser-Kinzel, S., & Weber, M. S. (2019). The Role of B Cells and Antibodies in Multiple Sclerosis, Neuromyelitis Optica, and Related Disorders. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00201>
- He, Y.-Q., Liao, X.-Y., Xue, W.-Q., Xu, Y.-F., Xu, F.-H., Li, F.-F., Li, X.-Z., Zhang, J.-B., Wang, T.-M., Wang, F., Yu, H.-L., Feng, Q.-S., Chen, L.-Z., Cao, S.-M., Liu, Q., Mu, J., & Jia, W.-H. (2019). Association Between Environmental Factors and Oral Epstein Barr Virus DNA Loads: A Multicenter Cross-sectional Study in China. *The Journal of Infectious Diseases*, 219(3), 400-409. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy542>
- He, Y.-Q., Xue, W.-Q., Xu, F.-H., Xu, Y.-F., Zhang, J.-B., Yu, H.-L., Feng, Q.-S., Chen, L.-Z., Cao, S.-M., Liu, Q., Mu, J., Zeng, Y.-X., & Jia, W.-H. (2018). The Relationship Between Environmental Factors and the Profile of Epstein Barr Virus Antibodies in the Lytic and Latent Infection Periods in Healthy Populations from Endemic and Non-Endemic Nasopharyngeal Carcinoma Areas in China. *EBioMedicine*, 30, 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.019>
- Healy, B. C., Ali, E. N., Guttman, C. R. G., Chitnis, T., Glanz, B. I., Buckle, G., Houtchens, M., Stazzone, L., Moodie, J., Berger, A. M., Duan, Y., Bakshi, R., Khoury, S., Weiner, H., & Ascherio, A. (2009). Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, 66(7), 858-864. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.122>
- Hebert, J. D., Tian, C., Lamar, J. M., Rickelt, S., Abbruzzese, G., Liu, X., & Hynes, R. O. (2020). The scaffold protein IQGAP1 is crucial for extravasation and metastasis. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59438-w>
- Hedman, A. C., Smith, J. M., & Sacks, D. B. (2015). The biology of IQGAP proteins: Beyond the cytoskeleton. *EMBO Reports*, 16(4), 427-446. <https://doi.org/10.15252/embr.201439834>
- Hedström, A. K. (2023). Risk factors for multiple sclerosis in the context of Epstein Barr virus infection. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1212676>
- Hedström, A. K., Brenner, N., Butt, J., Hillert, J., Waterboer, T., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2020). Overweight/obesity in young adulthood interacts with aspects of EBV infection in MS etiology. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 8(1), e912. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000912>
- Hedström, A. K., Hillert, J., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2013). Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *European Journal of Epidemiology*, 28(11), 867-874.

- <https://doi.org/10.1007/s10654-013-9853-4>
- Hedström, A. K., Huang, J., Brenner, N., Butt, J., Hillert, J., Waterboer, T., Kockum, I., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2020). Smoking and Epstein–Barr virus infection in multiple sclerosis development. *Scientific Reports*, *10*, 10960. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67883-w>
- Hedström, A. K., Huang, J., Michel, A., Butt, J., Brenner, N., Hillert, J., Waterboer, T., Kockum, I., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2019). High Levels of Epstein Barr Virus Nuclear Antigen-1-Specific Antibodies and Infectious Mononucleosis Act Both Independently and Synergistically to Increase Multiple Sclerosis Risk. *Frontiers in Neurology*, *10*, 1368. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01368>
- Hedström, A. K., Lima Bomfim, I., Barcellos, L., Gianfrancesco, M., Schaefer, C., Kockum, I., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2014). Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. *Neurology*, *82*(10), 865-872. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000203>
- Hedström, A. K., Lima Bomfim, I., Hillert, J., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2015). Obesity interacts with infectious mononucleosis in risk of multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, *22*(3), 578-e38. <https://doi.org/10.1111/ene.12620>
- Hensel, J., Duex, J. E., Owens, C., Dancik, G. M., Edwards, M. G., Frierson, H. F., & Theodorescu, D. (2015). Patient Mutation Directed shRNA Screen Uncovers Novel Bladder Tumor Growth Suppressors. *Molecular Cancer Research: MCR*, *13*(9), 1306-1315. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0130>
- Hernán, M. A., Jick, S. S., Logroscino, G., Olek, M. J., Ascherio, A., & Jick, H. (2005). Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, *128*(Pt 6), 1461-1465. <https://doi.org/10.1093/brain/awh471>
- Hess, R. D. (2004). Routine Epstein Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: Still challenging after 35 years. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(8), 3381-3387. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3381-3387.2004>
- Hidden Disabilities in Multiple Sclerosis – The Impact of Multiple Sclerosis on Patients and their Caregivers. (2013). *European Neurological Review*,. <https://touchneurology.com/multiple-sclerosis/journal-articles/hidden-disabilities-in-multiple-sclerosis-the-impact-of-multiple-sclerosis-on-patients-and-their-caregivers/>
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., & Rickinson, A. B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: Lessons from Epstein Barr virus. *Annual Review of Immunology*, *25*, 587-617. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141553>
- Høglund, R. A. A., Meyer, H. E., Stigum, H., Torkildsen, Ø., Grytten, N., Holmøy, T., & Nakken, O. (2021). Association of Body Mass Index in Adolescence and Young Adulthood and Long-term Risk of Multiple Sclerosis: A Population-Based Study. *Neurology*, *97*(23), e2253-e2261. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000012957>

- Hollenbach, J. A., & Oksenberg, J. R. (2015). The Immunogenetics of Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Journal of autoimmunity*, 64, 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.06.010>
- Hoover, K., & Higginbotham, K. (2023). Epstein Barr Virus. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559285/>
- Horakova, D., Zivadinov, R., Weinstock-Guttman, B., Havrdova, E., Qu, J., Tamaño-Blanco, M., Badgett, D., Tyblova, M., Bergsland, N., Hussein, S., Willis, L., Krasensky, J., Vaneckova, M., Seidl, Z., Lelkova, P., Dwyer, M. G., Zhang, M., Yu, H., Duan, X., ... Ramanathan, M. (2013). Environmental Factors Associated with Disease Progression after the First Demyelinating Event: Results from the Multi-Center SET Study. *PLOS ONE*, 8(1), e53996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053996>
- Howell, O. W., Reeves, C. A., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S. M., Serafini, B., Aloisi, F., Roncaroli, F., Magliozzi, R., & Reynolds, R. (2011). Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 134(Pt 9), 2755-2771. <https://doi.org/10.1093/brain/awr182>
- Howell, O. W., Schulz-Trieglaff, E. K., Carassiti, D., Gentleman, S. M., Nicholas, R., Roncaroli, F., & Reynolds, R. (2015). Extensive grey matter pathology in the cerebellum in multiple sclerosis is linked to inflammation in the subarachnoid space. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41(6), 798-813. <https://doi.org/10.1111/nan.12199>
- Hrvatin, S., Deng, F., O'Donnell, C. W., Gifford, D. K., & Melton, D. A. (2014). MARIS: Method for Analyzing RNA following Intracellular Sorting. *PLOS ONE*, 9(3), e89459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089459>
- Hsu, C.-L., Chang, Y.-S., & Li, H.-P. (2024). Molecular Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma: Past and Future. *Biomedical Journal*, 100748. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2024.100748>
- Hsu, W.-L., Chien, Y.-C., Huang, Y.-T., Yu, K. J., Ko, J.-Y., Lin, C.-Y., Tsou, Y.-A., Leu, Y.-S., Liao, L.-J., Chang, Y.-L., Su, J.-Y., Liu, Z., Wang, C.-P., Terng, S.-D., Hua, C.-H., Lee, J.-C., Yang, T.-L., Kate Hsiao, C.-H., Wu, M.-S., ... GEV-NPC Study Group. (2020). Cigarette smoking increases the risk of nasopharyngeal carcinoma through the elevated level of IgA antibody against Epstein Barr virus capsid antigen: A mediation analysis. *Cancer Medicine*, 9(5), 1867-1876. <https://doi.org/10.1002/cam4.2832>
- Hu, T., Lin, C.-Y., Xie, S.-H., Chen, G.-H., Lu, Y.-Q., Ling, W., Huang, Q.-H., Liu, Q., & Cao, S.-M. (2019). Smoking can increase nasopharyngeal carcinoma risk by repeatedly reactivating Epstein Barr Virus: An analysis of a prospective study in southern China. *Cancer Medicine*, 8(5), 2561-2571. <https://doi.org/10.1002/cam4.2083>
- Huang, J., Kockum, I., & Stridh, P. (2022). Trends in the environmental risks associated with earlier onset in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 68, 104250. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.104250>

- Huang, J., Pang, W. S., Lok, V., Zhang, L., Lucero-Prisno, D. E., Xu, W., Zheng, Z.-J., Elcarte, E., Withers, M., & Wong, M. C. S. (2022). Incidence, mortality, risk factors, and trends for Hodgkin lymphoma: A global data analysis. *Journal of Hematology & Oncology*, 15, 57. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01281-9>
- Huang, W., Bai, L., & Tang, H. (2023). Epstein Barr virus infection: The micro and macro worlds. *Virology Journal*, 20(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02187-9>
- Humans, I. W. G. on the E. of C. R. to. (1997). *Epstein Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8*. International Agency for Research on Cancer.
- Humans, I. W. G. on the E. of C. R. to. (2012). EPSTEIN BARR VIRUS. En *Biological Agents*. International Agency for Research on Cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304353/>
- Hupperts, R., Smolders, J., Vieth, R., Holmøy, T., Marhardt, K., Schluep, M., Killestein, J., Barkhof, F., Beelke, M., Grimaldi, L. M. E., & SOLAR Study Group. (2019). Randomized trial of daily high-dose vitamin D3 in patients with RRMS receiving subcutaneous interferon β -1a. *Neurology*, 93(20), e1906-e1916. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008445>
- Huseby, E. S., Huseby, P. G., Shah, S., Smith, R., & Stadinski, B. D. (2012). Pathogenic CD8 T Cells in Multiple Sclerosis and Its Experimental Models. *Frontiers in Immunology*, 3, 64. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00064>
- Hussain, S. G., Aziz, A., & Bakir, S. H. (2019). Study of Association between Cytomegalovirus Infection and Multiple Sclerosis. *Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences*, 27(6), 107-114.
- Iaffaldano, P., Simone, M., Lucisano, G., Ghezzi, A., Coniglio, G., Brescia Morra, V., Salemi, G., Patti, F., Lugaresi, A., Izquierdo, G., Bergamaschi, R., Cabrera-Gomez, J. A., Pozzilli, C., Millefiorini, E., Alroughani, R., Boz, C., Pucci, E., Zimatore, G. B., Sola, P., ... Italian iMedWeb Registry and the MSBase Registry. (2017). Prognostic indicators in pediatric clinically isolated syndrome. *Annals of Neurology*, 81(5), 729-739. <https://doi.org/10.1002/ana.24938>
- Ifergan, I., Kebir, H., Alvarez, J. I., Marceau, G., Bernard, M., Bourbonnière, L., Poirier, J., Duquette, P., Talbot, P. J., Arbour, N., & Prat, A. (2011). Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on α 4 integrin. *Brain*, 134(12), 3560-3577. <https://doi.org/10.1093/brain/awr268>
- Ingram, G., Bugert, J. J., Loveless, S., & Robertson, N. P. (2010). Anti-EBNA-1 IgG is not a reliable marker of multiple sclerosis clinical disease activity. *European Journal of Neurology*, 17(11), 1386-1389. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03083.x>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. (2019a). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6460), eaav7188. <https://doi.org/10.1126/science.aav7188>

- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. (2019b). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6460), eaav7188. <https://doi.org/10.1126/science.aav7188>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C. A., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S. E., Edkins, S., Gray, E., Booth, D. R., Potter, S. C., Goris, A., Band, G., Oturai, A. B., ... Compston, A. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476(7359), 214-219. <https://doi.org/10.1038/nature10251>
- Jackson, M., & Short, S. E. (2018). Gender Differences in Biological Function in Young Adulthood: An Intragenerational Perspective. *The Russell Sage Foundation journal of the social sciences : RSF*, 4(4), 98-119. <https://doi.org/10.7758/rsf.2018.4.4.06>
- Jacobs, B. M., Noyce, A. J., Giovannoni, G., & Dobson, R. (2020). BMI and low vitamin D are causal factors for multiple sclerosis: A Mendelian Randomization study. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 7(2), e662. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000662>
- Jain, R. W., & Yong, V. W. (2022). B cells in central nervous system disease: Diversity, locations and pathophysiology. *Nature Reviews Immunology*, 22(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00652-6>
- Jakimovski, D., Bittner, S., Zivadinov, R., Morrow, S. A., Benedict, R. H., Zipp, F., & Weinstock-Guttman, B. (2024). Multiple sclerosis. *The Lancet*, 403(10422), 183-202. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01473-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01473-3)
- Jameson, K. L., Mazur, P. K., Zehnder, A. M., Zhang, J., Zarnegar, B., Sage, J., & Khavari, P. A. (2013). IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors. *Nature Medicine*, 19(5), 626-630. <https://doi.org/10.1038/nm.3165>
- Jansen, M. A. E., van den Heuvel, D., Bouthoorn, S. H., Jaddoe, V. W. V., Hooijkaas, H., Raat, H., Fraaij, P. L. A., van Zelm, M. C., & Moll, H. A. (2016). Determinants of Ethnic Differences in Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus, and Herpes Simplex Virus Type 1 Seroprevalence in Childhood. *The Journal of Pediatrics*, 170, 126-134.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.11.014>
- Jayasooriya, S., Silva, T. I. de, Njie-jobe, J., Sanyang, C., Leese, A. M., Bell, A. I., McAulay, K. A., Yanchun, P., Long, H. M., Dong, T., Whittle, H. C., Rickinson, A. B., Rowland-Jones, S. L., Hislop, A. D., & Flanagan, K. L. (2015). Early Virological and Immunological Events in Asymptomatic Epstein Barr Virus Infection in African Children. *PLOS Pathogens*, 11(3), e1004746. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004746>
- Jilek, S., Schluep, M., Meylan, P., Vingerhoets, F., Guignard, L., Monney, A., Kleeberg, J., Le Goff, G., Pantaleo, G., & Du Pasquier, R. A. (2008). Strong EBV-specific CD8+ T-cell response in

- patients with early multiple sclerosis. *Brain*, 131(7), 1712-1721. <https://doi.org/10.1093/brain/awn108>
- Jochum, S., Moosmann, A., Lang, S., Hammerschmidt, W., & Zeidler, R. (2012). The EBV Immuneoevasins vIL-10 and BNLF2a Protect Newly Infected B Cells from Immune Recognition and Elimination. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002704. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002704>
- Jog, N. R., Chakravarty, E. F., Guthridge, J. M., & James, J. A. (2018). Epstein Barr Virus Interleukin 10 Suppresses Anti-inflammatory Phenotype in Human Monocytes. *Frontiers in Immunology*, 9, 2198. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02198>
- Kanakry, J. A., Hegde, A. M., Durand, C. M., Massie, A. B., Greer, A. E., Ambinder, R. F., & Valsamakis, A. (2016). The clinical significance of EBV DNA in the plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with or without EBV diseases. *Blood*, 127(16), 2007-2017. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-672030>
- Kanda, T., Yajima, M., & Ikuta, K. (2019). Epstein Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Science*, 110(4), 1132-1139. <https://doi.org/10.1111/cas.13954>
- Karampoor, S., Zahednasab, H., Ramagopalan, S., Mehrpour, M., Etemadifar, M., Alsahebhosoul, F., & Keyvani, H. (2017). Cytomegalovirus and varicella zoster virus seropositivity of Iranian patients with multiple sclerosis: A population-based study. *Journal of Neuroimmunology*, 309, 4-6. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.04.004>
- Karlsson, E. A., & Beck, M. A. (2010). The burden of obesity on infectious disease. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 235(12), 1412-1424. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010227>
- Keane, J. T., Afrasiabi, A., Schibeci, S. D., Swaminathan, S., Parnell, G. P., & Booth, D. R. (2021). The interaction of Epstein Barr virus encoded transcription factor EBNA2 with multiple sclerosis risk loci is dependent on the risk genotype. *EBioMedicine*, 71, 103572. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103572>
- Kearney, H., Altmann, D. R., Samson, R. S., Yiannakas, M. C., Wheeler-Kingshott, C. A. M., Ciccarelli, O., & Miller, D. H. (2015). Cervical cord lesion load is associated with disability independently from atrophy in MS. *Neurology*, 84(4), 367-373. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001186>
- Keményová, P., Siarnik, P., Sutovský, S., Blaho, A., Turcáni, P., & Kollár, B. (2015). Impairment of endothelial function in patients with multiple sclerosis. *Neuro Endocrinology Letters*, 36(1), 67-71.
- Keshari, P. K., Harbo, H. F., Myhr, K.-M., Aarseth, J. H., Bos, S. D., & Berge, T. (2016). Allelic imbalance of multiple sclerosis susceptibility genes IKZF3 and IQGAP1 in human peripheral blood. *BMC Genetics*, 17, 59. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0367-4>
- Khalesi, Z., Tamrchi, V., Razizadeh, M. H., Letafati, A., Moradi, P., Habibi, A., Habibi, N., Heidari, J.,

- Noori, M., Nahid Samiei, M., Azarash, Z., Hoseini, M., Saadati, H., Bahavar, A., Farajzade, M., Saeb, S., Hadadi, M., Sorouri Majd, M., Mothlaghzadeh, S., ... Ghorbani, S. (2023). Association between human herpesviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 177, 106031. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106031>
- Kingwell, E., Leray, E., Zhu, F., Petkau, J., Edan, G., Oger, J., & Tremlett, H. (2019). Multiple sclerosis: Effect of beta interferon treatment on survival. *Brain: A Journal of Neurology*, 142(5), 1324-1333. <https://doi.org/10.1093/brain/awz055>
- Kinnunen, T., Chamberlain, N., Morbach, H., Cantaert, T., Lynch, M., Preston-Hurlburt, P., Herold, K. C., Hafler, D. A., O'Connor, K. C., & Meffre, E. (2013). Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(6), 2737-2741. <https://doi.org/10.1172/JCI68775>
- Kister, A., & Kister, I. (2023). Overview of myelin, major myelin lipids, and myelin-associated proteins. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.1041961>
- Klaren, R. E., Sandroff, B. M., Fernhall, B., & Motl, R. W. (2016). Comprehensive Profile of Cardiopulmonary Exercise Testing in Ambulatory Persons with Multiple Sclerosis. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 46(9), 1365-1379. <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0472-6>
- Klineova, S., & Lublin, F. D. (2018). Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(9), a028928. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028928>
- Kofahi, R. M., Kofahi, H. M., Sabaheen, S., Qawasmeh, M. A., Momani, A., Yassin, A., Alhayk, K., & El-Salem, K. (2020). Prevalence of seropositivity of selected herpesviruses in patients with multiple sclerosis in the North of Jordan. *BMC Neurology*, 20, 397. <https://doi.org/10.1186/s12883-020-01977-w>
- Kohler, M., Kohler, E., Vrech, C., Pappolla, A., Míguez, J., Patrucco, L., Correale, J., Marrodan, M., Gaitán, M. I., Fiol, M., Negrotto, L., Ysraelit, M. C., Cristiano, E., Carrá, A., Steinberg, J., Martinez, A. D., Curbelo, M. C., Cohen, L., Alonso, R., ... Rojas, J. I. (2021). Aggressive multiple sclerosis in Argentina: Data from the nationwide registry RelevEM. *Journal of Clinical Neuroscience*, 89, 360-364. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2021.05.047>
- Kolčava, J., Kočica, J., Hulová, M., Dušek, L., Horáková, M., Keřkovský, M., Stulík, J., Dostál, M., Kuhn, M., Vlčková, E., Bednařík, J., & Benešová, Y. (2020). Conversion of clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A prospective study. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 44, 102262. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102262>
- Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J. A., & Takayanagi, H. (2014). Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nature Medicine*, 20(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nm.3432>
- Kõressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., & Remm, M. (2018). Primer3_masker: Integrating masking of template sequence with primer design software.

- Bioinformatics* (Oxford, England), 34(11), 1937-1938.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty036>
- Kozin, M., Kiselev, I., Baulina, N., Kabaeva, A., Pavlova, G., Boyko, A., Favorova, O., & Kulakova, O. (2022). Global transcriptome profiling in peripheral blood mononuclear cells identifies dysregulation of immune processes in individuals with radiologically isolated syndrome. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 58, 103469.
<https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103469>
- Kuchroo, V. K., & Weiner, H. L. (2022). How does Epstein Barr virus trigger MS? *Immunity*, 55(3), 390-392. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.02.008>
- Kuhle, J., Disanto, G., Dobson, R., Adiutori, R., Bianchi, L., Topping, J., Bestwick, J. P., Meier, U.-C., Marta, M., Dalla Costa, G., Runia, T., Evdoshenko, E., Lazareva, N., Thouvenot, E., Iaffaldano, P., Drenzo, V., Khademi, M., Piehl, F., Comabella, M., ... Giovannoni, G. (2015). Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Multiple Sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England), 21(8), 1013-1024.
<https://doi.org/10.1177/1352458514568827>
- Kuhlmann, T., Moccia, M., Coetzee, T., Cohen, J. A., Correale, J., Graves, J., Marrie, R. A., Montalban, X., Yong, V. W., Thompson, A. J., & Reich, D. S. (2023). Time for a new mechanism-driven framework to define multiple sclerosis progression. *The Lancet. Neurology*, 22(1), 78-88.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00289-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00289-7)
- Kular, L., Liu, Y., Ruhrmann, S., Zheleznyakova, G., Marabita, F., Gomez-Cabrero, D., James, T., Ewing, E., Lindén, M., Górniewicz, B., Aeinehband, S., Stridh, P., Link, J., Andlauer, T. F. M., Gasperi, C., Wiendl, H., Zipp, F., Gold, R., Tackenberg, B., ... Jagodic, M. (2018). DNA methylation as a mediator of HLA-DRB1*15:01 and a protective variant in multiple sclerosis. *Nature Communications*, 9(1), 2397. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04732-5>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuri, A., Jacobs, B. M., Vickaryous, N., Pakpoor, J., Middeldorp, J., Giovannoni, G., & Dobson, R. (2020). Epidemiology of Epstein Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health*, 20(1), 912. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09049-x>
- Kutzelnigg, A., & Lassmann, H. (2014). Chapter 2—Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. En D. S. Goodin (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 122, pp. 15-58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00002-9>
- Kvistad, S., Myhr, K.-M., Holmøy, T., Bakke, S., Beiske, A. G., Bjerre, K. S., Hovdal, H., Løken-Amsrud, K. I., Lilleås, F., Midgard, R., Njølstad, G., Pedersen, T., Benth, J. Š., Wergeland, S., & Torkildsen, Ø. (2014). Antibodies to Epstein Barr virus and MRI disease activity in multiple

- sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 20(14), 1833-1840.
<https://doi.org/10.1177/1352458514533843>
- Läderach, F., & Münz, C. (2022). Altered Immune Response to the Epstein Barr Virus as a Prerequisite for Multiple Sclerosis. *Cells*, 11(17), 2757. <https://doi.org/10.3390/cells11172757>
- Lalive, P. H., Neuhaus, O., Benkhoucha, M., Burger, D., Hohlfeld, R., Zamvil, S. S., & Weber, M. S. (2011). Glatiramer Acetate in the Treatment of Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, 25(5), 401-414.
<https://doi.org/10.2165/11588120-000000000-00000>
- Lanz, T. V., Brewer, R. C., Ho, P. P., Moon, J.-S., Jude, K. M., Fernandez, D., Fernandes, R. A., Gomez, A. M., Nadj, G.-S., Bartley, C. M., Schubert, R. D., Hawes, I. A., Vazquez, S. E., Iyer, M., Zuchero, J. B., Teegen, B., Dunn, J. E., Lock, C. B., Kipp, L. B., ... Robinson, W. H. (2022). Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*, 603(7900), Article 7900. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04432-7>
- Laribi, B., Shekarabi, M., Zarnani, A. H., Ghaffarpour, M., & Marzban, M. (2018). Differential serostatus of Epstein Barr virus in Iranian MS patients with various clinical patterns. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 32, 118. <https://doi.org/10.14196/mjiri.32.118>
- Larsen, P. D., Bloomer, L. C., & Bray, P. F. (1985). Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology*, 35(3), 435-435.
<https://doi.org/10.1212/WNL.35.3.435>
- Lassmann, H. (2018a). Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(3), a028936. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028936>
- Lassmann, H. (2018b). Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03116>
- Lay, M.-L. J., Lucas, R. M., Toi, C., Ratnamohan, M., Ponsonby, A.-L., & Dwyer, D. E. (2012). Epstein Barr virus genotypes and strains in central nervous system demyelinating disease and Epstein Barr virus-related illnesses in Australia. *Intervirology*, 55(5), 372-379.
<https://doi.org/10.1159/000334693>
- Legroux, L., & Arbour, N. (2015). Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 10(4), 528-546. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9614-0>
- Lehmann-Horn, K., Sagan, S. A., Bernard, C. C. A., Sobel, R. A., & Zamvil, S. S. (2015). B-cell very late antigen-4 deficiency reduces leukocyte recruitment and susceptibility to central nervous system autoimmunity. *Annals of Neurology*, 77(5), 902-908. <https://doi.org/10.1002/ana.24387>
- Lella, R. K., & Malarkannan, S. (2023). *IQGAP1 Promotes Early B Cell Development, Is Essential for the Development of Marginal Zone (MZ) B Cells, and Is Critical for Both T-Dependent and T-Independent Antibody Responses* (2023070442). Preprints.
<https://doi.org/10.20944/preprints202307.0442.v1>
- Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., & Edan, G. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. *Revue*

- Neurologique*, 172(1), 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.006>
- Levin, L. I., Munger, K. L., Rubertone, M. V., Peck, C. A., Lennette, E. T., Spiegelman, D., & Ascherio, A. (2005a). Temporal relationship between elevation of Epstein Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA*, 293(20), 2496-2500. <https://doi.org/10.1001/jama.293.20.2496>
- Levin, L. I., Munger, K. L., Rubertone, M. V., Peck, C. A., Lennette, E. T., Spiegelman, D., & Ascherio, A. (2005b). Temporal relationship between elevation of Epstein Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA*, 293(20), 2496-2500. <https://doi.org/10.1001/jama.293.20.2496>
- Li, C., Lin, J., Yang, T., Xiao, Y., Jiang, Q., & Shang, H. (2022). Physical activity and risk of multiple sclerosis: A Mendelian randomization study. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.872126>
- Li, H., Liu, S., Hu, J., Luo, X., Li, N., M. Bode, A., & Cao, Y. (2016). Epstein Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis. *International Journal of Biological Sciences*, 12(11), 1309-1318. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16564>
- Li, R., & Bar-Or, A. (2019). The Multiple Roles of B Cells in Multiple Sclerosis and Their Implications in Multiple Sclerosis Therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(4), a029108. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029108>
- Li, R., Rezk, A., Healy, L. M., Muirhead, G., Prat, A., Gommerman, J. L., Bar-Or, A., & MSSRF Canadian B cells in MS Team. (2016). Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00626>
- Liang, Z., Yang, Y., He, Y., Yang, P., Wang, X., He, G., Zhang, P., Zhu, H., Xu, N., Zhao, X., & Liang, S. (2017). SUMOylation of IQGAP1 promotes the development of colorectal cancer. *Cancer Letters*, 411, 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.046>
- Libbey, J. E., McCoy, L. L., & Fujinami, R. S. (2007). Molecular mimicry in multiple sclerosis. *International Review of Neurobiology*, 79, 127-147. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)79006-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)79006-2)
- Lie, I. A., Weeda, M. M., Mattiesing, R. M., Mol, M. A. E., Pouwels, P. J. W., Barkhof, F., Torkildsen, Ø., Bø, L., Myhr, K.-M., & Vrenken, H. (2022). Relationship Between White Matter Lesions and Gray Matter Atrophy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Neurology*, 98(15), e1562-e1573. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200006>
- Lindsey, J. W. (2017). Antibodies to the Epstein Barr virus proteins BFRF3 and BRRF2 cross-react with human proteins. *Journal of Neuroimmunology*, 310, 131-134. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.07.013>
- Lindsey, J. W., Hatfield, L. M., Crawford, M. P., & Patel, S. (2009). Quantitative PCR for Epstein Barr virus DNA and RNA in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke,*

- England), 15(2), 153-158. <https://doi.org/10.1177/1352458508097920>
- Linker, R. A., Lee, D.-H., Ryan, S., van Dam, A. M., Conrad, R., Bista, P., Zeng, W., Hronowsky, X., Buko, A., Chollate, S., Ellrichmann, G., Brück, W., Dawson, K., Goelz, S., Wiese, S., Scannevin, R. H., Lukashev, M., & Gold, R. (2011). Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain: A Journal of Neurology*, 134(Pt 3), 678-692. <https://doi.org/10.1093/brain/awq386>
- Liu, A., Manuel, A. M., Dai, Y., & Zhao, Z. (2022). Prioritization of risk genes in multiple sclerosis by a refined Bayesian framework followed by tissue-specificity and cell type feature assessment. *BMC Genomics*, 23(4), 362. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08580-y>
- Liu, C., Billadeau, D. D., Abdelhakim, H., Leof, E., Kaibuchi, K., Bernabeu, C., Bloom, G. S., Yang, L., Boardman, L., Shah, V. H., & Kang, N. (2013). IQGAP1 suppresses T β RII-mediated myofibroblastic activation and metastatic growth in liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 1138-1156. <https://doi.org/10.1172/JCI63836>
- Liu, R., Du, S., Zhao, L., Jain, S., Sahay, K., Rizvanov, A., Lezhnyova, V., Khaibullin, T., Martynova, E., Khaiboullina, S., & Baranwal, M. (2022). Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.996469>
- Lopo, S., Vinagre, E., Palminha, P., Paixão, M. T., Nogueira, P., & Freitas, M. G. (2011). Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003. *Eurosurveillance*, 16(25), 19896. <https://doi.org/10.2807/es.e16.25.19896-en>
- Lorenzetti, M. A., Gantuz, M., Altcheh, J., Matteo, E. D., Chabay, P. A., & Preciado, M. V. (2014). Epstein-Barr virus BZLF1 gene polymorphisms: Malignancy related or geographically distributed variants? *Clinical Microbiology and Infection*, 20(11), O861-O869. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12631>
- Lotfi, R., Chigr, F., & Najimi, M. (2022). The impact of sociodemographic characteristics on diagnosis and access to disease-modifying treatment for patients with multiple sclerosis in Morocco. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 67, 104193. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.104193>
- Lovett-Racke, A. E., Yang, Y., & Racke, M. K. (2011). Th1 Versus Th17: Are T Cell Cytokines Relevant in Multiple Sclerosis? *Biochimica et biophysica acta*, 1812(2), 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.05.012>
- Lublin, F. D., Coetzee, T., Cohen, J. A., Marrie, R. A., Thompson, A. J., & Ms, on behalf of the I. A. C. on C. T. in. (2020). The 2013 clinical course descriptors for multiple sclerosis: A clarification. *Neurology*, 94(24), 1088-1092. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009636>
- Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., Wolinsky, J. S., Balcer, L. J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B., Calabresi, P. A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R. J., Freedman, M. S., Goodman, A. D., Inglese, M., Kappos, L., ... Polman, C. H. (2014).

- Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology*, 83(3), 278-286.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>
- Luessi, F., Siffrin, V., & Zipp, F. (2012). Neurodegeneration in multiple sclerosis: Novel treatment strategies. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 12(9), 1061-1076; quiz 1077.
<https://doi.org/10.1586/ern.12.59>
- Luetic, G. G., & Menichini, M. L. (2021). Prevalence of Multiple Sclerosis in Rosario, Argentina. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 55, 103212.
<https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103212>
- Luetic, G., & Menichini, M. L. (2020). Multiple sclerosis prevalence in Santa Fe province, Argentina. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 41, 102006.
<https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102006>
- Lünemann, J. D., Edwards, N., Muraro, P. A., Hayashi, S., Cohen, J. I., Münz, C., & Martin, R. (2006). Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 129(Pt 6), 1493-1506.
<https://doi.org/10.1093/brain/awl067>
- Lünemann, J. D., Jelčić, I., Roberts, S., Lutterotti, A., Tackenberg, B., Martin, R., & Münz, C. (2008). EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1763-1773. <https://doi.org/10.1084/jem.20072397>
- Lünemann, J. D., Tintoré, M., Messmer, B., Strowig, T., Rovira, A., Perkal, H., Caballero, E., Münz, C., Montalban, X., & Comabella, M. (2010). Elevated Epstein Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 67(2), 159-169. <https://doi.org/10.1002/ana.21886>
- Macaron, G., Larochelle, C., Arbour, N., Galmard, M., Girard, J. M., Prat, A., & Duquette, P. (2023). Impact of aging on treatment considerations for multiple sclerosis patients. *Frontiers in Neurology*, 14, 1197212. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1197212>
- Maciak, K., Dziedzic, A., & Saluk, J. (2023). Remyelination in multiple sclerosis from the miRNA perspective. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2023.1199313>
- Maghbooli, Z., Sahraian, M. A., & Naser Moghadasi, A. (2020). Multiple sclerosis and human leukocyte antigen genotypes: Focus on the Middle East and North Africa region. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*, 6(1), 2055217319881775. <https://doi.org/10.1177/2055217319881775>
- Magliozzi, R., Serafini, B., Rosicarelli, B., Chiappetta, G., Veroni, C., Reynolds, R., & Aloisi, F. (2013). B-cell enrichment and Epstein Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 72(1), 29-41. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31827bfc62>

- Magyari, M., & Sorensen, P. S. (2019). The changing course of multiple sclerosis: Rising incidence, change in geographic distribution, disease course, and prognosis. *Current Opinion in Neurology*, 32(3), 320-326. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000695>
- Malarkannan, S., Awasthi, A., Kamalakannan, R., Kumar, P., Schuldt, K. M., Bartoszek, A., Manoharan, N., Goldner, N. K., Umhoefer, C. M., & Thakar, M. S. (2012). IQGAP1: A Regulator of Intracellular Spacetime Relativity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(5), 2057-2063. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102439>
- Mamedov, A., Vorobyeva, N., Filimonova, I., Zakharova, M., Kiselev, I., Bashinskaya, V., Baulina, N., Boyko, A., Favorov, A., Kulakova, O., Ziganshin, R., Smirnov, I., Poroshina, A., Shilovskiy, I., Khaitov, M., Sykulev, Y., Favorova, O., Vlassov, V., Gabibov, A., & Belogurov, A. (2020). Protective Allele for Multiple Sclerosis HLA-DRB1*01:01 Provides Kinetic Discrimination of Myelin and Exogenous Antigenic Peptides. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.03088>
- Mancuso, R., Delbue, S., Borghi, E., Pagani, E., Calvo, M. G., Caputo, D., Granieri, E., & Ferrante, P. (2007). Increased prevalence of varicella zoster virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *Journal of Medical Virology*, 79(2), 192-199. <https://doi.org/10.1002/jmv.20777>
- Manian, M., Motallebnezhad, M., Nedaeinia, R., Salehi, R., Khani, L., Ferns, G. A., & Jazayeri, M. H. (2023). Comparison of OX40 expression in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica as an approach to diagnosis. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 19, 19. <https://doi.org/10.1186/s13223-023-00772-9>
- Manouchehrinia, A., Huang, J., Hillert, J., Alfredsson, L., Olsson, T., Kockum, I., & Constantinescu, C. S. (2022a). Smoking Attributable Risk in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.840158>
- Manouchehrinia, A., Huang, J., Hillert, J., Alfredsson, L., Olsson, T., Kockum, I., & Constantinescu, C. S. (2022b). Smoking Attributable Risk in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840158>
- Manouchehrinia, A., Tanasescu, R., Kareem, H., Jerca, O. P., Jabeen, F., Shafei, R., Breuer, J., Neal, K., Irving, W., & Constantinescu, C. S. (2017). Prevalence of a history of prior varicella/herpes zoster infection in multiple sclerosis. *Journal of Neurovirology*, 23(6), 839-844. <https://doi.org/10.1007/s13365-017-0569-1>
- Manouchehrinia, A., Tench, C. R., Maxted, J., Bibani, R. H., Britton, J., & Constantinescu, C. S. (2013). Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain: A Journal of Neurology*, 136(Pt 7), 2298-2304. <https://doi.org/10.1093/brain/awt139>
- Marín, H., Deluca, G., & Giusiano, G. (2014). Citomegalovirus congénita en población asintomática

- de recién nacidos de un hospital público en la Región Nordeste de Argentina. *Rev. argent. salud publica*, 6-10.
- Maroto-García, J., Martínez-Escribano, A., Delgado-Gil, V., Mañez, M., Mugueta, C., Varo, N., García de la Torre, Á., & Ruiz-Galdón, M. (2023). Biochemical biomarkers for multiple sclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 548, 117471. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117471>
- Maroufi, H., Mortazavi, S. H., Sahraian, M. A., & Eskandarieh, S. (2021). Environmental risk factors of multiple sclerosis in the Middle East and North Africa region: A systematic review. *Current Journal of Neurology*, 20(3), 166-184. <https://doi.org/10.18502/cjn.v20i3.7693>
- Marrie, R. A. (2004). Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *The Lancet Neurology*, 3(12), 709-718. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00933-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00933-0)
- Marrie, R. A., & Wolfson, C. (2001a). Multiple sclerosis and varicella zoster virus infection: A review. *Epidemiology and Infection*, 127(2), 315-325.
- Marrie, R. A., & Wolfson, C. (2001b). Multiple sclerosis and varicella zoster virus infection: A review. *Epidemiology & Infection*, 127(2), 315-325. <https://doi.org/10.1017/S0950268801005891>
- Marrodan, M., Alessandro, L., Farez, M. F., & Correale, J. (2019). The role of infections in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 25(7), 891-901. <https://doi.org/10.1177/1352458518823940>
- Marrodan, M., Farez, M. F., Balbuena Aguirre, M. E., & Correale, J. (2021). Obesity and the risk of Multiple Sclerosis. The role of Leptin. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 8(2), 406-424. <https://doi.org/10.1002/acn3.51291>
- Martinsen, V., & Kursula, P. (2022). Multiple sclerosis and myelin basic protein: Insights into protein disorder and disease. *Amino Acids*, 54(1), 99-109. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03111-7>
- Mascanfroni, I. D., Takenaka, M. C., Yeste, A., Patel, B., Wu, Y., Kenison, J. E., Siddiqui, S., Basso, A. S., Otterbein, L. E., Pardoll, D. M., Pan, F., Priel, A., Clish, C. B., Robson, S. C., & Quintana, F. J. (2015). Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nature Medicine*, 21(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nm.3868>
- Masson, E. (s. f.). *Genetics and familial distribution of multiple sclerosis: A review*. EM-Consulte. Recuperado 11 de julio de 2023, de <https://www.em-consulte.com/article/1523798/alertePM>
- Matarese, G., Carrieri, P. B., La Cava, A., Perna, F., Sanna, V., De Rosa, V., Aufiero, D., Fontana, S., & Zappacosta, S. (2005). Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), 5150-5155. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408995102>
- Maurmann, S., Fricke, L., Wagner, H.-J., Schlenke, P., Hennig, H., Steinhoff, J., & Jabs, W. J. (2003). Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein Barr virus reactivation in healthy carriers. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5419-5428. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5419-5428.2003>
- Maver, A., Lavtar, P., Ristić, S., Stopinšek, S., Simčič, S., Hočevár, K., Sepčič, J., Drulović, J.,

- Pekmezović, T., Novaković, I., Alenka, H., Rudolf, G., Šega, S., Starčević-Čizmarević, N., Palandačić, A., Zamolo, G., Kapović, M., Likar, T., & Peterlin, B. (2017). Identification of rare genetic variation of NLRP1 gene in familial multiple sclerosis. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03536-9>
- Mbulaiteye, S. M., Biggar, R. J., Bhatia, K., Linet, M. S., & Devesa, S. S. (2009). Sporadic childhood Burkitt lymphoma incidence in the United States during 1992–2005. *Pediatric blood & cancer*, 53(3), 366-370. <https://doi.org/10.1002/pbc.22047>
- McGinley, M. P., Goldschmidt, C. H., & Rae-Grant, A. D. (2021). Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA*, 325(8), 765-779. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.26858>
- McKay, K. A., Kwan, V., Duggan, T., & Tremlett, H. (2015). Risk factors associated with the onset of relapsing-remitting and primary progressive multiple sclerosis: A systematic review. *BioMed Research International*, 2015, 817238. <https://doi.org/10.1155/2015/817238>
- Mechelli, R., Manzari, C., Policano, C., Annese, A., Picardi, E., Umeton, R., Fornasiero, A., D'Erchia, A. M., Buscarinu, M. C., Agliardi, C., Annibali, V., Serafini, B., Rosicarelli, B., Romano, S., Angelini, D. F., Ricigliano, V. A. G., Buttari, F., Battistini, L., Centonze, D., ... Ristori, G. (2015a). Epstein Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis. *Neurology*, 84(13), 1362-1368. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001420>
- Mechelli, R., Manzari, C., Policano, C., Annese, A., Picardi, E., Umeton, R., Fornasiero, A., D'Erchia, A. M., Buscarinu, M. C., Agliardi, C., Annibali, V., Serafini, B., Rosicarelli, B., Romano, S., Angelini, D. F., Ricigliano, V. A. G., Buttari, F., Battistini, L., Centonze, D., ... Ristori, G. (2015b). Epstein Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis. *Neurology*, 84(13), 1362-1368. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001420>
- Melcon, M., Gold, L., Carrá, A., Cáceres, F., Correale, J., Cristiano, E., Fernández Liguori, N., Garcea, O., Luetic, G., & Kremenchutzky, M. (2008). Argentine Patagonia: Prevalence and clinical features of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 14(5), 656-662. <https://doi.org/10.1177/1352458507085801>
- Mellinger, S., Dias, D., Flores, N., Palavecino, A., Vigo, G., Burgos, D., Tomas, F., Rollan, I., Herrera, G., Floridia, J., Furlan, C., Frissia, F., Aleman, A., Perez Frías, J., Casali, J., & Burgos, M. (2018). Multiple sclerosis prevalence in Salta City, Argentina. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 25, 212-215. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.07.033>
- Mescheriakova, J. Y., Nierop, G. P. van, Eijk, A. A. van der, Kreft, K. L., & Hintzen, R. Q. (2020). EBNA-1 titer gradient in families with multiple sclerosis indicates a genetic contribution. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 7(6). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000872>
- Michel, L., Touil, H., Pikor, N. B., Gommerman, J. L., Prat, A., & Bar-Or, A. (2015). B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 6, 636.

- <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00636>
- Miclea, A., Bagnoud, M., Chan, A., & Hoepner, R. (2020). A Brief Review of the Effects of Vitamin D on Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00781>
- Mihailova, S., Ivanova, M., Mihaylova, A., Quin, L., Mikova, O., & Naumova, E. (2005). Pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 168(1-2), 138-143. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.06.020>
- Miller, D., Barkhof, F., Montalban, X., Thompson, A., & Filippi, M. (2005). Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: Natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *The Lancet. Neurology*, 4(5), 281-288. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70071-5)
- Miller, D. H., Chard, D. T., & Ciccarelli, O. (2012). Clinically isolated syndromes. *The Lancet. Neurology*, 11(2), 157-169. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70274-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70274-5)
- Minagar, A., Barnett, M. H., Benedict, R. H. B., Pelletier, D., Pirko, I., Sahraian, M. A., Frohman, E., & Zivadinov, R. (2013). The thalamus and multiple sclerosis: Modern views on pathologic, imaging, and clinical aspects. *Neurology*, 80(2), 210-219. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827b910b>
- Mohammadi, M., Mohammadi, A., Habibzadeh, A., Korkorian, R., Mohamadi, M., Shaygannejad, V., Zabeti, A., & Mirmosayyeb, O. (2024). Abnormal body mass index is associated with risk of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Research & Clinical Practice*, 18(5), 311-321. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2024.11.005>
- Mohammadzamani, M., Kazemzadeh, K., Chand, S., Thapa, S., Ebrahimi, N., Yazdan Panah, M., Shaygannejad, V., & Mirmosayyeb, O. (2024). Insights into the interplay between Epstein-Barr virus (EBV) and multiple sclerosis (MS): A state-of-the-art review and implications for vaccine development. *Health Science Reports*, 7(2), e1898. <https://doi.org/10.1002/hsr2.1898>
- Mohseni, M., Boniface, M. P., & Graham, C. (2023). Mononucleosis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470387/>
- Mokhtarzade, M., Agha-Alinejad, H., Motl, R. W., Negaresh, R., Baker, J. S., & Zimmer, P. (2019). Weight control and physical exercise in people with multiple sclerosis: Current knowledge and future perspectives. *Complementary Therapies in Medicine*, 43, 240-246. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.02.006>
- Moore, C. S., Abdullah, S. L., Brown, A., Arulpragasam, A., & Crocker, S. J. (2011). How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. *Journal of Neuroscience Research*, 89(1), 13-21. <https://doi.org/10.1002/jnr.22482>
- Mora, J. R., Iwata, M., & von Andrian, U. H. (2008). Vitamin effects on the immune system: Vitamins A and D take centre stage. *Nature Reviews. Immunology*, 8(9), 685-698.

- <https://doi.org/10.1038/nri2378>
- Moreno, M. A., Or-Geva, N., Aftab, B. T., Khanna, R., Croze, E., Steinman, L., & Han, M. H. (2018). Molecular signature of Epstein Barr virus infection in MS brain lesions. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 5(4). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000466>
- Morgan, S. M., Tanizawa, H., Caruso, L. B., Hulse, M., Kossenkov, A., Madzo, J., Keith, K., Tan, Y., Boyle, S., Lieberman, P. M., & Tempera, I. (2022). The three-dimensional structure of Epstein Barr virus genome varies by latency type and is regulated by PARP1 enzymatic activity. *Nature Communications*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27894-1>
- Moser, T., Akgün, K., Proschmann, U., Sellner, J., & Ziemssen, T. (2020). The role of TH17 cells in multiple sclerosis: Therapeutic implications. *Autoimmunity Reviews*, 19(10), 102647. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102647>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mouhieddine, T. H., Darwish, H., Fawaz, L., Yamout, B., Tamim, H., & Khoury, S. J. (2015). Risk factors for multiple sclerosis and associations with anti-EBV antibody titers. *Clinical Immunology*, 158(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.03.011>
- Mrozek-Gorska, P., Buschle, A., Pich, D., Schwarzmayer, T., Fechtner, R., Scialdone, A., & Hammerschmidt, W. (2019a). Epstein Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(32), 16046-16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901314116>
- Mrozek-Gorska, P., Buschle, A., Pich, D., Schwarzmayer, T., Fechtner, R., Scialdone, A., & Hammerschmidt, W. (2019b). Epstein–Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(32), 16046-16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901314116>
- Munger, K. L., Chitnis, T., & Ascherio, A. (2009). Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology*, 73(19), 1543-1550. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c0d6e0>
- Munger, K. L., Fitzgerald, K. C., Freedman, M. S., Hartung, H.-P., Miller, D. H., Montalbán, X., Edan, G., Barkhof, F., Suarez, G., Radue, E.-W., Sandbrink, R., Kappos, L., Pohl, C., & Ascherio, A. (2015). No association of multiple sclerosis activity and progression with EBV or tobacco use in BENEFIT. *Neurology*, 85(19), 1694-1701. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002099>
- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., & Ascherio, A. (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, 296(23), 2832-2838. <https://doi.org/10.1001/jama.296.23.2832>
- Munger, K., Levin, L., O'Reilly, E., Falk, K., & Ascherio, A. (2011). Anti-Epstein–Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: A prospective study among United States military

- personnel. *Multiple Sclerosis Journal*, 17(10), 1185-1193. <https://doi.org/10.1177/1352458511408991>
- Münz, C. (2017a). Epstein–Barr Virus-Specific Immune Control by Innate Lymphocytes. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01658>
- Münz, C. (2017b). Humanized mouse models for Epstein Barr virus infection. *Current Opinion in Virology*, 25, 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.07.026>
- Münz, C., Lünemann, J. D., Getts, M. T., & Miller, S. D. (2009). Antiviral immune responses: Triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature Reviews Immunology*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nri2527>
- Murata, T. (2023). Epstein Barr virus: The molecular virology and the associated diseases. *Fujita Medical Journal*, 9(2), 65-72. <https://doi.org/10.20407/fmj.2022-018>
- Murata, T., Sugimoto, A., Inagaki, T., Yanagi, Y., Watanabe, T., Sato, Y., & Kimura, H. (2021). Molecular Basis of Epstein–Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation. *Viruses*, 13(12), 2344. <https://doi.org/10.3390/v13122344>
- Najafi, S., Ghane, M., Poortahmasebi, V., Jazayeri, S. M., & Yousefzadeh-Chabok, S. (2016). Prevalence of Cytomegalovirus in Patients With Multiple Sclerosis: A Case-Control Study in Northern Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(7), e36582. <https://doi.org/10.5812/jjm.36582>
- Najafi, S., Ghane, M., Yousefzadeh-Chabok, S., & Amiri, M. (2016). The High Prevalence of the Varicella Zoster Virus in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Case-Control Study in the North of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(3), e34158. <https://doi.org/10.5812/jjm.34158>
- Nakamura, K., Mokliatchouk, O., Arnold, D. L., Yousry, T. A., Kappos, L., Richert, N., Ayling-Rouse, K., Miller, C., & Fisher, E. (2022). Effects of Dimethyl Fumarate on Brain Atrophy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Pooled Analysis Phase 3 DEFINE and CONFIRM Studies. *Frontiers in Neurology*, 13, 809273. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.809273>
- Neves, M., Marinho-Dias, J., Ribeiro, J., & Sousa, H. (2017). Epstein–Barr virus strains and variations: Geographic or disease-specific variants? *Journal of Medical Virology*, 89(3), 373-387. <https://doi.org/10.1002/jmv.24633>
- Nielsen, T. R., Pedersen, M., Rostgaard, K., Frisch, M., & Hjalgrim, H. (2007). Correlations between Epstein Barr virus antibody levels and risk factors for multiple sclerosis in healthy individuals. *Multiple Sclerosis Journal*, 13(3), 420-423. <https://doi.org/10.1177/1352458506071470>
- Nijeholt, G. J. L. à. (2005). Reduction of brain volume in MS. MRI and pathology findings. *Journal of the Neurological Sciences*, 233(1), 199-202. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.03.016>
- Nishanth, K., Tariq, E., Nzvere, F. P., Miqdad, M., & Cancarevic, I. (s. f.). Role of Smoking in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: A Review Article. *Cureus*, 12(8), e9564.

- <https://doi.org/10.7759/cureus.9564>
- Nortvedt, M. W., Riise, T., & Maeland, J. G. (2005). Multiple sclerosis and lifestyle factors: The Hordaland Health Study. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 26(5), 334-339. <https://doi.org/10.1007/s10072-005-0498-2>
- Obermeier, B., Mentele, R., Malotka, J., Kellermann, J., Kümpfel, T., Wekerle, H., Lottspeich, F., Hohlfeld, R., & Dornmair, K. (2008). Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 14(6), 688-693. <https://doi.org/10.1038/nm1714>
- O'Connor, P., Wolinsky, J. S., Confavreux, C., Comi, G., Kappos, L., Olsson, T. P., Benzerdjeb, H., Truffinet, P., Wang, L., Miller, A., Freedman, M. S., & TEMSO Trial Group. (2011). Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 365(14), 1293-1303. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1014656>
- Odumade, O. A., Hogquist, K. A., & Balfour, H. H. (2011). Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein Barr Virus Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 193-209. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-10>
- Ogawa, K., Okuno, T., Hosomichi, K., Hosokawa, A., Hirata, J., Suzuki, K., Sakaue, S., Kinoshita, M., Asano, Y., Miyamoto, K., Inoue, I., Kusunoki, S., Okada, Y., & Mochizuki, H. (2019). Next-generation sequencing identifies contribution of both class I and II HLA genes on susceptibility of multiple sclerosis in Japanese. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1551-z>
- O'Gorman, C., Lin, R., Stankovich, J., & Broadley, S. A. (2013). Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology*, 40(1), 1-12. <https://doi.org/10.1159/000341902>
- Okuyama, Y., Nagashima, H., Ushio-Fukai, M., Croft, M., Ishii, N., & So, T. (2020). IQGAP1 restrains T-cell cosignaling mediated by OX40. *The FASEB Journal*, 34(1), 540-554. <https://doi.org/10.1096/fj.201900879RR>
- Olival, G. S. do, Lima, B. M., Sumita, L. M., Serafim, V., Fink, M. C., Nali, L. H., Romano, C. M., Thomaz, R. B., Cavenaghi, V. B., Tilbery, C. P., & Penalva-de-Oliveira, A. C. (2013). Multiple sclerosis and herpesvirus interaction. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*, 71(9B), 727-730. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130160>
- Olsson, T., Barcellos, L. F., & Alfredsson, L. (2017). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.187>
- Ordoñez, G., Martinez-Palomo, A., Corona, T., Pineda, B., Flores-Rivera, J., Gonzalez, A., Chavez-Munguia, B., & Sotelo, J. (2010). Varicella zoster virus in progressive forms of multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 112(8), 653-657.

- <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2010.04.018>
- Orton, S.-M., Herrera, B. M., Yee, I. M., Valdar, W., Ramagopalan, S. V., Sadovnick, A. D., Ebers, G. C., & Canadian Collaborative Study Group. (2006). Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: A longitudinal study. *The Lancet. Neurology*, 5(11), 932-936. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70581-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70581-6)
- Ostolaza, A., Corroza, J., & Ayuso, T. (2021). Multiple sclerosis and aging: Comorbidity and treatment challenges. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 50, 102815. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.102815>
- Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Chang, C., Gershwin, M. E., & Anaya, J.-M. (2019). Bystander activation and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 103, 102301. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.06.012>
- Pakpoor, J., Disanto, G., Gerber, J. E., Dobson, R., Meier, U. C., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2013a). The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein Barr virus: A meta-analysis. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(2), 162-166. <https://doi.org/10.1177/1352458512449682>
- Pakpoor, J., Disanto, G., Gerber, J. E., Dobson, R., Meier, U. C., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2013b). The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein Barr virus: A meta-analysis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 19(2), 162-166. <https://doi.org/10.1177/1352458512449682>
- Pakpoor, J., Pakpoor, J., Disanto, G., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V. (2013). Cytomegalovirus and multiple sclerosis risk. *Journal of Neurology*, 260(6), 1658-1660. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-6912-4>
- Palser, A. L., Grayson, N. E., White, R. E., Corton, C., Correia, S., Ba abdullah, M. M., Watson, S. J., Cotten, M., Arrand, J. R., Murray, P. G., Allday, M. J., Rickinson, A. B., Young, L. S., Farrell, P. J., & Kellam, P. (2015). Genome Diversity of Epstein Barr Virus from Multiple Tumor Types and Normal Infection. *Journal of Virology*, 89(10), 5222-5237. <https://doi.org/10.1128/JVI.03614-14>
- Parry, H. M., Zuo, J., Frumento, G., Mirajkar, N., Inman, C., Edwards, E., Griffiths, M., Pratt, G., & Moss, P. (2016). Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. *Immunity & Ageing: I & A*, 13, 1. <https://doi.org/10.1186/s12979-015-0056-6>
- Patsopoulos, N. A. (2018). Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(7), a028951. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028951>
- Patsopoulos, N. A., Barcellos, L. F., Hintzen, R. Q., Schaefer, C., van Duijn, C. M., Noble, J. A., Raj, T., IMMSGC, ANZgene, Gourraud, P.-A., Stranger, B. E., Oksenberg, J., Olsson, T., Taylor, B. V., Sawcer, S., Hafler, D. A., Carrington, M., De Jager, P. L., & de Bakker, P. I. W. (2013).

- Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genetics*, 9(11), e1003926. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003926>
- Pediatric Mononucleosis and Epstein Barr Virus Infection: Practice Essentials, Background, Pathophysiology*. (2023). <https://emedicine.medscape.com/article/963894-overview?form=fpf>
- Pekmezovic, T., Drulovic, J., Milenkovic, M., Jarebinski, M., Stojavljevic, N., Mesaros, S., Kistic, D., & Kostic, J. (2006). Lifestyle factors and multiple sclerosis: A case-control study in Belgrade. *Neuroepidemiology*, 27(4), 212-216. <https://doi.org/10.1159/000096853>
- Pender, M. P., Csurhes, P. A., Burrows, J. M., & Burrows, S. R. (2017). Defective T-cell control of Epstein–Barr virus infection in multiple sclerosis. *Clinical & Translational Immunology*, 6(1), e126. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.87>
- Peng, X., Wang, T., Gao, H., Yue, X., Bian, W., Mei, J., & Zhang, Y. (2021). The interplay between IQGAP1 and small GTPases in cancer metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 135, 111243. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111243>
- Pereira, J. G., Leon, L. A. A., de Almeida, N. A. A., Raposo-Vedovi, J. V., Fontes-Dantas, F. L., Farinhas, J. G. D., Pereira, V. C. S. R., Alves-Leon, S. V., & de Paula, V. S. (2023). Higher frequency of Human herpesvirus-6 (HHV-6) viral DNA simultaneously with low frequency of Epstein Barr virus (EBV) viral DNA in a cohort of multiple sclerosis patients from Rio de Janeiro, Brazil. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 76, 104747. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2023.104747>
- Perri, V., Zingaropoli, M. A., Pasculli, P., Ciccone, F., Tartaglia, M., Baione, V., Malimpensa, L., Ferrazzano, G., Mastroianni, C. M., Conte, A., & Ciardi, M. R. (2024). The Impact of Cytomegalovirus Infection on Natural Killer and CD8+ T Cell Phenotype in Multiple Sclerosis. *Biology*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/biology13030154>
- Perry, V. H., & Holmes, C. (2014). Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.38>
- Persson Berg, L., Eriksson, M., Longhi, S., Kockum, I., Warnke, C., Thomsson, E., Bäckström, M., Olsson, T., Fogdell-Hahn, A., & Bergström, T. (2022). Serum IgG levels to Epstein Barr and measles viruses in patients with multiple sclerosis during natalizumab and interferon beta treatment. *BMJ Neurology Open*, 4(2), e000271. <https://doi.org/10.1136/bmjno-2022-000271>
- Pichler, A., Khalil, M., Langkammer, C., Pinter, D., Bachmaier, G., Ropele, S., Fuchs, S., Enzinger, C., & Fazekas, F. (2016). Combined analysis of global and compartmental brain volume changes in early multiple sclerosis in clinical practice. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 22(3), 340-346. <https://doi.org/10.1177/1352458515593405>
- Pitt, D., Lo, C. H., Gauthier, S. A., Hickman, R. A., Longbrake, E., Airas, L. M., Mao-Draayer, Y., Riley, C., De Jager, P. L., Wesley, S., Boster, A., Topalli, I., Bagnato, F., Mansoor, M., Stuve, O., Kister, I., Pelletier, D., Stathopoulos, P., Dutta, R., & Lincoln, M. R. (2022). Toward

- Precision Phenotyping of Multiple Sclerosis. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 9(6), e200025. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000200025>
- Plosa, E. J., Esbenshade, J. C., Fuller, M. P., & Weitkamp, J.-H. (2012). Cytomegalovirus infection. *Pediatrics in Review*, 33(4), 156-163; quiz 163. <https://doi.org/10.1542/pir.33-4-156>
- Png, Y. T., Yang, A. Z. Y., Lee, M. Y., Chua, M. J. M., & Lim, C. M. (2021). The Role of NK Cells in EBV Infection and EBV-Associated NPC. *Viruses*, 13(2), 300. <https://doi.org/10.3390/v13020300>
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., & Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, 69(2), 292-302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Poorolajal, J., Bahrami, M., Karami, M., & Hooshmand, E. (2017). Effect of smoking on multiple sclerosis: A meta-analysis. *Journal of Public Health (Oxford, England)*, 39(2), 312-320. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdw030>
- Portaccio, E., Magyari, M., Havrdova, E. K., Ruet, A., Brochet, B., Scalfari, A., Di Filippo, M., Tur, C., Montalban, X., & Amato, M. P. (2024). Multiple sclerosis: Emerging epidemiological trends and redefining the clinical course. *The Lancet Regional Health - Europe*, 44, 100977. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2024.100977>
- Price, A. M., & Luftig, M. A. (2015). To be or not IIb: A multi-step process for Epstein Barr virus latency establishment and consequences for B cell tumorigenesis. *PLoS Pathogens*, 11(3), e1004656. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004656>
- Prosperini, L., Lucchini, M., Ruggieri, S., Tortorella, C., Haggiag, S., Mirabella, M., Pozzilli, C., & Gasperini, C. (2022). Shift of multiple sclerosis onset towards older age. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, jnnp-2022-329049. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-329049>
- Raffel, J., Dobson, R., Gafson, A., Mattoscio, M., Muraro, P., & Giovannoni, G. (2014). Multiple sclerosis therapy and Epstein Barr virus antibody titres. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 3(3), 372-374. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2013.12.004>
- Ramagopalan, S. V., Dymment, D. A., Cader, M. Z., Morrison, K. M., Disanto, G., Morahan, J. M., Berlanga-Taylor, A. J., Handel, A., De Luca, G. C., Sadovnick, A. D., Lepage, P., Montpetit, A., & Ebers, G. C. (2011). Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 70(6), 881-886. <https://doi.org/10.1002/ana.22678>
- Ramagopalan, S. V., & Ebers, G. C. (2009). Multiple sclerosis: Major histocompatibility complexity and antigen presentation. *Genome Medicine*, 1(11), 105. <https://doi.org/10.1186/gm105>
- Ramagopalan, S. V., Maugeri, N. J., Handunnetthi, L., Lincoln, M. R., Orton, S.-M., Dymment, D. A., Deluca, G. C., Herrera, B. M., Chao, M. J., Sadovnick, A. D., Ebers, G. C., & Knight, J. C. (2009). Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501

- is regulated by vitamin D. *PLoS Genetics*, 5(2), e1000369. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000369>
- Ramroodi, N., Niazi, A. A., Sanadgol, N., Ganjali, Z., & Sarabandi, V. (2013). Evaluation of reactive Epstein Barr virus (EBV) in Iranian patient with different subtypes of multiple sclerosis (MS). *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.09.008>
- Ransohoff, R. M., Hafler, D. A., & Lucchinetti, C. F. (2015). Multiple sclerosis—A quiet revolution. *Nature reviews. Neurology*, 11(3), 134-142. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.14>
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine*, 378(2), 169-180. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1401483>
- Rice, E. M., Thakolwiboon, S., & Avila, M. (2021). Geographic heterogeneity in the association of varicella-zoster virus seropositivity and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 53, 103024. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103024>
- Robinson, W. H., & Steinman, L. (2022). Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 264-265. <https://doi.org/10.1126/science.abm7930>
- Rodríguez Murúa, S., Farez, M. F., & Quintana, F. J. (2022). The Immune Response in Multiple Sclerosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 17(1), 121-139. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052920-040318>
- Rodríguez-Violante, M., Ordoñez, G., Bermudez, J. R., Sotelo, J., & Corona, T. (2009a). Association of a history of varicella virus infection with multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 111(1), 54-56. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2008.07.007>
- Rodríguez-Violante, M., Ordoñez, G., Bermudez, J. R., Sotelo, J., & Corona, T. (2009b). Association of a history of varicella virus infection with multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 111(1), 54-56. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2008.07.007>
- Rojas, J. I., Patrucco, L., & Cristiano, E. (2014). Current and emerging treatments for relapsing multiple sclerosis in Argentinian patients: A review. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 4, 103-109. <https://doi.org/10.2147/DNND.S46557>
- Rojas, J. I., Patrucco, L., Miguez, J., & Cristiano, E. (2016). Brain atrophy in multiple sclerosis: Therapeutic, cognitive and clinical impact. *Archivos de Neuro-Psiquiatria*, 74, 235-243. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20160015>
- Rostgaard, K., Jr, H. H. B., Jarrett, R., Erikstrup, C., Pedersen, O., Ullum, H., Nielsen, L. P., Voldstedlund, M., & Hjalgrim, H. (2019). Primary Epstein Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. *PLOS ONE*, 14(12), e0226436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226436>
- Rovaris, M., Confavreux, C., Furlan, R., Kappos, L., Comi, G., & Filippi, M. (2006). Secondary progressive multiple sclerosis: Current knowledge and future challenges. *The Lancet*.

- Neurology*, 5(4), 343-354. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70410-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70410-0)
- Rudick, R. A., Fisher, E., Lee, J.-C., Simon, J., Jacobs, L., & Group, the M. S. C. R. (1999). Use of the brain parenchymal fraction to measure whole brain atrophy in relapsing-remitting MS. *Neurology*, 53(8), 1698-1698. <https://doi.org/10.1212/WNL.53.8.1698>
- Ruprecht, K. (2020). The role of Epstein Barr virus in the etiology of multiple sclerosis: A current review. *Expert Review of Clinical Immunology*, 16(12), 1143-1157. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1847642>
- Ruprecht, K., Wunderlich, B., Gieß, R., Meyer, P., Loebel, M., Lenz, K., Hofmann, J., Rosche, B., Wengert, O., Paul, F., Reimer, U., & Scheibenbogen, C. (2014). Multiple sclerosis: The elevated antibody response to Epstein Barr virus primarily targets, but is not confined to, the glycine-alanine repeat of Epstein Barr nuclear antigen-1. *Journal of Neuroimmunology*, 272(1-2), 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.005>
- Sabatino, J. J., Zamvil, S. S., & Hauser, S. L. (2019). B-Cell Therapies in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(2), a032037. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032037>
- Saha, A., & Robertson, E. S. (2011). Epstein Barr virus-associated B-cell lymphomas: Pathogenesis and clinical outcomes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(10), 3056-3063. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2578>
- Saha, A., & Robertson, E. S. (2019). Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein Barr Virus. *Journal of Virology*, 93(13), e00238-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00238-19>
- Saini, V., Nadeem, M., Kolb, C., Gangloff, S., Zivadnov, R., Ramanathan, M., & Weinstock-Guttman, B. (2016). Chapter 7 - Vitamin D: Role in Pathogenesis of Multiple Sclerosis. En A. Minagar (Ed.), *Multiple Sclerosis* (pp. 127-152). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800763-1.00007-5>
- Sakamoto, Y., Mariya, Y., & Kubo, K. (2012). Quantification of Epstein Barr virus DNA is helpful for evaluation of chronic active Epstein Barr virus infection. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 227(4), 307-311. <https://doi.org/10.1620/tjem.227.307>
- Salehi, Z., Doosti, R., Beheshti, M., Janzamin, E., Sahraian, M. A., & Izad, M. (2016). Differential Frequency of CD8+ T Cell Subsets in Multiple Sclerosis Patients with Various Clinical Patterns. *PLOS ONE*, 11(7), e0159565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159565>
- Salim, M. A., Eftekharian, M. M., Taheri, M., & Yousef Alikhani, M. (2017). Determining the IgM and IgG antibody titer against CMV and helicobacter pylori in the serum of multiple sclerosis patients comparing to the control group in Hamadan. *Human Antibodies*, 26(1), 23-28. <https://doi.org/10.3233/HAB-170317>
- Salmerón, M. B., & Barrenechea, G. G. (2021). Estimación de prevalencia de infección congénita por citomegalovirus y seroprevalencia materna en Tucumán. *Revista Argentina de Salud Pública*, 13. <https://www.rasp.msar.gov.ar/index.php/rasp/article/view/491>

- Salou, M., Nicol, B., Garcia, A., & Laplaud, D.-A. (2015). Involvement of CD8+ T Cells in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00604>
- Salzer, J., Stenlund, H., & Sundström, P. (2014). The interaction between smoking and Epstein Barr virus as multiple sclerosis risk factors may depend on age. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 20(6), 747-750. <https://doi.org/10.1177/1352458513507820>
- Sämann, P. G., Knop, M., Golgor, E., Messler, S., Czisch, M., & Weber, F. (2012). Brain volume and diffusion markers as predictors of disability and short-term disease evolution in multiple sclerosis. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 33(7), 1356-1362. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2972>
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A., & Kieff, E. (1990). Epstein Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *Journal of Virology*, 64(9), 4084-4092. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990>
- Sanadgol, N., Ramroodi, N., Ahmadi, G. A., Komijani, M., Moghtaderi, A., Bouzari, M., Rezaei, M., Kardi, M. T., Dabiri, S., Moradi, M., & Sanadgol, E. (2011). Prevalence of cytomegalovirus infection and its role in total immunoglobulin pattern in Iranian patients with different subtypes of multiple sclerosis. *The New Microbiologica*, 34(3), 263-274.
- Sanai, S. A., Saini, V., Benedict, R. H., Zivadinov, R., Teter, B. E., Ramanathan, M., & Weinstock-Guttman, B. (2016). Aging and multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 22(6), 717-725. <https://doi.org/10.1177/1352458516634871>
- Sandberg, L., Biström, M., Salzer, J., Vågberg, M., Svenningsson, A., & Sundström, P. (2016). Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 22(8), 1027-1031. <https://doi.org/10.1177/1352458515606986>
- Sanosyan, A., Fayd'herbe de Maudave, A., Bollore, K., Zimmermann, V., Foulongne, V., Van de Perre, P., & Tuailon, E. (2017). The impact of targeting repetitive BamHI-W sequences on the sensitivity and precision of EBV DNA quantification. *PLoS ONE*, 12(8), e0183856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183856>
- Sawcer, S., Franklin, R. J. M., & Ban, M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *The Lancet. Neurology*, 13(7), 700-709. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70041-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70041-9)
- Schafflick, D., Xu, C. A., Hartlehnert, M., Cole, M., Schulte-Mecklenbeck, A., Lautwein, T., Wolbert, J., Heming, M., Meuth, S. G., Kuhlmann, T., Gross, C. C., Wiendl, H., Yosef, N., & Meyer Zu Horste, G. (2020). Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nature Communications*, 11(1), 247. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14118-w>
- Schmiedel, B. J., Singh, D., Madrigal, A., Valdovino-Gonzalez, A. G., White, B. M., Zapardiel-Gonzalo, J., Ha, B., Altay, G., Greenbaum, J. A., McVicker, G., Seumois, G., Rao, A., Kronenberg, M., Peters, B., & Vijayanand, P. (2018). Impact of Genetic Polymorphisms on Human Immune Cell Gene Expression. *Cell*, 175(6), 1701-1715.e16.

- <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.022>
- Schönrich, G., Abdelaziz, M. O., & Raftery, M. J. (2022). Epstein Barr virus, interleukin-10 and multiple sclerosis: A ménage à trois. *Frontiers in Immunology*, 13, 1028972. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1028972>
- Schreiner, T.-G., & Genes, T.-M. (2021). Obesity and Multiple Sclerosis—A Multifaceted Association. *Journal of Clinical Medicine*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/jcm10122689>
- Schumann, J., Stanko, K., Schliesser, U., Appelt, C., & Sawitzki, B. (2015). Differences in CD44 Surface Expression Levels and Function Discriminates IL-17 and IFN- γ Producing Helper T Cells. *PLoS ONE*, 10(7), e0132479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132479>
- Schwenkenbecher, P., Wurster, U., Konen, F. F., Gingele, S., Sühs, K.-W., Wattjes, M. P., Stangel, M., & Skripuletz, T. (2019). Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 10, 188. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00188>
- Sedighi, S., Gholizadeh, O., Yasamineh, S., Akbarzadeh, S., Amini, P., Favakehi, P., Afkhami, H., Firouzi-Amandi, A., Pahlevan, D., Eslami, M., Yousefi, B., Poortahmasebi, V., & Dadashpour, M. (2022a). Comprehensive Investigations Relationship Between Viral Infections and Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Current Microbiology*, 80(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03112-z>
- Sedighi, S., Gholizadeh, O., Yasamineh, S., Akbarzadeh, S., Amini, P., Favakehi, P., Afkhami, H., Firouzi-Amandi, A., Pahlevan, D., Eslami, M., Yousefi, B., Poortahmasebi, V., & Dadashpour, M. (2022b). Comprehensive Investigations Relationship Between Viral Infections and Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Current Microbiology*, 80(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03112-z>
- Sempik, I., Dziadkowiak, E., Moreira, H., Zimny, A., & Pokryszko-Dragan, A. (2024). Primary Progressive Multiple Sclerosis—A Key to Understanding and Managing Disease Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 8751. <https://doi.org/10.3390/ijms25168751>
- Shannon-Lowe, C., & Rickinson, A. (2019). The Global Landscape of EBV-Associated Tumors. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00713>
- Shannon-Lowe, C., & Rowe, M. (2014). Epstein Barr virus entry; kissing and conjugation. *Current Opinion in Virology*, 4, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.12.001>
- Shareena, G., & Kumar, D. (2023). Epigenetics of Epstein Barr virus—A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1869(8), 166838. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166838>
- Sharma, K., Chaudhary, D., Beard, K., Srivastava, S., Khalid, S. H., & Sriwastava, S. (2022). A comprehensive review of varicella-zoster virus, herpes simplex virus and cryptococcal infections associated with sphingosine-1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis

- patients. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 59, 103675. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103675>
- Sharma, S., Findlay, G. M., Bandukwala, H. S., Oberdoerffer, S., Baust, B., Li, Z., Schmidt, V., Hogan, P. G., Sacks, D. B., & Rao, A. (2011). Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11381-11386. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019711108>
- Sharma, S., & Thomas, P. G. (2014). The two faces of heterologous immunity: Protection or immunopathology. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(3), 405-416. <https://doi.org/10.1189/jlb.0713386>
- Sheik-Ali, S. (2017). Infectious mononucleosis and multiple sclerosis – Updated review on associated risk. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 14, 56-59. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.02.019>
- Shim, Y.-S., Kim, C.-W., & Lee, W.-K. (1998). Sequence Variation of EBNA2 of Epstein Barr Virus Isolates from Korea. *Molecules and Cells*, 8(2), 226-232. [https://doi.org/10.1016/S1016-8478\(23\)13417-0](https://doi.org/10.1016/S1016-8478(23)13417-0)
- Shirai, R., & Yamauchi, J. (2022). New Insights into Risk Genes and Their Candidates in Multiple Sclerosis. *Neurology International*, 15(1), 24-39. <https://doi.org/10.3390/neurolint15010003>
- Signoriello, E., Bonavita, S., Sinisi, L., Russo, C. V., Maniscalco, G. T., Casertano, S., Saccà, F., Lanzillo, R., Morra, V. B., & Lus, G. (2020). Is antibody titer useful to verify the immunization after VZV Vaccine in MS patients treated with Fingolimod? A case series. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 40, 101963. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.101963>
- Simon, K. C., Munger, K. L., Kraft, P., Hunter, D. J., De Jager, P. L., & Ascherio, A. (2011). Genetic predictors of 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Journal of neurology*, 258(9), 1676-1682. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6001-5>
- Simon, K. C., Schmidt, H., Loud, S., & Ascherio, A. (2015). Risk factors for multiple sclerosis, neuromyelitis optica and transverse myelitis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 21(6), 703-709. <https://doi.org/10.1177/1352458514551780>
- Simon, K. C., van der Mei, I. a. F., Munger, K. L., Ponsonby, A., Dickinson, J., Dwyer, T., Sundström, P., & Ascherio, A. (2010). Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology*, 74(17), 1365-1371. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181dad57e>
- Sintzel, M. B., Rametta, M., & Reder, A. T. (2017). Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurology and Therapy*, 7(1), 59-85. <https://doi.org/10.1007/s40120-017-0086-4>
- Smatti, M. K., Al-Sadeq, D. W., Ali, N. H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., & Nasrallah, G. K. (2018a). Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene

- Among Healthy Population: An Update. *Frontiers in Oncology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00211>
- Smatti, M. K., Al-Sadeq, D. W., Ali, N. H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., & Nasrallah, G. K. (2018b). Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Frontiers in Oncology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00211>
- Soldan, S. S., & Lieberman, P. M. (2023). Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. *Nature Reviews Microbiology*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00770-5>
- Sommermann, T., Yasuda, T., Ronen, J., Wirtz, T., Weber, T., Sack, U., Caeser, R., Zhang, J., Li, X., Chu, V. T., Jauch, A., Unger, K., Hodson, D. J., Akalin, A., & Rajewsky, K. (2020). Functional interplay of Epstein Barr virus oncoproteins in a mouse model of B cell lymphomagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(25), 14421-14432. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921139117>
- Sotelo, J., Ordoñez, G., & Pineda, B. (2007a). Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 254(4), 493-500. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-0402-x>
- Sotelo, J., Ordoñez, G., & Pineda, B. (2007b). Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 254(4), 493-500. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-0402-x>
- Sotelo, J., Ordoñez, G., Pineda, B., & Flores, J. (2014). The participation of varicella zoster virus in relapses of multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 119, 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.12.020>
- Speck, P., Haan, K. M., & Longnecker, R. (2000). Epstein Barr virus entry into cells. *Virology*, 277(1), 1-5. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0624>
- Staras, S. A. S., Dollard, S. C., Radford, K. W., Flanders, W. D., Pass, R. F., & Cannon, M. J. (2006). Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(9), 1143-1151. <https://doi.org/10.1086/508173>
- Su, Z. Y., Siak, P. Y., Leong, C.-O., & Cheah, S.-C. (2023). The role of Epstein–Barr virus in nasopharyngeal carcinoma. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1116143. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1116143>
- Subei, A. M., & Cohen, J. A. (2015). Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis. *CNS Drugs*, 29(7), 565-575. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0261-z>
- Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X., & Zhang, B. (2023). T cells in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1-50. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>
- Sundqvist, E., Bäärnhielm, M., Alfredsson, L., Hillert, J., Olsson, T., & Kockum, I. (2010). Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 18(12), 1349-1352. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.113>
- Sundqvist, E., Bergström, T., Daialhosein, H., Nyström, M., Sundström, P., Hillert, J., Alfredsson, L.,

- Kockum, I., & Olsson, T. (2014). Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 20(2), 165-173. <https://doi.org/10.1177/1352458513494489>
- Sundqvist, E., Sundström, P., Lindén, M., Hedström, A. K., Aloisi, F., Hillert, J., Kockum, I., Alfredsson, L., & Olsson, T. (2012). Lack of replication of interaction between EBNA1 IgG and smoking in risk for multiple sclerosis. *Neurology*, 79(13), 1363-1368. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31826c1ab7>
- Tafti, D., Ehsan, M., & Xixis, K. L. (2023). Multiple Sclerosis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499849/>
- Telford, M., Hughes, D. A., Juan, D., Stoneking, M., Navarro, A., & Santpere, G. (2020). Expanding the Geographic Characterisation of Epstein–Barr Virus Variation through Gene-Based Approaches. *Microorganisms*, 8(11), 1686. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111686>
- Tengvall, K., Huang, J., Hellström, C., Kammer, P., Biström, M., Ayoglu, B., Lima Bomfim, I., Stridh, P., Butt, J., Brenner, N., Michel, A., Lundberg, K., Padyukov, L., Lundberg, I. E., Svenungsson, E., Ernberg, I., Olafsson, S., Diltthey, A. T., Hillert, J., ... Kockum, I. (2019). Molecular mimicry between Anoctamin 2 and Epstein Barr virus nuclear antigen 1 associates with multiple sclerosis risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(34), 16955-16960. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902623116>
- Thakolwiboon, S., Zhao-Fleming, H., Karukote, A., Pachariyanon, P., Williams, H. G., & Avila, M. (2020a). Regional differences in the association of cytomegalovirus seropositivity and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 45, 102393. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102393>
- Thakolwiboon, S., Zhao-Fleming, H., Karukote, A., Pachariyanon, P., Williams, H. G., & Avila, M. (2020b). Regional differences in the association of cytomegalovirus seropositivity and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 45, 102393. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102393>
- Thakolwiboon, S., Zhao-Fleming, H., Karukote, A., Pachariyanon, P., Williams, H. G., & Avila, M. (2020c). Regional differences in the association of cytomegalovirus seropositivity and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 45, 102393. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102393>
- Thines, L., Roushar, F. J., Hedman, A. C., & Sacks, D. B. (2023). The IQGAP scaffolds: Critical nodes bridging receptor activation to cellular signaling. *The Journal of Cell Biology*, 222(6), e202205062. <https://doi.org/10.1083/jcb.202205062>
- Thomas, O. G., Bronge, M., Tengvall, K., Akpınar, B., Nilsson, O. B., Holmgren, E., Hessa, T., Gafvelin, G., Khademi, M., Alfredsson, L., Martin, R., Guerreiro-Cacais, A. O., Grönlund, H., Olsson, T., & Kockum, I. (s. f.). Cross-reactive EBNA1 immunity targets alpha-crystallin B and is associated with multiple sclerosis. *Science Advances*, 9(20), eadg3032.

- <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg3032>
- Thomas, O. G., Rickinson, A., & Palendira, U. (2023). Epstein–Barr virus and multiple sclerosis: Moving from questions of association to questions of mechanism. *Clinical & Translational Immunology*, 12(5), e1451. <https://doi.org/10.1002/cti2.1451>
- Thomasini, R. L., Pereira, D. S., Pereira, F. S. M., Mateo, E. C., Mota, T. N., Guimarães, G. G., Pereira, L. S. M., Lima, C. X., Teixeira, M. M., & Teixeira, A. L. (2017). Aged-associated cytomegalovirus and Epstein Barr virus reactivation and cytomegalovirus relationship with the frailty syndrome in older women. *PLoS ONE*, 12(7), e0180841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180841>
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., ... Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet. Neurology*, 17(2), 162-173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B., & Ciccarelli, O. (2018). Multiple sclerosis. *The Lancet*, 391(10130), 1622-1636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1)
- Tierney, R. J., Edwards, R. H., Sitki-Green, D., Croom-Carter, D., Roy, S., Yao, Q., Raab-Traub, N., & Rickinson, A. B. (2006). Multiple Epstein-Barr Virus Strains in Patients with Infectious Mononucleosis: Comparison of Ex Vivo Samples with In Vitro Isolates by Use of Heteroduplex Tracking Assays. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(2), 287-297. <https://doi.org/10.1086/498913>
- Tiguman, G. M. B., Poll, L. B., Alves, C. E. de C., Pontes, G. S., Silva, M. T., & Galvao, T. F. (2020). Seroprevalence of cytomegalovirus and its coinfection with Epstein Barr virus in adult residents from Manaus: A population-based study. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 53, e20190363. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0363-2019>
- Till, C., Ghassemi, R., Aubert-Broche, B., Kerbrat, A., Collins, D. L., Narayanan, S., Arnold, D. L., Desrocher, M., Sled, J. G., & Banwell, B. L. (2011). MRI correlates of cognitive impairment in childhood-onset multiple sclerosis. *Neuropsychology*, 25(3), 319-332. <https://doi.org/10.1037/a0022051>
- Tobias, D. K., Luttmann-Gibson, H., Mora, S., Danik, J., Bubes, V., Copeland, T., LeBoff, M. S., Cook, N. R., Lee, I.-M., Buring, J. E., & Manson, J. E. (2023). Association of Body Weight With Response to Vitamin D Supplementation and Metabolism. *JAMA Network Open*, 6(1), e2250681. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.50681>
- Tonoyan, L., Vincent-Bugnas, S., Olivieri, C.-V., & Doglio, A. (2019). New Viral Facets in Oral Diseases: The EBV Paradox. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5861. <https://doi.org/10.3390/ijms20235861>
- Torkildsen, Ø., Myhr, K.-M., & Bø, L. (2016). Disease-modifying treatments for multiple sclerosis – a

- review of approved medications. *European Journal of Neurology*, 23(S1), 18-27. <https://doi.org/10.1111/ene.12883>
- Tralongo, P., Bakacs, A., & Larocca, L. M. (2024). EBV-Related Lymphoproliferative Diseases: A Review in Light of New Classifications. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 16(1), e2024042. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2024.042>
- Tschochner, M., Leary, S., Cooper, D., Strautins, K., Chopra, A., Clark, H., Choo, L., Dunn, D., James, I., Carroll, W. M., Kermode, A. G., & Nolan, D. (2016). Identifying Patient-Specific Epstein Barr Nuclear Antigen-1 Genetic Variation and Potential Autoreactive Targets Relevant to Multiple Sclerosis Pathogenesis. *PLOS ONE*, 11(2), e0147567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147567>
- Tyler, K. L. (s. f.). The enigmatic links between Epstein Barr virus infection and multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(9), e160468. <https://doi.org/10.1172/JCI160468>
- Tzellos, S., & Farrell, P. J. (2012). Epstein Barr Virus Sequence Variation—Biology and Disease. *Pathogens*, 1(2), 156-175. <https://doi.org/10.3390/pathogens1020156>
- Uyeda, A., & Muramatsu, R. (2020). Molecular Mechanisms of Central Nervous System Axonal Regeneration and Remyelination: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21218116>
- Vandebergh, M., Degryse, N., Dubois, B., & Goris, A. (2022). Environmental risk factors in multiple sclerosis: Bridging Mendelian randomization and observational studies. *Journal of Neurology*, 269(8), 4565-4574. <https://doi.org/10.1007/s00415-022-11072-4>
- Vandebergh, M., Dubois, B., & Goris, A. (2022). Effects of Vitamin D and Body Mass Index on Disease Risk and Relapse Hazard in Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 9(3). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001165>
- Vanheusden, M., Stinissen, P., 't Hart, B. A., & Hellings, N. (2015a). Cytomegalovirus: A culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends in Molecular Medicine*, 21(1), 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.002>
- Vanheusden, M., Stinissen, P., 't Hart, B. A., & Hellings, N. (2015b). Cytomegalovirus: A culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends in Molecular Medicine*, 21(1), 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.002>
- Varvatsi, D., Richter, J., Tryfonos, C., Pantzaris, M., & Christodoulou, C. (2021a). Association of Epstein Barr virus latently expressed genes with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103008>
- Varvatsi, D., Richter, J., Tryfonos, C., Pantzaris, M., & Christodoulou, C. (2021b). Association of Epstein Barr virus latently expressed genes with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 52, 103008. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103008>
- Venkatesan, A., & Johnson, R. T. (2014). Infections and multiple sclerosis. *Handbook of Clinical*

- Neurology*, 122, 151-171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00007-8>
- Vietzen, H., Berger, S. M., Kühner, L. M., Furlano, P. L., Bsteh, G., Berger, T., Rommer, P., & Puchhammer-Stöckl, E. (2023). Ineffective control of Epstein Barr-virus-induced autoimmunity increases the risk for multiple sclerosis. *Cell*, 186(26), 5705-5718.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.015>
- Virtanen, J. O., & Jacobson, S. (2012). Viruses and Multiple Sclerosis. *CNS & neurological disorders drug targets*, 11(5), 528-544.
- Virtanen, J., Wohler, J., Fenton, K., Reich, D., & Jacobson, S. (2014). Oligoclonal bands in multiple sclerosis reactive against two herpesviruses and association with magnetic resonance imaging findings. *Multiple Sclerosis Journal*, 20(1), 27-34. <https://doi.org/10.1177/1352458513490545>
- von Büdingen, H.-C., Gulati, M., Kuenzle, S., Fischer, K., Rupprecht, T. A., & Goebels, N. (2010). Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system autoimmune demyelination produce «oligoclonal bands». *Journal of Neuroimmunology*, 218(1-2), 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.10.005>
- Voskuhl, R. (2011). Sex differences in autoimmune diseases. *Biology of Sex Differences*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-2-1>
- Voskuhl, R. R., Patel, K., Paul, F., Gold, S. M., Scheel, M., Kuchling, J., Cooper, G., Asseyer, S., Chien, C., Brandt, A. U., Meyer, C. E., & MacKenzie-Graham, A. (2020). Sex differences in brain atrophy in multiple sclerosis. *Biology of Sex Differences*, 11(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00326-3>
- Wagner, C. A., Roqué, P. J., & Goverman, J. M. (2019). Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1), e20190460. <https://doi.org/10.1084/jem.20190460>
- Wagner, C. A., Roqué, P. J., Mileur, T. R., Liggitt, D., & Goverman, J. M. (2020). Myelin-specific CD8+ T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(1), 203-213. <https://doi.org/10.1172/JCI132531>
- Wagner, H. J., Hornef, M., Teichert, H. M., & Kirchner, H. (1994). Sex difference in the serostatus of adults to the Epstein Barr virus. *Immunobiology*, 190(4-5), 424-429. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80613-3](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80613-3)
- Wagner, H.-J., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2004). Plasma viral load of Epstein–Barr virus and risk of multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 11(12), 833-834. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2004.00871.x>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., & Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 26(14), 1816-1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>

- Wang, D., Liebowitz, D., & Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, 43(3, Part 2), 831-840. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90256-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90256-9)
- Wang, F. (2013). Nonhuman primate models for Epstein Barr virus infection. *Current Opinion in Virology*, 3(3), 233-237. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.03.003>
- Wang, J. C., Lee, J. Y.-J., Christian, S., Dang-Lawson, M., Pritchard, C., Freeman, S. A., & Gold, M. R. (2017). The Rap1-cofilin-1 pathway coordinates actin reorganization and MTOC polarization at the B cell immune synapse. *Journal of Cell Science*, 130(6), 1094-1109. <https://doi.org/10.1242/jcs.191858>
- Wang, T. J., Zhang, F., Richards, J. B., Kestenbaum, B., van Meurs, J. B., Berry, D., Kiel, D. P., Streeten, E. A., Ohlsson, C., Koller, D. L., Peltonen, L., Cooper, J. D., O'Reilly, P. F., Houston, D. K., Glazer, N. L., Vandenput, L., Peacock, M., Shi, J., Rivadeneira, F., ... Spector, T. D. (2010). Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: A genome-wide association study. *Lancet (London, England)*, 376(9736), 180-188. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60588-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60588-0)
- Wang, X., Wang, Y., Wu, G., Chao, Y., Sun, Z., & Luo, B. (2012). Sequence analysis of Epstein Barr virus EBNA-2 gene coding amino acid 148-487 in nasopharyngeal and gastric carcinomas. *Virology Journal*, 9, 49. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-49>
- Wang, Z., Kennedy, P. G., Dupree, C., Wang, M., Lee, C., Pointon, T., Langford, T. D., Graner, M. W., & Yu, X. (2021). Antibodies from Multiple Sclerosis Brain Identified Epstein Barr Virus Nuclear Antigen 1 & 2 Epitopes which Are Recognized by Oligoclonal Bands. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 16(3), 567-580. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09948-1>
- Wang, Z., Sadovnick, A. D., Traboulsee, A. L., Ross, J. P., Bernales, C. Q., Encarnacion, M., Yee, I. M., de Lemos, M., Greenwood, T., Lee, J. D., Wright, G., Ross, C. J., Zhang, S., Song, W., & Vilariño-Güell, C. (2016). Nuclear Receptor NR1H3 in Familial Multiple Sclerosis. *Neuron*, 90(5), 948-954. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.039>
- Watanabe, T., Wang, S., & Kaibuchi, K. (2015). IQGAPs as Key Regulators of Actin-cytoskeleton Dynamics. *Cell Structure and Function*, 40(2), 69-77. <https://doi.org/10.1247/csf.15003>
- Waubant, E., Lucas, R., Mowry, E., Graves, J., Olsson, T., Alfredsson, L., & Langer-Gould, A. (2019). Environmental and genetic risk factors for MS: An integrated review. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 6(9), 1905-1922. <https://doi.org/10.1002/acn3.50862>
- Wei, T., & Lambert, P. F. (2021). Role of IQGAP1 in Carcinogenesis. *Cancers*, 13(16), 3940. <https://doi.org/10.3390/cancers13163940>
- Wesnes, K., Riise, T., Casetta, I., Drulovic, J., Granieri, E., Holmøy, T., Kampman, M. T., Landtblom, A.-M., Lauer, K., Lossius, A., Magalhaes, S., Pekmezovic, T., Bjørnevik, K., Wolfson, C., Pugliatti, M., & Myhr, K.-M. (2015). Body size and the risk of multiple sclerosis in Norway

- and Italy: The EnvIMS study. *Multiple Sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England), 21(4), 388-395. <https://doi.org/10.1177/1352458514546785>
- Westerlind, H., Ramanujam, R., Uvehag, D., Kuja-Halkola, R., Boman, M., Bottai, M., Lichtenstein, P., & Hillert, J. (2014). Modest familial risks for multiple sclerosis: A registry-based study of the population of Sweden. *Brain*, 137(3), 770-778. <https://doi.org/10.1093/brain/awt356>
- Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2019). Regulation of Astrocyte Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(1), a029009. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029009>
- White, C. D., Brown, M. D., & Sacks, D. B. (2009). IQGAPs in Cancer: A Family of Scaffold Proteins Underlying Tumorigenesis. *FEBS letters*, 583(12), 1817-1824. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.007>
- Wiendl, H., Gold, R., Berger, T., Derfuss, T., Linker, R., Mäurer, M., Aktas, O., Baum, K., Berghoff, M., Bittner, S., Chan, A., Czaplinski, A., Deisenhammer, F., Di Pauli, F., Du Pasquier, R., Enzinger, C., Fertl, E., Gass, A., Gehring, K., ... Zipp, F. (2021). Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG): Position statement on disease-modifying therapies for multiple sclerosis (white paper). *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 14, 17562864211039648. <https://doi.org/10.1177/17562864211039648>
- Willer, C. J., Dymont, D. A., Risch, N. J., Sadovnick, A. D., & Ebers, G. C. (2003). Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 12877-12882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1932604100>
- Williams, A., Piaton, G., & Lubetzki, C. (2007). Astrocytes—Friends or foes in multiple sclerosis? *Glia*, 55(13), 1300-1312. <https://doi.org/10.1002/glia.20546>
- Winter, J. R., Jackson, C., Lewis, J. E., Taylor, G. S., Thomas, O. G., & Stagg, H. R. (s. f.). Predictors of Epstein Barr virus serostatus and implications for vaccine policy: A systematic review of the literature. *Journal of Global Health*, 10(1), 010404. <https://doi.org/10.7189/jogh.10.010404>
- Wong, Y., Meehan, M. T., Burrows, S. R., Doolan, D. L., & Miles, J. J. (2022). Estimating the global burden of Epstein Barr virus-related cancers. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 148(1), 31-46. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03824-y>
- Wu, D. Y., Kalpana, G. V., Goff, S. P., & Schubach, W. H. (1996). Epstein Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *Journal of Virology*, 70(9), 6020-6028.
- Wu, G. F., & Alvarez, E. (2011). The immuno-pathophysiology of multiple sclerosis. *Neurologic clinics*, 29(2), 257-278. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2010.12.009>
- Xiao, J., Palefsky, J. M., Herrera, R., Berline, J., & Tugizov, S. M. (2009). EBV BMRF-2 facilitates cell-to-cell spread of virus within polarized oral epithelial cells. *Virology*, 388(2), 335-343. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.030>

- Xu, F.-H., Xiong, D., Xu, Y.-F., Cao, S.-M., Xue, W.-Q., Qin, H.-D., Liu, W.-S., Cao, J.-Y., Zhang, Y., Feng, Q.-S., Chen, L.-Z., Li, M.-Z., Liu, Z.-W., Liu, Q., Hong, M.-H., Shugart, Y. Y., Zeng, Y.-X., Zeng, M.-S., & Jia, W.-H. (2012). An epidemiological and molecular study of the relationship between smoking, risk of nasopharyngeal carcinoma, and Epstein Barr virus activation. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(18), 1396-1410. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs320>
- Yang, J. H., Rempe, T., Whitmire, N., Dunn-Pirio, A., & Graves, J. S. (2022). Therapeutic Advances in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2022.824926>
- Yang, X., Goldstein, A. M., Chen, C.-J., Rabkin, C. S., Chen, J.-Y., Cheng, Y.-J., Hsu, W.-L., Sun, B., Diehl, S. R., Liu, M.-Y., Walters, M., Shao, W., Ortiz-Conde, B. A., Whitby, D., Elmore, S. H., Gulley, M. L., & Hildesheim, A. (2006). Distribution of Epstein Barr viral load in serum of individuals from nasopharyngeal carcinoma high-risk families in Taiwan. *International Journal of Cancer*, 118(3), 780-784. <https://doi.org/10.1002/ijc.21396>
- Yap, L. F., Wong, A. K. C., Paterson, I. C., & Young, L. S. (2022). Functional Implications of Epstein Barr Virus Lytic Genes in Carcinogenesis. *Cancers*, 14(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/cancers14235780>
- Ye, Z., Chen, L., Zhong, H., Cao, L., Fu, P., & Xu, J. (2023). Epidemiology and clinical characteristics of Epstein Barr virus infection among children in Shanghai, China, 2017-2022. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1139068>
- Yea, C., Tellier, R., Chong, P., Westmacott, G., Marrie, R. A., Bar-Or, A., & Banwell, B. (2013). Epstein Barr virus in oral shedding of children with multiple sclerosis. *Neurology*, 81(16), 1392-1399. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a841e4>
- Yoshimura, S., Isobe, N., Yonekawa, T., Matsushita, T., Masaki, K., Sato, S., Kawano, Y., Yamamoto, K., Kira, J., & Consortium, the S. J. M. S. G. (2012). Genetic and Infectious Profiles of Japanese Multiple Sclerosis Patients. *PLOS ONE*, 7(11), e48592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048592>
- Ysraelit, M. C., & Correale, J. (2019). Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology*, 156(1), 9-22. <https://doi.org/10.1111/imm.13004>
- Yu, H., & Robertson, E. S. (2023). Epstein–Barr Virus History and Pathogenesis. *Viruses*, 15(3), 714. <https://doi.org/10.3390/v15030714>
- Zanella, L., Riquelme, I., Buchegger, K., Abanto, M., Ili, C., & Brebi, P. (2019a). A reliable Epstein Barr Virus classification based on phylogenomic and population analyses. *Scientific Reports*, 9(1), 9829. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45986-3>
- Zanella, L., Riquelme, I., Buchegger, K., Abanto, M., Ili, C., & Brebi, P. (2019b). A reliable Epstein Barr Virus classification based on phylogenomic and population analyses. *Scientific Reports*,

- 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45986-3>
- Zarghami, A., Li, Y., Claflin, S. B., van der Mei, I., & Taylor, B. V. (2021). Role of environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 21(12), 1389-1408. <https://doi.org/10.1080/14737175.2021.1978843>
- Zerboni, L., Sen, N., Oliver, S. L., & Arvin, A. M. (2014). Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, 12(3), 197-210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3215>
- Zhang, H., Alberts, E., Pongratz, V., Mühlau, M., Zimmer, C., Wiestler, B., & Eichinger, P. (2019). Predicting conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis—An imaging-based machine learning approach. *NeuroImage: Clinical*, 21, 101593. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.11.003>
- Zhao, X., & Jacob, C. (2023). Mechanisms of Demyelination and Remyelination Strategies for Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6373. <https://doi.org/10.3390/ijms24076373>
- Zhou, L., Deng, Y., Li, N., Zheng, Y., Tian, T., Zhai, Z., Yang, S., Hao, Q., Wu, Y., Song, D., Zhang, D., Lyu, J., & Dai, Z. (2019). Global, regional, and national burden of Hodgkin lymphoma from 1990 to 2017: Estimates from the 2017 Global Burden of Disease study. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0799-1>
- Ziemssen, T., Bhan, V., Chataway, J., Chitnis, T., Campbell Cree, B. A., Havrdova, E. K., Kappos, L., Labauge, P., Miller, A., Nakahara, J., Oreja-Guevara, C., Palace, J., Singer, B., Trojano, M., Patil, A., Rauser, B., & Hach, T. (2022). Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 10(1), e200064. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000200064>
- Zivadinov, R., Cerza, N., Hagemeyer, J., Carl, E., Badgett, D., Ramasamy, D. P., Weinstock-Guttman, B., & Ramanathan, M. (2016a). Humoral response to EBV is associated with cortical atrophy and lesion burden in patients with MS. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 3(1), e190. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000190>
- Zivadinov, R., Cerza, N., Hagemeyer, J., Carl, E., Badgett, D., Ramasamy, D. P., Weinstock-Guttman, B., & Ramanathan, M. (2016b). Humoral response to EBV is associated with cortical atrophy and lesion burden in patients with MS. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 3(1). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000190>
- Zivadinov, R., Chin, J., Horakova, D., Bergsland, N., Weinstock-Guttman, B., Tamaño-Blanco, M., Badgett, D., Hagemeyer, J., Tyblova, M., Carl, E., Krasensky, J., Vaneckova, M., Seidl, Z., Dwyer, M. G., Havrdova, E., & Ramanathan, M. (2014). Humoral responses to herpesviruses are associated with neurodegeneration after a demyelinating event: Results from the Multi-Center SET study. *Journal of Neuroimmunology*, 273(1-2), 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.012>

- Zivadinov, R., Nasuelli, D., Tommasi, M. A., Serafin, M., Bratina, A., Ukmar, M., Pirko, I., Johnson, A. J., Furlan, C., Pozzi-Mucelli, R. S., Monti-Bragadin, L., Grop, A., Zambon, M., Antonello, R. M., Cazzato, G., & Zorzon, M. (2006a). Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurological Research*, 28(3), 262-269. <https://doi.org/10.1179/016164106X98134>
- Zivadinov, R., Nasuelli, D., Tommasi, M. A., Serafin, M., Bratina, A., Ukmar, M., Pirko, I., Johnson, A. J., Furlan, C., Pozzi-Mucelli, R. S., Monti-Bragadin, L., Grop, A., Zambon, M., Antonello, R. M., Cazzato, G., & Zorzon, M. (2006b). Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurological Research*, 28(3), 262-269. <https://doi.org/10.1179/016164106X98134>
- Zivadinov, R., Ramanathan, M., Hagemeyer, J., Bergsland, N., Ramasamy, D. P., Durfee, J., Kolb, C., & Weinstock-Guttman, B. (2019). Teriflunomide's effect on humoral response to Epstein Barr virus and development of cortical gray matter pathology in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 36, 101388. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.101388>
- Zivadinov, R., Zorzon, M., Weinstock-Guttman, B., Serafin, M., Bosco, A., Bratina, A., Maggiore, C., Grop, A., Tommasi, M. A., Srinivasaraghavan, B., & Ramanathan, M. (2009). Epstein–Barr virus is associated with grey matter atrophy in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 80(6), 620-625. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.154906>

9. *Anexo*

Anexo A

Copia digital del certificado de aprobación del protocolo de investigación denominado Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple (EMERGE) N.º 37/14, expedido por el comité de Comité de Ética e Investigación de FLENI, en el año 2014 previo al comienzo del proyecto.



Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia
Instituto de Investigaciones Neurológicas Raúl Carrea
Dto. Docencia e Investigación
Montañeses 2325 – C1425AQK Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Tel. 5777-3200
www.fleni.org.ar – docencia@fleni.org.ar

Buenos Aires, 12 de Diciembre de 2014

Dr. Mauricio Farez
Investigador principal

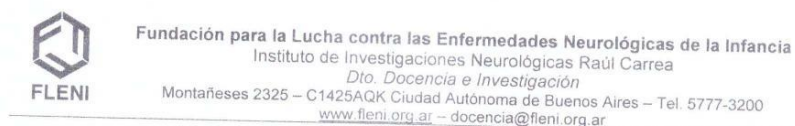
Ref: 37/14 Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein-Barr y el Riesgo de Esclerosis múltiple

El Comité de Ética ha aprobado el protocolo de referencia, en reunión de comité de ética del 11 de Diciembre de 2014

Dr. Gustavo Sevlever
Presidente Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas

Anexo B

Copia digital del certificado de reaprobación del protocolo de investigación denominado Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple (EMERGE) N.º 37/14, expedido por el comité de Comité de Ética e Investigación de FLENI, en el año 2016 previo al comienzo del proyecto.



Buenos Aires, Noviembre 2016

Dr. Mauricio Farez
Investigador principal

Ref: 37/14 Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein-Barr y el Riesgo de Esclerosis múltiple

El Comité de Ética ha aprobado el protocolo de referencia, en reunión de comité de ética del 11 de Diciembre de 2014, y se encuentra con aprobación vigente

Dr. Gustavo Sevlever
Presidente Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas

Anexo C

Copia digital del certificado de reaprobación del protocolo de investigación denominado Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple (EMERGE) N.º 37/14, expedido por el comité de Comité de Ética e Investigación de FLENI, en el año 2018 cuando se comenzó con el proyecto.

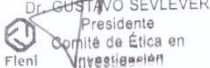


Dr. Mauricio Farez
INVESTIGADOR PRINCIPAL

S / D

Por la presente le comunico que este CEI ha decidido (reaprobar) el estudio denominado Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple. Numero de referencia interna 37/14

Firma del Presidente del CEI:
Aclaración de la firma:
Fecha: 12 de Septiembre de 2018



Anexo D

Copia digital del certificado de reaprobación del protocolo de investigación denominado Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple (EMERGE) N.º 37/14, expedido por el comité de Comité de Ética e Investigación de FLENI, en el año 2020 cuando se estaba llevando a cabo el proyecto.



Dr. Mauricio Farez
INVESTIGADOR PRINCIPAL

S / D

Por la presente le comunico que este CEI ha decidido (reaprobar) el estudio denominado Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple. Numero de referencia interna 37/14

Firma del Presidente del CEI:
Aclaración de la firma: Dr. Gustavo Sevlever
Fecha: 18 Mayo 2020

Anexo E

Copia digital del certificado de reaprobación del protocolo de investigación denominado Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple (EMERGE) N.º 37/14, expedido por el comité de Comité de Ética e Investigación de FLENI, en el año 2022 cuando se estaba llevando a cabo el proyecto.

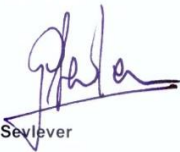


Fleni Neurología
Neurocirugía
Rehabilitación

Dr. Mauricio Farez
INVESTIGADOR PRINCIPAL

S / D

Por la presente le comunico que este CEI en reunión de comité de ética de fecha 25 de Agosto de 2022 ha decidido (reaprobar) el estudio denominado Estudio Multicéntrico acerca del virus de Epstein Barr y el Riesgo de Esclerosis Múltiple. Numero de referencia interna 37/14



Firma del Presidente del CEI:
Aclaración de la firma: Dr. Gustavo Seylever
Fecha: 25 de Agosto de 2022

Anexo F

Modelo de consentimiento informado firmado voluntariamente por los pacientes y controles enrolados en este estudio.

1



Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia
Instituto de Investigaciones Neurológicas Raúl Carrea
Dto. Docencia e Investigación
Montañeses 2325 – C1428AQK Capital Federal – Tel. 5777-3200

CONSENTIMIENTO INFORMADO PROTOCOLO EMERGE

Buenos Aires.....de.....

Ud. Ha sido invitado/a a participar en un estudio clínico sobre esclerosis múltiple. A fin de realizar dicha evaluación se le solicitará la extracción de 2 tubos de sangre por única vez. El presente estudio no generará un beneficio directo e inmediato para los pacientes con Esclerosis Múltiple, pero permitirá conocer nuevos datos acerca de la enfermedad. En un futuro estos datos podrían ser utilizados para otros estudios de investigación clínica. Toda la información recolectada será mantenida bajo estricto secreto médico. En ningún momento su nombre y/o apellido serán divulgados o publicados. Se deja establecido que tanto FLENI como los investigadores a cargo del estudio no se harán cargo de ninguna compensación que surgiera como consecuencia de su participación en el presente protocolo de estudio.

La investigación es voluntaria. Tengo el derecho a negarme a participar sin poner en peligro mi atención médica en el futuro o mis interacciones con la institución.

Si yo deseo participar debería firmar a continuación

Firma de quien obtiene el consentimiento
Aclaración y fecha

Firma del participante en el estudio
Aclaración y fecha

Anexo G

Aprobación del comité de ética para el uso de animales de laboratorio.



Institutional Animal Care and Use Committee
Brigham And Women's Hospital
75 Francis Street
Boston, MA 02115
Tel: 617-732-5500

Notification of IACUC Amendment Approval

Protocol #: 2016N000335

Date:	09/11/2023
To:	Francisco Quintana, Ph.D BWH Mass General Brigham > BWH > Neurology
From:	Institutional Animal Care and Use Committee
Title of Protocol:	Immunomodulation for the treatment of experimental autoimmunity
Sponsor Funding Support:	Role of aryl hydrocarbon receptor in IL-10 producing Tr1 regulatory cells NIH-NIAID National Institute of Allergy and Infectious Diseases 5R01AI093903-05 Quintana & ONO Ono Pharmaceutical Company, Ltd. DEVELOPMENT OF A DRUG DISCOVERY PIPELINE FOR INNATE IMMUNE MODULATION IN MS National Multiple Sclerosis Society PA-1501-02847 Role of IL-27 signaling in dendritic cells on the development of EAE National Multiple Sclerosis Society RG 4741A1/2 Questcor Research Fellowship Award Program Applicant: Dr. Maisa C. Silveira Takenaka Mallinckrodt Pharmaceuticals Adaptive Biotech SRA PRECISION IMMUNOTHERAPY FOR T CELL DRIVEN DISEASES Adaptive Biotechnologies Corporation Role of AHR in dendritic cells in the control of CNS autoimmunity National Multiple Sclerosis Society Role of aryl hydrocarbon receptor in IL-10 producing Tr1 regulatory cells



Institutional Animal Care and Use Committee
Brigham And Women's Hospital
75 Francis Street
Boston, MA 02115
Tel: 617-732-5500

NIH

2R56AI093903-06A1

The role of the IFNAR1/AhR signaling axis in astrocyte regulation and remediation of multiple sclerosis pathogenesis

NIH

5F32NS101790-02

Michael Wheeler PIN Traveling Neuroscience Fellowship

Brigham and Women's Hospital - Internal Funds

Role of astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis

National Multiple Sclerosis Society

JF 2161-A-5

A droplet microfluidic platform to identify immune cell interactions using pooled CRISPR screens

President and Fellows of Harvard College

NIH-National Institutes of Health

5U19AI133524-03

Analysis of sex differences in CNS inflammation by scRNA-seq

Brigham and Women's Hospital - Internal Funds

Immunomodulatory effects of bilirubin are mediated through the aryl hydrocarbon receptor, O2 and purinergic pathways

Beth Israel Deaconess Medical Center

NIH

5R01DK108894-05

Analysis of Connectome Perturbations in Alzheimer's Disease

Massachusetts General Hospital

Massachusetts Life Sciences Center

Round 3

Regulation of CNS Autoimmunity

NIH-NIAID National Institute of Allergy and Infectious Diseases

5R01AI126880-05

Therapeutic and environmental control of astrocyte function during autoimmune neuroinflammation.

National Multiple Sclerosis Society



Institutional Animal Care and Use Committee

Brigham And Women's Hospital
75 Francis Street
Boston, MA 02115
Tel: 617-732-5500

RR-1601-07385

Role of AHR in Dendritic Cells in the Control of the
CNS Autoimmunity

NIH-National Institutes of Health

5R01ES025530-05

ROLE OF ASTROCYTE SUBSETS IN THE
GLIOBLASTOMA MICROENVIRONMENT

Dana Farber Cancer Institute

Oppenheimer Generations Foundation

9619646

Molecular Control of Astrocytes in CNS Inflammation

NIH-National Institutes of Health

5K99NS114111-02

Neuroimmune Connectome Perturbations in Alzheimer's
Disease

Cure Alzheimer's Fund

(Carolina Manganeli Polonio) MECHANISMS OF
DISEASE PATHOGENESIS AND THERAPEUTIC
TARGETS FOR MS

Herbert R. Mayer and Jeanne C. Mayer Foundation

ADVANCE: EHR and Imaging driven Prognostic
Modeling of Renal Cell Carcinoma

President and Fellows of Harvard College

Merck & Company, Inc.

Subproject for Institution # 2016D003141 (Project 1)

National Multiple Sclerosis Society

Progressive MS Alliance Organization

PA-1604-08459

RABID-SEQ BASED INTERROGATION OF
GLIOBLASTOMA-ASTROCYTE INTERACTIONS

Violet Therapeutics, Inc.

IGNITE: Sigma receptor 1 antagonists as novel
therapeutic agents for neurodegeneration

Brigham and Women's Hospital, Inc.

Molecular control of astrocytes in CNS inflammation

National Multiple Sclerosis Society

RG-1902-33606

Development of drugs that modify CNS innate immunity



Institutional Animal Care and Use Committee
Brigham And Women's Hospital
75 Francis Street
Boston, MA 02115
Tel: 617-732-5500

for the treatment of Multiple Sclerosis

NIH-National Institutes of Health

5R61NS114383-02

Role of AHR in Dendritic Cells in the Control of the
CNS Autoimmunity

NIH-National Institutes of Health

5R01ES025530-07

EXTERNAL GRANTS - Collaborative Center for XDP
- Pledge 2021_4th Pledge

Mgh

239295

Analysis of Connectome Perturbations in Aging and
Alzheimer's Disease

EMBO

1009-2021

Project 3: Modulation of sphingolipid metabolism to
arrest neurodegeneration (Subproject on #
2017D003791)

King Abdulaziz City for Science & Techno

AHR-mediated immunosuppression in glioblastoma
NIH-National Institutes of Health

5R01ES029136-05

PI

Wellcome Leap Inc.

Control of Local CNS Inflammation

NIH

5R01NS102807-05

Species / Number:

Mice (Mus) / 24300

Amendment #:

AME153

Triennial Due Date:

03/16/2024

This Amendment has been reviewed and approved by the BWH IACUC (OLAW Assurance A4752-01).

As Principal Investigator you are responsible for the following:

1. Conduct of procedures in compliance with the approved protocol.
2. Compliance with BWH IACUC/CCM Policies governing the care and use of animals.
3. Submission of project changes for IACUC review and approval prior to initiation of the change.
4. Submission of triennial review applications to the IACUC.



Institutional Animal Care and Use Committee
Brigham And Women's Hospital
75 Francis Street
Boston, MA 02115
Tel: 617-732-5500

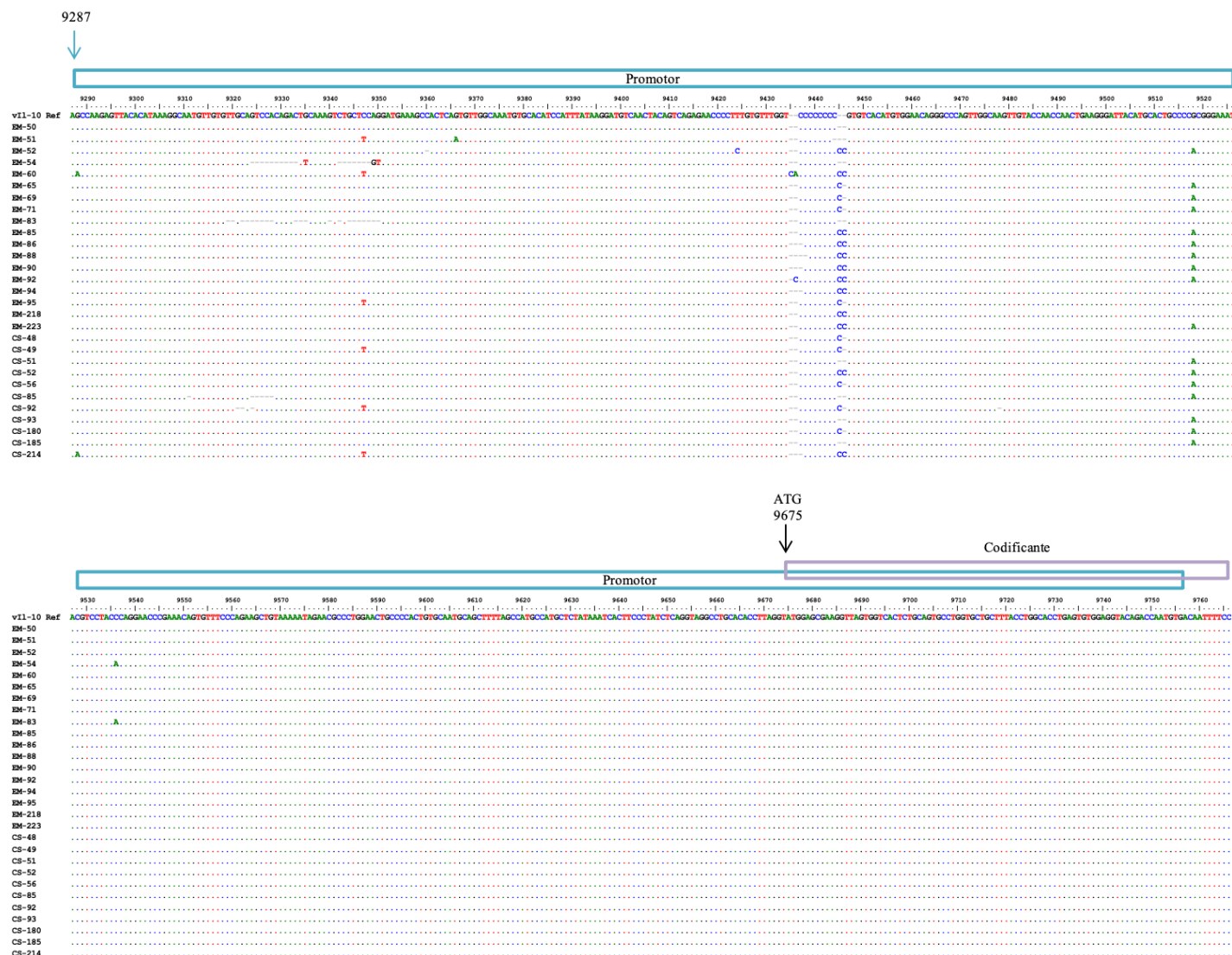
5. Adherence to safety requirements for the use of any hazardous agents approved on this protocol.
6. Informing the IACUC of unanticipated pain and distress, adverse events or unexpected deaths following the conduct of research procedures.
7. Ensuring only authorized personnel identified on an approved protocol or approved in advance by the CCM Director are permitted in the animal facilities.

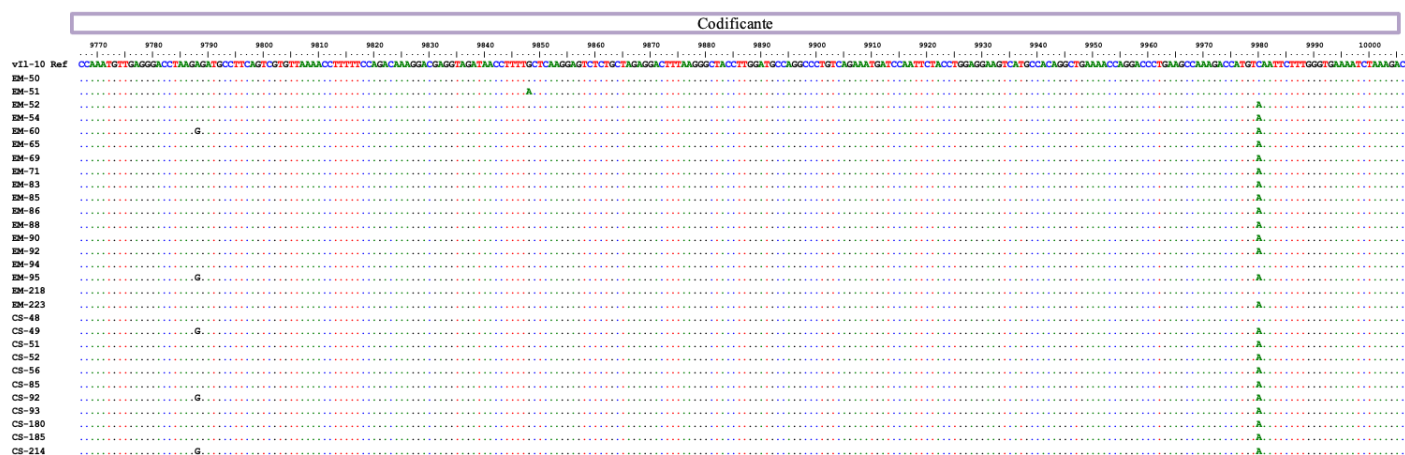
Please direct questions and correspondence to **Ashley Stamatis**, IACUC Administrator, Tel: 307-0203

CC: Lena Srun, Mass General Brigham, Other
Jessica Kenison-White, Neurology, Co-Investigator
Michael Wheeler, Division of Multiple Sclerosis & Neuro Immunology, Neurology, Co-Investigator
Francisco Quintana, Neurology, Principal Investigator
LaShaunda Gayden, Neurology
Matthew Varley, Neurology
Todd Erceg, Neurology
Tony Xue, Neurology
Caitlin McCarty, Neurology
Brenna Ford, Neurology

Anexo H

Alineamiento de secuencias de ADN de la región comprendida entre las coordenadas 9287 y 10124 del gen *BCRF1* que codifica para la proteína viral vIL10. Dichas coordenadas son respecto a la secuencia de referencia NC007605.1. Se presenta esta región dado que contiene tanto el promotor como la secuencia codificante de proteínas. Las flechas indican las posiciones de comienzo y terminación del gen. Las cajas resaltan el promotor (celeste) y la secuencia codificante de proteínas (violeta). Además, se presentan la secuencia de la referencia NC007605.1 y de pacientes (prefijo EM) y controles (prefijo CS).





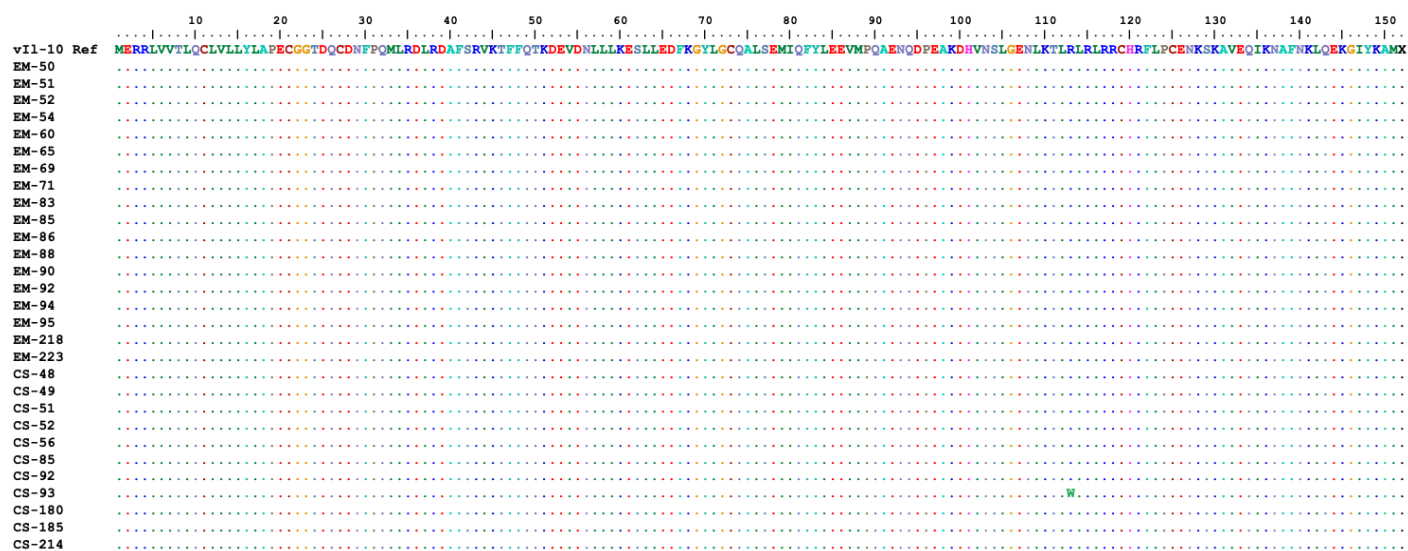
CAT

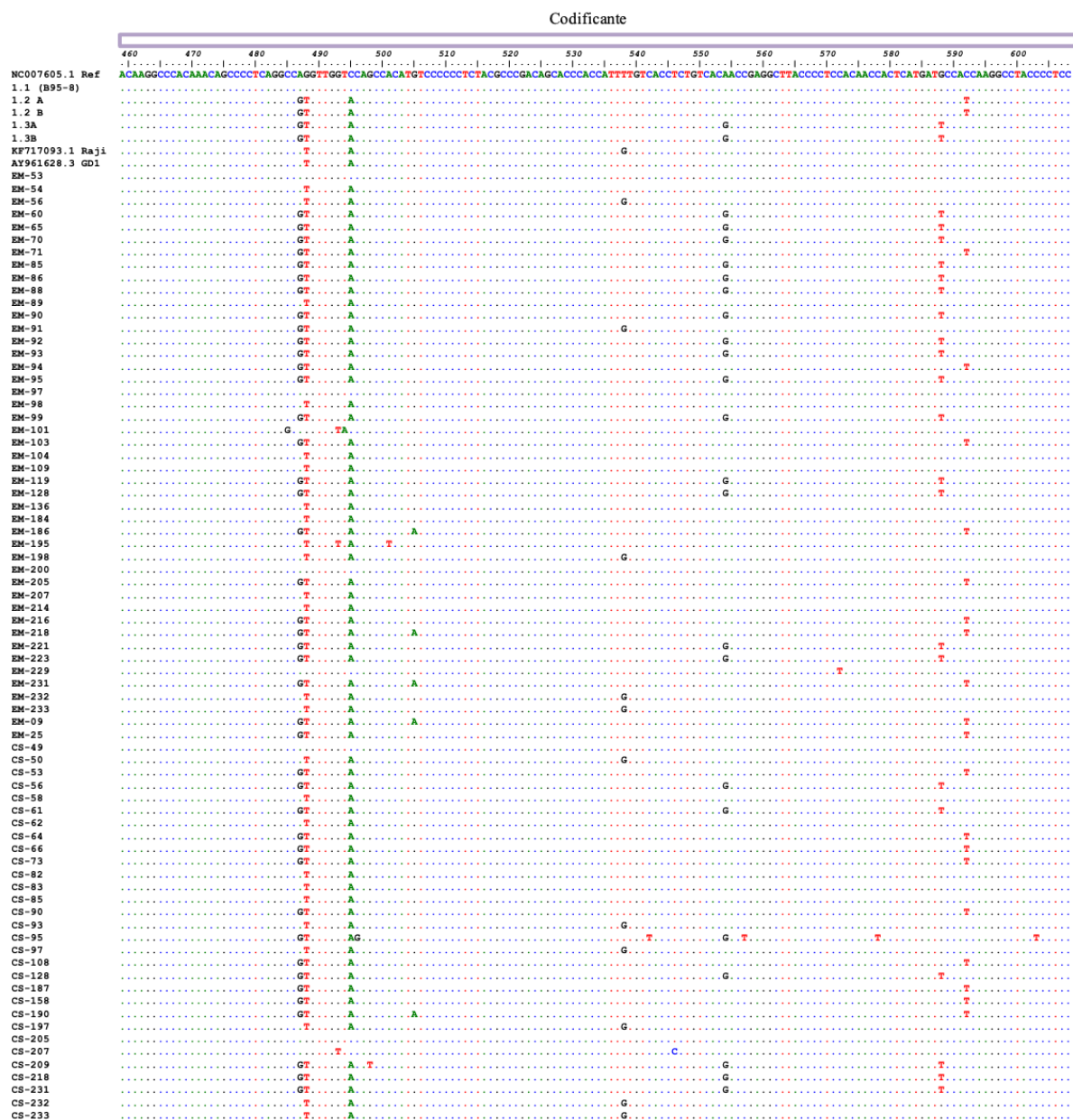
10124



Anexo I

Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la proteína vIL10. Se presentan la secuencia de la referencia NC007605.1 y de pacientes (prefijo EM) y controles (prefijo CS).





	Codificante														
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750
NC007605.1 Ref	TACCCCTCTGCCACCTGCACACATA	ACGGTGCCACCAAGGCTACCCGTCCTACCACTGTGCCACCCACACACTACTACGGTACTACAAGGCTACCGAACCTTCAACCCACACCATCACCAACGCAATGCATCTCCCTGTCTT													
1.1 (B95-8)															
1.2 A															
1.2 B															
1.3A															
1.3B															
KF717093.1 Raji															
AY961628.3 GD1															
EM-53															
EM-54															
EM-56															
EM-60															
EM-65															
EM-70															
EM-71															
EM-85															
EM-86															
EM-88															
EM-89															
EM-90															
EM-91															
EM-92															
EM-93															
EM-94															
EM-95															
EM-97															
EM-98															
EM-99															
EM-101															
EM-103															
EM-104															
EM-109															
EM-119															
EM-128															
EM-136															
EM-184															
EM-186															
EM-195															
EM-198															
EM-200															
EM-205															
EM-207															
EM-214															
EM-216															
EM-218															
EM-221															
EM-223															
EM-229															
EM-231															
EM-232															
EM-233															
EM-09															
EM-25															
CS-49															
CS-50															
CS-53															
CS-56															
CS-58															
CS-61															
CS-62															
CS-64															
CS-66															
CS-73															
CS-82															
CS-83															
CS-85															
CS-90															
CS-93															
CS-95															
CS-97															
CS-108															
CS-128															
CS-187															
CS-158															
CS-190															
CS-197															
CS-205															
CS-207															
CS-209															
CS-218															
CS-231															
CS-232															
CS-233															

	CAT
	817
	▼
	Codificante
	760 770 780 790 800 810
NC007605.1 Ref	GCATGTGCCAGACCAATCAATGCACCCCTTACTCATCAAAGCACCCCAATGATCCAG
1.1 (B95-8)	A.....
1.2 A	A.....
1.2 B	A.....
1.3A	A.....
1.3B	A.....
KF717093.1 Raji	A.....
AY961628.3 GD1	A.....
EM-53	A.....
EM-54	A.....
EM-56	A.....
EM-60	A.....
EM-65	A.....
EM-70	A.....
EM-71	T.....
EM-85	T.....
EM-86	T.....
EM-88	T.....
EM-89	T.....
EM-90	T.....
EM-91	T.....
EM-92	T.....
EM-93	T.....
EM-94	T.....
EM-95	T.....
EM-97	T.....
EM-98	T.....
EM-99	T.....
EM-101	T.....
EM-103	T.....
EM-104	T.....
EM-109	T.....
EM-119	T.....
EM-128	T.....
EM-136	T.....
EM-184	T.....
EM-186	T.....
EM-195	T.....
EM-198	T.....
EM-200	T.....
EM-205	T.....
EM-207	T.....
EM-214	T.....
EM-216	T.....
EM-218	T.....
EM-221	T.....
EM-223	T.....
EM-229	T.....
EM-231	T.....
EM-232	T.....
EM-233	T.....
EM-09	T.....
EM-25	T.....
CS-49	T.....
CS-50	T.....
CS-53	T.....
CS-56	T.....
CS-58	T.....
CS-61	T.....
CS-62	T.....
CS-64	T.....
CS-66	T.....
CS-73	T.....
CS-82	T.....
CS-83	T.....
CS-85	T.....
CS-90	T.....
CS-93	T.....
CS-95	T.....
CS-97	T.....
CS-108	T.....
CS-128	T.....
CS-187	T.....
CS-158	T.....
CS-190	T.....
CS-197	T.....
CS-205	T.....
CS-207	T.....
CS-209	T.....
CS-218	T.....
CS-231	T.....
CS-232	T.....
CS-233	T.....

Anexo K

Alineamiento de aminoácidos de la región comprendida entre las posiciones 103 al 271 de la proteína viral EBNA2. Los cambios de aminoácidos son respecto a la línea de referencia B95.8. Además, se presentan las secuencias de los alelos previamente descritos (1.1, 1.2A, 1.2B, 1.3A y 1.3B), las líneas Raji y GD1 y pacientes (prefijo EM) y controles (prefijo CS).

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270
NC007605.1 Ref	D	N	T	P	S	P	L	R	D	P	L	D	V	G	S	P	L
1.1 (B95-8)	D	N	T	P	S	P	L	R	D	P	L	D	V	G	S	P	L
1.2 A																	
1.2 B																	
1.3A																	
1.3B																	
KF717093.1 Raji																	
AY961628.3 GD1																	
EM-53																	
EM-54																	
EM-56																	
EM-60																	
EM-65																	
EM-70																	
EM-71																	
EM-85																	
EM-86																	
EM-88																	
EM-89																	
EM-90																	
EM-91																	
EM-92																	
EM-93																	
EM-94																	
EM-95																	
EM-97																	
EM-98																	
EM-99																	
EM-101																	
EM-103																	
EM-104																	
EM-109																	
EM-119																	
EM-128																	
EM-136																	
EM-184																	
EM-186																	
EM-195																	
EM-198																	
EM-200																	
EM-205																	
EM-207																	
EM-214																	
EM-216																	
EM-218																	
EM-221																	
EM-223																	
EM-229																	
EM-231																	
EM-232																	
EM-233																	
EM-09																	
EM-25																	
CS-49																	
CS-50																	
CS-53																	
CS-56																	
CS-58																	
CS-61																	
CS-62																	
CS-64																	
CS-66																	
CS-73																	
CS-82																	
CS-83																	
CS-85																	
CS-90																	
CS-93																	
CS-95																	
CS-97																	
CS-108																	
CS-128																	
CS-187																	
CS-158																	
CS-190																	
CS-197																	
CS-205																	
CS-207																	
CS-209																	
CS-218																	
CS-231																	
CS-232																	
CS-233																	