

Evidencias existentes acerca de la posible implicación de los virus en la esclerosis múltiple

ROBERTO ÁLVAREZ-LAFUENTE

Servicio de Neurología. Hospital Clínico San Carlos.

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid.

RESUMEN. Clásicamente se ha considerado que la esclerosis múltiple es el resultado de la interacción de uno o varios factores ambientales, que actuarían en las primeras etapas de la vida (antes de la adolescencia) sobre personas predispuestas desde el punto de vista genético, generando una activación anómala del sistema inmunológico que a su vez reaccionaría contra componentes del sistema nervioso central produciendo inflamación de la mielina y degeneración axonal-neuronal, en un proceso que se mantendría a lo largo del tiempo. El presente estudio tiene como objetivo revisar las evidencias existentes hasta la actualidad que relacionan al virus del Epstein-Barr, al herpesvirus humano 6 y a los retrovirus endógenos humanos, con la etiopatogenia de la esclerosis múltiple.

Palabras clave: *esclerosis múltiple, virus del Epstein-Barr, herpesvirus humano 6, retrovirus endógenos humanos.*

ABSTRACT. Multiple sclerosis has been commonly considered the result of the interaction of one or more environmental factors, which would act in the early stages of life (before adolescence) on genetically predisposed subjects, generating abnormal activation of the immune system which would react against components of CNS producing myelin inflammation, neuronal and axonal degeneration, a process which would be maintained over time. The present study aims to review the existing evidence to date that relate Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6 and human endogenous retroviruses with the pathogenesis of multiple sclerosis.

Key words: *multiple sclerosis, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6, human endogenous retrovirus.*

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad de causa desconocida. Clásicamente se ha considerado que es el resultado de la interacción de uno o varios factores ambientales, que actuarían en las primeras etapas de la vida (antes de la adolescencia) sobre personas predispuestas desde el punto de vista genético, generando una activación anómala del sistema inmunológico que, a su vez, reaccionaría contra componentes del sistema nervioso central (SNC) produciendo inflamación de la mielina y degeneración axonal-neuronal, en un proceso que se mantendría a lo largo del tiempo¹⁻³. Entre los factores ambientales que históricamente se han relacionado con la enfermedad se encuentran numerosos agentes infecciosos, principalmente virus, que han sido implicados como posibles agentes causales de la EM (Tabla I). Pero de todos ellos, tres son los que principalmente acumulan a lo largo de los últimos años un número creciente de evidencias: dos miembros de la familia *Herpesviridae*, el virus del Epstein-Barr (EBV) y el herpesvirus humano 6 (HHV-6), y los retrovirus endógenos humanos.

Desde el punto de vista patogénico se han propuesto varias teorías con el fin de explicar cómo la infección / reactivación de uno o varios de estos virus podría contribuir en el desarrollo de la EM:

1) Hipótesis de "Hit and run": la EM sería consecuencia de una reacción autoinmune que habría iniciado una infección monofásica.

2) Hipótesis del mimetismo molecular por infección persistente: donde una infección periférica persistente genera una reacción inmune que actuaría contra el SNC. El mimetismo molecular aparece cuando hay reacción cruzada entre los epítopos propios del huésped y epítopos virales, posiblemente debido a secuencias homólogas de aminoácidos, lo que llevaría a la activación de células T autorreactivas. Cuando esto ocurre, el sistema inmune puede entonces reconocer los epítopos propios; subsecuentemente, se produciría una respuesta inmune dirigida contra el epítipo propio, incluso en ausencia del virus.

3) Hipótesis de la infección directa: la EM sería el resultado de la infección de las células de glía (ej: oligodendrocitos) que iniciaría la inflamación focal en SNC.

4) Hipótesis de la desregulación inmunológica: donde una infección generaría la alteración del sistema inmunológico generando una enfermedad autoinmune órgano-específica.

5) Hipótesis de la doble infección: la EM sería el resultado de la coinfección de, al menos, dos patógenos.

El presente estudio tiene como objetivo revisar las evidencias existentes hasta la actualidad que relacionan a los tres virus anteriormente mencionados con la EM, y cómo éstas se ajustan a las teorías plan-

teadas hasta el momento acerca de la posible implicación de los virus en la etiopatogenia de la EM.

□ Virus de Epstein-Barr (EBV)

El agente infeccioso que hasta el momento más ha demostrado su posible implicación en la patogenia de la enfermedad y sobre el que más estudios se han desarrollado y publicado en los últimos años ha sido el EBV. Se han publicado múltiples tipos de estudios, tanto de epidemiología descriptiva como analítica, así como estudios experimentales que parecen poner de manifiesto dicha posible asociación.

Una de las observaciones epidemiológicas que más pesan en el papel que jugaría el EBV en la etiopatogenia de la EM es lo extremadamente raro que es encontrar EM en sujetos que sean seronegativos a este virus; como puede observarse en la Tabla II⁴⁻²⁰, en los estudios caso-control realizados, la infección por EBV se encuentra prácticamente en todos los pacientes con EM (>99%), frente al 90% encontrado en los controles. En un estudio longitudinal de seguimiento realizado en una cohorte de adultos seronegativos, se observó que la EM solo ocurría después de la infección por EBV²¹.

Parece ser que el momento de la infección por

Tabla I Algunos virus que se han asociado con la etiopatogenia de la EM

Familia	Virus
Herpesviridae	- Herpes simplex virus (HSV). - Varicella zoster virus (VZV). - Epstein-Barr virus (EBV). - Hepesvirus Humano 6 (HHV-6). - Virus de la enfermedad de Marek (MDV).
Retroviridae	- Human T-cell lymphotropic virus tipo 1 (HTLV-1). - Retrovirus endógenos humanos (HERV-Fc1, HERV-K18, HERV-H, HERV-W).
Paramyxoviridae	- Sarampión. - Paperas. - Virus de la Parainfluenza tipo 1. - Virus del moquillo canino. - Virus de los simios tipo 5.
Anelloviridae	- Torque teno virus.
Coronaviridae	- Corona virus.
Papovaviridae	- JC virus.
Bornaviridae	- Virus de la enfermedad de Borna.

Tabla II Detección de IgG frente a EBV en pacientes de EM y controles

Año	Autores	Pacientes de EM			Controles			%	
		Pos.	Neg	%	Pos.	Neg	%		
1997	Munch et al. ⁴	137	/	1	99,3%	124	/	14	89,9%
1998	Myhr et al. ⁵	144	/	0	100,0%	162	/	8	95,3%
2000	Wagner et al. ⁶	107	/	0	100,0%	153	/	10	93,9%
2001	Ascherio et al. ⁷	143	/	1	99,3%	269	/	18	93,7%
2004	Haahr et al. ⁸	153	/	0	100,0%	50	/	3	94,3%
2004	Sundström et al. ⁹	234	/	0	100,0%	693	/	9	98,7%
2005	Ponsonby et al. ¹⁰	136	/	0	100,0%	252	/	9	96,6%
2006	DeLorenze et al. ¹¹	42	/	4	91,3%	79	/	8	90,8%
2007	Banwell et al. ^{12*}	78	/	96	81,3%	61	/	96	63,5%
2008	Lünemann et al. ^{13*}	21	/	2	91,3%	11	/	6	64,7%
2010	Ingram et al. ¹⁴	70	/	5	93,3%	18	/	7	72,0%
2010	Jafari et al. ¹⁵	108	/	6	94,7%	51	/	9	85,0%
2010	Lindsey et al. ¹⁶	78	/	2	97,5%	74	/	6	92,5%
2011	Waubant et al. ¹⁷	167	/	22	88,4%	36	/	30	54,5%
2011	Lucas et al. ¹⁸	199	/	7	96,6%	198	/	19	91,2%
2011	Villegas et al. ¹⁹	66	/	10	86,8%	62	/	13	82,7%
2012	Sundquist et al. ²⁰	580	/	5	99,1%	616	/	48	92,8%

*En pacientes y controles pediátricos

EBV jugaría también un papel fundamental, habiéndose observado un aumento del riesgo 2-3 veces superior en aquellos sujetos que se infectan en la adolescencia y se manifiesta como mononucleosis infecciosa frente a los que adquieren la infección en edades tempranas de la vida y no manifiestan síntomas²². Así, se ha demostrado un paralelismo, desde el punto de vista epidemiológico, entre la EM y la mononucleosis infecciosa: ambas afectan a adultos jóvenes, presentan un gradiente geográfico de distribución, afectan más a niveles socioeconómicos elevados, menos a pacientes de raza negra y asiáticos, siendo excepcional encontrarla en esquimales y ambas no afectan a aquellos sujetos que adquieren la infección por EBV en edades tempranas de la vida²².

Otro hecho a favor del posible nexo EBV-EM fue una pequeña epidemia de EM en un pueblo danés (Fjelso) donde se demostró que los 8 casos afectos de EM se produjeron directamente tras un brote infeccioso por EBV, demostrándose que todos ellos habían sido infectados por una misma cepa de EBV²³.

En las personas seropositivas a EBV, los títulos de anticuerpos permanecen estables a lo largo de su vida, generando una estimulación continua del sistema inmunológico. Habitualmente se determinan 2 tipos de anticuerpos, uno frente al antígeno de la cápside viral (VCA), un antígeno temprano, el cual es expresado en el ciclo lítico, y el otro es el antígeno nuclear (EBNA) expresado en las células infectadas de forma latente. EBNA es un complejo constituido por 6 proteínas distintas, una de las cuales (EBNA-1) es la primariamente reconocida en el complejo anti-EBNA. Habitualmente en estudios clínicos y de investigación se utilizan anticuerpos dirigidos contra EBNA 1 y 2. En aquellos pacientes que desarrollan mononucleosis infecciosa, al inicio se observan títulos elevados de IgM contra VCA con posterior elevación de títulos de IgG contra VCA que permanecerán de forma estable indefinidamente. La reactividad frente a EBNA 1 y 2 aparece en distintos momentos. La IgG frente a EBNA-2 aparece en la fase aguda de la enfermedad y decrece durante la convalecencia, mientras que la IgG frente a EBNA-1 se empiezan a detectar únicamente durante la convalecencia y permanecerá estable a lo largo de la vida. La IgG contra EBNA-1 y la IgG contra EBNA-2 tienen comportamientos contrarios durante la inmunosupresión; así, la IgG contra EBNA-2 se eleva mientras decrecen los títulos de IgG contra EBNA-1, generando una inversión del ratio de anticuerpos anti-EBNA1/anti-EBNA2 que en sujetos sanos es mayor de 1. Los títulos de anticuerpos frente a EBNA-1 son proporcionales al grado de infección del EBV por linfocitos citotóxicos y sería un fuerte marcador de la inmunidad celular del EBV. En otras enfermedades causa-

das por EBV, como linfoma Burkitt, carcinoma nasofaríngeo y en el linfoma de Hodgkin-relacionado con EBV, los títulos frente a EBV permanecen elevados varios años antes de desarrollar la enfermedad. En el linfoma Burkitt existe una elevación de los anti-VCA, pero no de los anti-EBNA, y la elevación de ambos se ha demostrado en carcinoma nasofaríngeo y en linfoma de Hodgkin²⁴. Como prueba de la posible implicación de EBV en la EM, se ha encontrado mayor tasa de Linfoma Hodgkin vinculado al EBV en pacientes con EM y en familiares directos de pacientes con EM que en la población general²³.

En la EM, se ha observado un incremento de los anticuerpos anti-EBV hasta 5 años antes de inicio de los síntomas. En concreto se ha demostrado un incremento de los anticuerpos anti-EBNA, y de estos, del anti-EBNA-1, lo que sugiere una más severa primoinfección o una reactivación de la infección acompañada por una vigorosa respuesta inmune celular²⁵. Se ha demostrado, además, la presencia de Linfocitos T anti-EBNA-1 mucho más frecuentemente en pacientes con EM que en sujetos sanos²⁶.

Otro hallazgo muy significativo es el cambio en la tasa de anticuerpos en relación con la edad. Cuando se miden los anticuerpos frente a EBV en personas antes de los 20 años, la media de anticuerpos es similar entre aquellos que más tarde desarrollarán EM y los que se mantendrán sanos. Mientras los títulos de IgG anti-EBNA permanecen estables a lo largo de la vida en los controles sanos, en los pacientes con EM se observa un incremento significativo entre los 20 y los 30 años que posteriormente se estabiliza. Esta diferencia entre individuos que desarrollarán EM e individuos sanos es importante. Un aumento de hasta 4 veces los títulos de IgG anti-EBNA, comparando una muestra realizada antes de los 20 años con otra muestra posterior, eleva el riesgo de desarrollar EM hasta 15 veces más. Además se ha visto una elevación de los títulos cuando comienzan los síntomas de la enfermedad. No se conoce las razones de este incremento de los anticuerpos edad-dependiente y se postula la posibilidad de una coinfección por otro germen que altere la respuesta inmune frente al EBV, o la coinfección por otra cepa de EBV diferente a la de la primoinfección. Por último se piensa que esta elevación de anticuerpos pudiera ser un marcador de reacción autoinmune que en algunos individuos desencadenaría la enfermedad²⁶.

Recientemente se ha visto que los títulos de IgG frente a EBNA-1 estarían selectivamente incrementados en pacientes con un síndrome clínico aislado (SCA), comparado con controles; además, se ha demostrado una relación entre los títulos de IgG anti-EBNA-1 con la carga lesional, con la diseminación espacial en resonancia magnética nuclear (RMN)

cerebral, con la diseminación temporal radiológica, así como con la progresión en la EDSS, sugiriendo que los títulos de IgG EBNA-1 puedan ser utilizados como marcador pronóstico para conversión a EM y como marcador pronóstico evolutivo de discapacidad²⁷. En otro estudio se ha visto, además, la existencia de replicación activa periférica de EBV durante los brotes de EM en comparación con pacientes con enfermedad estable²³.

Quizá el mayor obstáculo para aceptar el posible papel que el EBV jugaría en la etiopatogenia de la EM es la ausencia del virus en las lesiones patológicas de sujetos con la enfermedad. Recientemente, algunos estudios realizados por PCR a tiempo real en cerebros de pacientes con EM y en linfocitos B del LCR de pacientes descartaron la evidencia de infección activa por EBV²⁸. Los defensores de la importancia del EBV esgrimen la existencia de múltiples mecanismos por los que la infección por EBV puede incrementar el riesgo de EM sin necesidad de infectar directamente el SNC. La teoría más aceptada es que la infección por EBV en pacientes predispuestos genéticamente reacciona contra antígenos de la mielina. Esta respuesta incluiría linfocitos T y anticuerpos. Sería, por tanto, la teoría del mimetismo molecular. A favor estarían el hallazgo en los pacientes con EM de un mayor número de Linfocitos T CD4+ específicos reconocedores EBNA-1, y la identificación de 2 péptidos de EBV, para uno de los cuales EBNA-1 ha demostrado ser marcador de respuesta inmune en el LCR de pacientes con EM²⁹.

Además, recientemente se ha publicado un estudio³⁰ en el que se han identificado múltiples y significativas asociaciones entre los niveles de IgG anti-EBNA-1 con distintos factores genéticos localizados en la región HLA, que contiene genes relacionados con la función inmune en humanos; estas asociaciones no fueron encontradas en relación con la seroreactividad de otros doce patógenos analizados en este estudio, con lo cual los autores concluyen que dicha asociación parece ser específica de EBNA-1. También se ha descrito que la mayor expresión de interferón alfa localizada en áreas activas de las lesiones de EM, y que se asocia con el proceso inflamatorio agudo, estaría relacionada con la detección de ARN codificado por EBV (EBER); estos hallazgos sugerirían que la infección latente por EBV podría contribuir al estado inflamatorio en las lesiones activas de EM a través de la activación de la respuesta inmune innata, aumentando, por ejemplo, la producción de interferón alfa³¹.

En relación al comportamiento de EBV con los tratamientos existentes para la EM, se ha descrito que una terapia clínicamente efectiva con interferón beta se asocia con una disminución de la respuesta

proliferativa de las células T frente al antígeno nuclear 1 de EBV, EBNA-1; en cambio, la respuesta IgG específica de EBNA-1, así como la respuesta inmune humoral de clase I restringida a antígenos de EBV expresada durante la replicación lítica y la transformación viral de células B, fueron similares antes y después del tratamiento con interferón beta³².

También se ha descrito una asociación entre los niveles elevados de IgG frente a EBNA-1 y bajos niveles de vitamina D, otro posible factor ambiental relacionado con la etiopatogenia de la EM al comienzo de la enfermedad³³.

Otras teorías propuestas incluyen la activación de superantígenos, una clase de antígenos que pueden activar poblaciones de Linfocitos T inespecíficos, un incremento de la expresión de alpha-beta-crystallina³⁴, que es una proteína de estrés que ha demostrado ser marcador de la inmunidad de linfocitos T CD4+ en EM, o la infección y activación crónica de linfocitos B autorreactivos.

Debido a la heterogeneidad encontrada en la patología de la EM, no se descarta que puedan estar implicados distintos mecanismos. La observación de que la EM ocurre años después de la mononucleosis infecciosa hace pensar que el EBV actuaría como un factor iniciador del proceso patológico, pero que una serie de eventos serían necesarios para comenzar las manifestaciones clínicas de la enfermedad²¹. No obstante a pesar de los múltiples estudios, sigue sin poder concretarse si la infección por EBV es causa o es realmente un epifenómeno necesario para el inicio de la enfermedad. Su asociación con otras enfermedades autoinmunes, además de EM, sugiere que puede ser un iniciador no específico de la cascada autoinmune.

□ Herpesvirus humano 6 (HHV-6)

El HHV-6 es un beta herpesvirus que fue descubierto en 1986 a partir de pacientes inmunocomprometidos por HIV y con desórdenes linfoproliferativos³⁵⁻³⁶. HHV-6 es un virus ubicuo, con una seroprevalencia estimada superior al 95% en la población general³⁵. Hay dos subtipos de este virus, el HHV-6A y el HHV-6B; éste último es adquirido en los primeros años de vida (la infección habitualmente sucede antes de los 2-3 años de edad). Esta infección primaria puede ser asintomática o manifestarse a través del exantema súbito, también conocido como *roseola infantum*. Después, el virus se vuelve latente, encontrándose generalmente en células mononucleares de sangre periférica. Sin embargo, se sabe menos acerca de la adquisición y la seroprevalencia del HHV-6A, en parte debido a la falta de ensayos serológicos adecuados para su detección³⁷, si bien se ha visto que

esta variante es más neurotrópica, dado que se detecta más comúnmente en el líquido cefalorraquídeo que en células sanguíneas³⁸.

Se sabe que el HHV-6 infecta una gran variedad de células, tanto *in vivo* como *in vitro*, incluyendo tejido cerebral *in vivo* y células gliales *in vitro*. El HHV-6 se reactiva en estados inmunocomprometidos, como por ejemplo tras un trasplante de médula ósea, y puede dar lugar a una infección oportunista, que en algunas ocasiones puede ocasionar encefalitis³⁵. El HHV-6 también ha sido implicado en una gran variedad de desórdenes neurológicos, incluyendo epilepsia del lóbulo temporal, encefalitis en pacientes inmunocompetentes, síndrome de fatiga crónica y EM³⁹.

El HHV-6 fue implicado por primera vez en la EM al comienzo de los años noventa. En 1993, Sola y cols.⁴⁰ encontraron que los títulos de anticuerpos frente a HHV-6, medidos por inmunofluorescencia, estaban significativamente elevados en el suero de los pacientes con EM en comparación con los controles; los autores pensaron que los títulos más elevados vistos entre los pacientes con EM estarían probablemente más relacionados con un deterioro del sistema inmune que con la reactivación del virus. Poco después, Challoner y cols.⁴¹ utilizaron una novedosa técnica denominada análisis de representación diferencial (RDA) en muestras de tejido cerebral de pacientes con EM y controles para proporcionar una de las primeras evidencias directas de la implicación del HHV-6 en la patogenia de la EM. También se realizó la aplicación de una técnica de inmunocitoquímica dirigida contra proteínas del HHV-6; esta técnica reveló la expresión de proteínas en el cerebro de los pacientes con EM, pero no en controles. Además, la expresión se localizó precisamente en los oligodendrocitos, sugiriendo así una posible asociación entre la EM y el HHV-6. Desde este trabajo de Challoner y cols.⁴¹, se han publicado multitud de estudios tratando de abordar la posible implicación del HHV-6 en la etiopatogenia de la EM. Las aproximaciones realizadas han sido muy variadas, e incluyen:

Estudio de la presencia del HHV-6 en muestras de tejido cerebral de pacientes con EM

En el año 2000, Blumberg y cols.⁴² utilizaron una PCR *in situ* en dos pasos altamente sensible para analizar la presencia de ADN de HHV-6 en muestras de tejido cerebral embebidos en parafina que se habían recogido en pacientes con EM; se encontró una alta expresión de dos genes de HHV-6, p41 y p101, en la materia blanca de los pacientes con EM, particularmente en oligodendrocitos y neuronas. En el año 2003, Cermelli y cols.⁴³ exploraron por PCR la frecuencia de ADN de HHV-6 en placas de desmie-

linización de pacientes con EM frente a la frecuencia en materia blanca aparentemente normal de pacientes y controles a través de la microdissección por láser. En este estudio, se encontró que el ADN de HHV-6 era significativamente más frecuente en placas de EM en comparación con la sustancia blanca de apariencia normal de pacientes y controles. Godman y cols.⁴⁴ investigaron la presencia de ADN de HHV-6 por PCR *in situ* en lesiones de EM. En todas las muestras, se encontró que numerosos oligodendrocitos, linfocitos y microglía eran positivos para ADN de HHV-6. Puesto que ninguno de los pacientes de los que procedían las muestras de biopsias habían sido previamente tratados, se descartó una posible reactivación debido a las terapias inmunosupresoras / inmunomoduladoras asociadas con la EM. Otro estudio realizado posteriormente por Opsahl y Kennedy,⁴⁵ utilizó la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) para estudiar la expresión de genes virales tardíos y tempranos tanto en lesiones como en sustancia blanca de apariencia normal procedentes de tejidos cerebrales de pacientes con EM, así como de tejidos cerebrales normales. Se encontró que tanto el tejido lesionado como el de apariencia normal en los pacientes con EM tenía niveles significativamente elevados de expresión de HHV-6 en comparación con el tejido normal. Sin embargo, mientras que el tejido lesionado expresaba los niveles más elevados, el tejido de apariencia normal de los pacientes con EM mostraba unos niveles intermedios de HHV-6. Además, se encontró una traducción activa de ARN mensajero de HHV-6 en oligodendrocitos de tejido cerebral de pacientes con EM. Por el contrario, otros estudios han mostrado una falta de transcritos virales en tejidos cerebrales para otros virus de la familia *Herpesviridae*, tales como EBV, HHV-7 y HHV-8, reforzando los hallazgos realizados para HHV-6⁴⁶⁻⁴⁷.

Estudio de la presencia de HHV-6 fuera del sistema nervioso central

Akhyani y cols.⁴⁸ investigaron la presencia de ADN de HHV-6 en saliva, orina, suero y células mononucleares de sangre periférica en una cohorte de pacientes con EM y en controles sanos. El ADN de HHV-6 fue encontrado en saliva y sangre en los dos grupos; sin embargo, fue encontrado en el suero y la orina del 23% de los pacientes con EM y en ninguno de los controles. El análisis de los subtipos presentes en los productos de PCR revelaron un predominio de la variante A en las muestras de los pacientes con EM. Un estudio realizado por Alvarez-Lafuente y cols.⁴⁹ mostró resultados similares, ya que el ADN de HHV-6 fue encontrado en el suero del 14,6% de los pacientes con EM y en ninguno de los controles

sanos. Mientras que el HHV-6B fue comúnmente encontrado en sangre, tanto en controles como en pacientes con EM (30,4% y 53,4%, respectivamente), la variante A fue vista más a menudo en sangre de pacientes con EM (20,4%) que en controles (4,4%). Además, el ADN de HHV-6 encontrado en el suero de los pacientes con EM, pero no en controles, fue predominantemente de la variante A. El HHV-6 es un virus que típicamente está asociado a las células, y para el que la excreción de partículas virales sólo ocurre durante la fase de replicación viral activa³⁹. Así, el hecho de que el ADN de HHV-6 sea encontrado en compartimentos extracelulares, tales como el suero y la orina, en pacientes con EM en los dos estudios anteriormente mencionados, es indicativo de que la replicación viral activa del HHV-6 ocurre de forma común en los pacientes con EM. De forma similar, Berti y cols.⁵⁰ diseñaron un estudio longitudinal con una cohorte de seguimiento de 59 pacientes con EM durante 5 meses; se recogieron múltiples muestras de suero a lo largo de varios puntos del estudio y se analizó la presencia de ADN de HHV-6 por PCR. Mientras que el ADN de HHV-6 era detectado en los pacientes durante los brotes y en los estados de remisión, se detectó significativamente más a menudo durante los brotes clínicos, sugiriendo una posible asociación entre la replicación activa del HHV-6 y los brotes en los pacientes con EM.

Estudios de la presencia del HHV-6 en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)

Numerosos estudios han investigado también la presencia de ADN de HHV-6 en muestras de LCR de pacientes con EM en comparación con controles. Los resultados varían mucho, si bien múltiples estudios han mostrado un incremento en la detección de ADN de HHV-6 en pacientes con EM en comparación con los controles⁵¹⁻⁵⁵.

Estudios serológicos

Soldan y cols.⁵⁶ encontraron una mayor respuesta IgM frente a antígenos tempranos del HHV-6 (p41/p38) en pacientes con EM recurrente remitente que en pacientes con EM crónica progresiva, otras enfermedades neurológicas, otras enfermedades autoinmunes y en controles sanos, indicando que una exposición reciente a HHV-6, o su reactivación, podría estar asociada con la enfermedad. En un estudio posterior⁵⁷, se encontraron que los niveles de anticuerpos IgG e IgM frente a HHV-6 estaban más elevados en los pacientes con EM temprana (particularmente EM recurrente remitente temprana y síndromes clínicamente aislados) en comparación con pacientes con EM secundaria progresiva y controles sanos, indicando un papel potencial para el HHV-6

como posible iniciador de la enfermedad. Otros estudios han confirmado los títulos de anticuerpos frente a HHV-6 elevados en pacientes con EM^{52, 53, 58-62}.

Estudios del efecto del tratamiento con interferón beta

Otra evidencia que relaciona al HHV-6 con la EM, es el efecto que se ha descrito del interferón beta sobre el HHV-6. En un estudio realizado por Hong y cols.⁶³, se midieron los niveles de anticuerpos IgG e IgM frente a HHV-6 y el ADN de HHV-6 en muestras de suero de pacientes con EM tratados con interferón beta, en pacientes no tratados y en controles sanos. Los hallazgos de este estudio sugieren que el tratamiento con interferón beta disminuye significativamente la replicación del HHV-6, encontrándose una disminución del ADN de HHV-6 en suero en el grupo de pacientes tratados con interferón beta. Otro estudio realizado recientemente⁶⁴, muestra una disminución de la prevalencia de ADN del HHV-6 en suero de pacientes con EM después del tratamiento con interferón beta. Sin embargo, se encontró también en este estudio que los pacientes con EM y presencia continua de ADN de HHV-6 tenían un peor pronóstico, con brotes más frecuentes y severos, que los pacientes en los que no se encontraba ADN de HHV-6.

Estudios de respuesta linfoproliferativa

Soldan y cols.⁶⁵ encontraron que la respuesta linfoproliferativa frente a HHV-6A estaba incrementada en los pacientes con EM en comparación con los controles. En este estudio, las respuestas linfoproliferativas frente a lisados celulares infectados por HHV-6A, HHV-6B y HHV-7 fueron comparados en pacientes con EM y controles. Mientras que ambos grupos mostraron linfoproliferación en respuesta a los lisados de HHV-6B, el grupo de pacientes de EM mostró un incremento significativo en la respuesta a lisados de HHV-6A en comparación con los controles: 67% en los pacientes con EM frente al 33% en los controles.

Estudios de mimetismo molecular

Se ha sugerido que el mimetismo molecular podría ser un posible mecanismo a través del cual el HHV-6 podría estar relacionado con la EM. Así, se ha visto que el gen U24 del HHV-6 comparte homología de secuencia (residuos 4-10) con la proteína básica de la mielina (residuos 96-102). En un estudio de Tejada-Simon y cols.⁶⁶ se mostró que un porcentaje significativo de células T que reconocían MBP93-105 presentaban reacción cruzada con un péptido sintético correspondiente a HHV-6 U244-10 en pacientes con EM. También se encontró que las células T con especificidad para ambos péptidos

estaban significativamente incrementadas en los pacientes con EM en comparación con los controles. Estos hallazgos sugerirían que el HHV-6 podría ser un causante potencial de mimetismo molecular como iniciador del proceso autoinmune en la EM.

Estudios que relacionan la posible asociación de la infección por HHV-6 y la evolución clínica de los pacientes con EM

Knox y cols.⁶⁷ encontraron que los pacientes con EM que estaban sufriendo una infección activa por HHV-6 eran significativamente más jóvenes y tenían una duración más corta de la enfermedad que los pacientes con EM que eran negativos a la presencia de HHV-6. Chapenko y cols.⁶⁸ encontraron tan sólo infección activa por HHV-6 entre los pacientes con EM que estaban en brote, incluyendo la presencia de lesiones que realzan gadolinio por RMN, pero no entre los pacientes que estaban en remisión. Tomson y cols.⁶⁹ hallaron únicamente presencia de HHV-6 en pacientes con EM, predominantemente en aquellos que se encontraban en fase activa.

Estudios de interacciones entre la presencia de infección activa por HHV-6 y ciertos genes en pacientes con EM

Martínez y cols.⁷⁰ encontraron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0001$) entre los pacientes de EM con infección activa por HHV-6 y que eran portadores del alelo minoritario C (rs4,774G/C) del gen MHCIIA, que codifica para un factor de transcripción utilizado como diana en las estrategias inmunoevasivas de algunos herpesvirus, y los pacientes portadores de este mismo alelo que nunca habían sufrido una infección activa por el virus; estos estudios han sido posteriormente replicados⁷¹⁻⁷².

Sin embargo, aunque, tal y como podemos observar en la Tabla III^{48, 51, 54, 56, 60-64, 70, 73-82}, la infección por HHV-6 o su reactivación parece ser un fenómeno más frecuente entre los pacientes con EM que en la población control, no se ha descrito todavía ninguna correlación definitiva entre la infección por HHV-6 y la etiopatogenia de la EM, y serán necesarios nuevos estudios para concretar si los datos observados hasta el momento implican la participación activa de este virus en la enfermedad o se trata de un simple epifenómeno.

□ Retrovirus endógenos humanos (HERVs)

La reciente publicación del genoma humano ha revelado que hasta un 8% del mismo está compuesto por HERVs. Evolutivamente se considera que entraron en nuestro genoma hace millones de años a través de la infección de la línea germinal por anti-

guos retrovirus exógenos. Representan, por tanto, las huellas de infecciones retrovirales previas que a lo largo del tiempo se han transmitido verticalmente a través de la línea germinal y así han sido heredados por las sucesivas generaciones de forma mendeliana, participando en procesos de especiación, recombinación, ontogénesis, y regulación de la especificidad de tejidos y expresión génica. Con el tiempo, los HERVs han sido sometidos a amplificaciones repetidas y eventos de transposición, dando lugar a copias sencillas y múltiples de provirus que están distribuidos en el ADN de todas las células.

El estudio de los HERVs en relación con la EM comenzó en 1989 cuando Perron y cols. descubrieron partículas retrovirales en cultivos de células leptomeníngeas en pacientes con EM⁸³; estas partículas retrovirales fueron denominadas originalmente MSRv (multiple sclerosis associated retrovirus), aunque actualmente se integran en la familia HERV-W. Tras ese primer descubrimiento, se han realizado numerosos estudios en los que se ha visto que los pacientes que no presentaban HERV-W en el LCR tenían un curso de la enfermedad estable, mientras que aquellos positivos a este virus en el LCR tenían un curso más severo y requerían tratamiento⁸⁴. También se ha visto que el HERV-W es capaz de provocar una neuropatología mediada por células T *in vivo*⁸⁵. Antony y cols. demostraron que la sincitina, una proteína codificada por HERV-W, presenta niveles de expresión significativamente más altos en los cerebros de pacientes de EM que en controles y además tiene efectos neuropatogénicos, pudiendo inducir muerte de oligodendrocitos⁸⁶; resultados similares han sido encontrados recientemente por otros autores⁸⁷. También se ha visto que HERV-W codifica para una proteína env que activa una cascada autoinmune y pro-inflamatoria a través de la interacción con el Toll-like receptor 4 de las células inmunes⁸⁸. Recientemente, se ha descrito que el antígeno env, una proteína que forma parte de la envoltura de HERV-W, se ha detectado en el suero del 73% de los pacientes con EM, mientras que no se ha detectado en otros pacientes con infecciones crónicas, lupus, otras enfermedades neurológicas y controles sanos; la expresión de HERV-W, medida a través de la cuantificación del ARN codificante para env, y el número de copias de ADN de HERV-W, estaban también significativamente elevados en pacientes con EM, en comparación con los controles sanos⁸⁹. Estos últimos resultados han sido confirmados posteriormente en otro estudio, en el que se describe un aumento de la carga proviral de HERV-W, es decir, del número de copias de HERV-W repartidos por el genoma, en los pacientes con EM en comparación con los controles sanos; además, se describe que esta carga proviral es

Tabla III Detección de HHV-6 por PCR en suero de pacientes con EM y controles

Año	Autores	Pacientes de EM			Controles				
		Pos.	Casos	%	Pos.	Casos	%		
1994	Wilborn et al. ⁵¹	0	/	21	0,0%	0	/	16	0,0%
1997	Martin et al. ⁷³	0	/	20	0,0%	0	/	20	0,0%
1997	Soldan et al. ⁵⁶	15	/	50	30,0%	0	/	47	0,0%
1998	Fillet et al. ⁵⁴	2	/	32	6,3%	1	/	34	2,9%
1999	Goldberg et al. ⁷⁴	1	/	24	4,2%	0	/	30	0,0%
1999	Mirandola et al. ⁷⁵	0	/	32	0,0%	0	/	12	0,0%
2000	Akhyani et al. ⁴⁸	8	/	34	23,5%	0	/	19	0,0%
2001	Tomsone et al. ⁶⁰	14	/	38	36,8%	0	/	43	0,0%
2002	Tejada-Simon et al. ⁶³	22	/	33	66,7%	7	/	21	33,3%
2003	Al-Shammari et al. ⁷⁶	0	/	24	0,0%	1	/	33	3,0%
2004	Alvarez-Lafuente et al. ⁷⁷	17	/	105	16,2%	0	/	49	0,0%
2005	Fögdell-Hahn et al. ⁷⁸	4	/	42	9,5%	0	/	123	0,0%
2006	Alvarez-Lafuente et al. ⁷⁹	16	/	63	25,4%	0	/	63	0,0%
2007	Martinez et al. ⁷⁰	22	/	99	22,2%	-	/	-	-
2008	Kuusisto et al. ⁶¹	0	/	34	0,0%	-	/	-	-
2009	Ahram M, et al. ⁸⁰	8	/	30	26,7%	8	/	33	24,2%
2009	Franciotta D et al. ⁸¹	0	/	54	0,0%	0	/	25	0,0%
2011	Nora-Krukke et al. ⁸²	8	/	17	32,0%	-	/	-	-
2011	Garcia-Montojo et al. ⁶⁴	18	/	35	33,9%	-	/	-	-
2013	Ben Fredj et al. ⁶²	4	/	56	6,7%	2	/	61	3,2%

más elevada entre las mujeres que entre los hombres, tanto entre los pacientes con EM como en los controles sanos, sugiriendo los autores que tal vez estas diferencias descritas podrían ayudar a explicar la diferente prevalencia de la enfermedad entre hombres y mujeres⁹⁰.

En los últimos años, otros HERVs han sido asociados también con la etiopatogenia de la EM:

HERV-H

Fue asociado por primera vez con la EM en el año 2000 por Christensen y cols.⁹¹, en un estudio en el que trataron de caracterizar partículas retrovirales obtenidas a partir de líneas de células B linfoblastoides; los autores encontraron presencia de HERV-H en un grupo de pacientes con EM, pero no en controles sanos. Estudios posteriores han confirmado la presencia de antígenos de HERV-H, en concreto de la proteína env de este retrovirus, en la superficie de células B y monocitos de pacientes con EM en brote, sugiriendo que la expresión de estas proteínas podría estar asociada con la fase activa de la enfermedad⁹². Recientemente también se ha publicado la disminución significativa de la serorreactividad frente a los antígenos de la envuelta de HERV-H en relación con la eficacia del tratamiento con interferón beta en pacientes con EM⁹³.

HERV-K18

La posible implicación de este retrovirus en la EM fue propuesta por primera vez en 2008 por Tai y cols.⁹⁴, y se basaba en que la proteína env de HERV-K18 es un superantígeno asociado a EBV; los autores encontraron una asociación entre la distinta distribución de los genotipos de HERV-K18, en concreto del haplotipo K18.3, y el riesgo a padecer EM, sugiriendo que estas variaciones podrían estar influenciando la susceptibilidad genética a padecer EM. Recientemente se ha publicado un estudio en el que se realiza un metanálisis con más cinco mil pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes y más de cuatro mil controles, en el que se confirma la asociación del haplotipo K18.3 presente en el cromosoma 1 con la susceptibilidad a padecer diferentes enfermedades autoinmunes⁹⁵.

HERV-Fc1

Ha sido el último de los HERVs asociados con la EM. En el año 2011, Nexø y cols.⁹⁶ describieron que la presencia de una serie de SNPs alrededor del locus retroviral de HERV-Fc1 mostraban una asociación altamente significativa con la enfermedad, sugiriendo su papel en la etiología de la EM como parte de la susceptibilidad genética a padecer esta enfermedad. Estudios posteriores han confirmado esta asociación

genética entre HERV-Fc1 y la EM⁹⁷. Por último, se ha descrito que los niveles de ARN extracelular de HERV-Fc1 estaban cuatro veces más elevados en pacientes con EM activa que en controles sanos, sugiriéndose su posible implicación en los procesos autoinmunes que desencadenarían la EM⁹⁸.

Uno de los aspectos más interesantes de la posible implicación de los HERVs en la etiopatogenia de la EM es que uno de los mecanismos propuestos a través del cual los herpesvirus humanos podrían desencadenar la enfermedad, sería por medio de una compleja interacción con los HERVs, de forma que serían capaces de reactivar la expresión e incluso la replicación de secuencias génicas de origen retroviral, principalmente en macrófagos y glía, lo que supondría un importante nexo de unión para gran parte de los resultados obtenidos en los estudios realizados a lo largo de los últimos años⁹⁹. Así, se ha visto que los “long terminal repeats” (LTRs), que constituyen el promotor de la expresión génica de los retrovirus, podrían ser activados por factores virales; el hecho de que, como se ha expuesto más arriba, los HERVs se reactiven más en pacientes con EM que en controles puede ser debido a que existan diferencias en la secuencia génica de los LTR de dichos pacientes que faciliten su transactivación por los factores virales. En un estudio en el que se trató de aproximar a lo que sucedería *in vivo*, en donde los herpesvirus son muy prevalentes y los HERVs son ubicuos en el genoma, se estimularon células mononucleares de sangre periférica tanto de pacientes como de controles con viriones/péptidos de HERV-W solamente, y no se encontraron diferencias entre ambos grupos en cuanto a la proliferación celular; sin embargo, cuando se combinaron antígenos de HERV-W con antígenos de herpesvirus se incrementó la respuesta celular inmune tanto de pacientes como de controles¹⁰⁰. Resultados similares han sido encontrados por otros autores; Brudek y cols.¹⁰¹ demuestran que la presencia de antígenos de herpesvirus, y no su replicación activa, es suficiente para activar la expresión de los HERVs en células procedentes de pacientes con EM y controles, si bien sólo en las células de pacientes

de EM la respuesta parece mantenerse en el tiempo; Tai y cols.¹⁰² encontraron que el HHV-6, tanto en su forma latente como durante la infección activa, es capaz de transactivar HERV-K18, otro retrovirus endógeno asociado con la EM. Recientemente, se ha publicado un trabajo en el que se observa que EBV es capaz de activar, *in vitro*, HERV-W/MSRV/sincitina-1 en células que derivan de sangre y cerebro; los autores plantean un modelo en el que se incluiría una infección inicial por EBV como desencadenante de la futura EM años después, y una progresiva activación de HERV-W/MSRV/sincitina-1 que actuaría como principal componente de la patogenicidad de la EM, en claro paralelismo con el comportamiento descrito para el inicio de la enfermedad¹⁰³.

Conclusiones

Aunque hasta el momento no existen evidencias definitivas que relacionen de forma inequívoca ninguno de los virus mencionados con la patogenia de la EM, los resultados acumulados en los últimos años parecen apoyar la posible implicación de uno o más de estos agentes infecciosos en la EM. No conviene olvidar que, del mismo modo que es aceptado por todos que ésta es una enfermedad poligénica, en la que distintos genes contribuirían a la susceptibilidad de la enfermedad, es posible que también se trate de una enfermedad “polivírica” en la que más de uno de estos agentes infecciosos contribuya o interaccione con los otros para desencadenar el proceso autoinmune que da lugar a la EM. Por tanto, los futuros estudios producirán resultados más válidos únicamente si se aplica el máximo rigor científico al diseño experimental: estudios prospectivos, en los que se tenga mucho cuidado no sólo con la elección de los grupos controles y de las técnicas a utilizar, sino de los virus a estudiar, ya que para examinar la posible interacción entre EM e infección, deberían de estudiarse siempre más de uno de los virus potencialmente relacionados con la enfermedad y algún virus no asociado con la misma, con el fin de valorar adecuadamente su posible implicación en la etiología de la EM.

REFERENCES

- 1.- The evolving concept of multiple sclerosis. Section One. The story of multiple sclerosis. En: Compston A, Confavreux C, Lassmann H, Mc Donald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Wekerle H, editors. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 4th ed. Londres. Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p 1-13.
- 2.- The environmental factor in multiple sclerosis. Section 2. The cause and course of multiple sclerosis. En: Compston A, Confavreux C, Lassmann H, Mc Donald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Wekerle H, editors. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 4th ed. Londres. Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p -105-111.
- 3.- The genetics of multiple sclerosis. Section 2. The cause and course of multiple sclerosis. En: Compston A, Confavreux C, Lassmann H, Mc Donald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Wekerle H, editors. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 4th ed. Londres. Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p -113-180.

- 4.- Munch M, Hvas J, Christensen T, Møller-Larsen A, Haahr S. The implications of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis—a review. *Acta Neurol Scand Suppl* 1997;169:59-64.
- 5.- Myhr KM, Riise T, Barrett-Connor E, Myrmed H, Vedeler C, Grønning M, et al. Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:539-42.
- 6.- Wagner HJ, Hennig H, Jabs WJ, Siekhaus A, Wessel K, Wandinger KP. Altered prevalence and reactivity of anti-Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Viral Immunol* 2000;13:497-502.
- 7.- Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 2001;286:3083-8.
- 8.- Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Höllsberg P. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2004;109:270-5.
- 9.- Sundström P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nyström L, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004;62:2277-82.
- 10.- Ponsonby AL, van der Mei I, Dwyer T, Blizzard L, Taylor B, Kemp A, et al. Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2005;293:463-9.
- 11.- DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelmann JH, Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol* 2006;63:839-44.
- 12.- Banwell B, Krupp L, Kennedy J, Tellier R, Tenenbaum S, Ness J, et al. Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 2007;6:773-81.
- 13.- Lünemann JD, Huppke P, Roberts S, Brück W, Gärtner J, Münz C. Broadened and elevated humoral immune response to EBNA1 in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* 2008;71:1033-5.
- 14.- Ingram G, Bugert JJ, Loveless S, Robertson NP. Anti-EBNA-1 IgG is not a reliable marker of multiple sclerosis clinical disease activity. *Eur J Neurol* 2010;17:1386-9.
- 15.- Jafari N, van Nierop GP, Verjans GM, Osterhaus AD, Middeldorp JM, Hintzen RQ. No evidence for intrathecal IgG synthesis to Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 in multiple sclerosis. *J Clin Virol* 2010;49:26-31.
- 16.- Lindsey JW, Hatfield LM, Vu T. Epstein-Barr virus neutralizing and early antigen antibodies in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2010;17:1263-9.
- 17.- Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, et al. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology* 2011;76: 1989-95.
- 18.- Lucas RM, Ponsonby AL, Dear K, Valery P, Pender MP, Burrows JM, et al. Current and past Epstein-Barr virus infection in risk of initial CNS demyelination. *Neurology* 2011;77:371-9.
- 19.- Villegas E, Santiago O, Carrillo JA, Sorlozano A, Guerrero M, Fernández O, et al. Low intrathecal immune response of anti-EBNA-1 antibodies and EBV DNA from multiple sclerosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:85-90.
- 20.- Sundqvist E, Sundström P, Linden M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: Interaction with HLA. *Genes Immun* 2012;13:14-20.
- 21.- Ascherio A. EBV and brain matter(s)? *Neurology* 2010;74:1092-5.
- 22.- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* 2010;5:e12496.
- 23.- Giovannoni G. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr Opin Neurol* 2007;20:261-8.
- 24.- Ascherio A. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007;61:288-99.
- 25.- Lünemann JD, Tintoré M, Messmer B, Strowig T, Rovira A, Perkal H, et al. Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010;67:159-69.
- 26.- Jilek S, Schlupe M, Meylan P, Vingerhoets F, Guignard L, Monney A, et al. Strong EBV-specific CD8+ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. *Brain* 2008;131:1712-21.
- 27.- Ascherio A. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Non infectious factors. *Ann Neurol* 2007;61:504-13.
- 28.- Sargsyan SA. Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74:1127-35.
- 29.- Gabibov AG, Belogurov AA Jr, Lomakin YA, Zakharova MY, Avakyan ME, Dubrovskaya VV, et al. Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen. *FASEB J* 2011;25:4211-21.
- 30.- Rubicz R, Yolken R, Drigalenko E, Carless MA, Dyer TD, Bauman L, et al. A genome-wide integrative genomic study localizes genetic factors influencing antibodies against Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1). *PLoS Genet* 2013;9:e1003147.
- 31.- Tzartos JS, Khan G, Vossenkamper A, Cruz-Sadaba M, Lonardi S, Sefia E, et al. Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions. *Neurology* 2012;78:15-23.

- 32.- Comabella M, Kakalacheva K, Río J, Münz C, Montalban X, Lünemann JD. EBV-specific immune responses in patients with multiple sclerosis responding to IFN β therapy. *Mult Scler* 2012;18:605-9.
- 33.- Décard BF, von Ahsen N, Grunwald T, Streit F, Stroet A, Niggemeier P, et al. Low vitamin D and elevated immunoreactivity against Epstein-Barr virus before first clinical manifestation of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:1170-3.
- 34.- van Sechel AC, Bajramovic JJ, van Stipdonk MJ, Persoon-Deen C, Geutskens SB, van Noort JM. EBV-induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Immunol* 1999;162:129-35.
- 35.- De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:217-45.
- 36.- Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986;234:596-601.
- 37.- Virtanen JO, Jacobson S. Viruses and multiple sclerosis. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* 2012;11:1-17.
- 38.- Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Long C, Epstein LG, Insel RA, et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 1998;26:132-7.
- 39.- Yao K, Crawford JR, Komaroff AL, Ablashi DV, Jacobson S. Review part 2: Human herpesvirus-6 in central nervous system diseases. *J Med Virol* 2010;82:1669-78.
- 40.- Sola P, Merelli E, Marasca R, Poggi M, Luppi M, Montorsi M, et al. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56:917-9.
- 41.- Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7440-4.
- 42.- Blumberg BM, Mock DJ, Powers JM, Ito M, Assouline JG, Baker JV, et al. The HHV6 paradox: ubiquitous commensal or insidious pathogen? A two-step in situ PCR approach. *J Clin Virol* 2000;16:159-78.
- 43.- Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'ambrosia JM, Ludwin SK, et al. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis* 2003;187:1377-87.
- 44.- Goodman AD, Mock DJ, Powers JM, Baker JV, Blumberg BM. Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J Infect Dis* 2003;187:1365-76.
- 45.- Opsahl ML, Kennedy PG. Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain* 2005;128:516-27.
- 46.- Opsahl ML, Kennedy PG. Investigating the presence of human herpesvirus 7 and 8 in multiple sclerosis and normal control brain tissue. *J Neurol Sci* 2006;240:37-44.
- 47.- Opsahl ML, Kennedy PG. An attempt to investigate the presence of Epstein Barr virus in multiple sclerosis and normal control brain tissue. *J Neurol*. 2007;254:425-30.
- 48.- Akhyani N, Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Eaton JM, McFarland HF, et al. Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV)-6: increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis. *J Infect Dis* 2000;182:1321-5.
- 49.- Alvarez-Lafuente R, Martín-Estefanía C, de Las Heras V, Castrillo C, Picazo JJ, Varela de Seijas E, et al. Active human herpesvirus 6 infection in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2002;59:929-33.
- 50.- Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, McFarland HF, et al. Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol* 2002;8:250-6.
- 51.- Wilborn F, Schmidt CA, Brinkmann V, Jendroska K, Oettle H, Siegert W. A potential role for human herpesvirus type 6 in nervous system disease. *J Neuroimmunol* 1994;49:213-4.
- 52.- Liedtke W, Malessa R, Faustmann PM, Eis-Hübinger AM. Human herpesvirus 6 polymerase chain reaction findings in human immunodeficiency virus associated neurological disease and multiple sclerosis. *J Neurovirol* 1995;1:253-8.
- 53.- Ablashi DV, Lapps W, Kaplan M, Whitman JE, Richert JR, Pearson GR. Human Herpesvirus-6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Mult Scler* 1998;4:490-6.
- 54.- Fillet AM, Lozeron P, Agut H, Lyon-Caen O, Liblau R. HHV-6 and multiple sclerosis. *Nat Med* 1998;4:537.
- 55.- Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Killian JM, Zhang JZ. Detection of viral DNA and immune responses to the human herpesvirus 6 101-kilodalton virion protein in patients with multiple sclerosis and in controls. *J Virol* 2002;76:6147-54.
- 56.- Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 1997;3:1394-7.

- 57.- Villoslada P, Juste C, Tintore M, Llorenç V, Codina G, Pozo-Rosich P, et al. The immune response against herpesvirus is more prominent in the early stages of MS. *Neurology* 2003;60:1944-8.
- 58.- Ablashi DV, Eastman HB, Owen CB, Roman MM, Friedman J, Zabriskie JB, et al. Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients. *J Clin Virol* 2000;16:179-91.
- 59.- Friedman JE, Lyons MJ, Cu G, Ablashi DV, Whitman JE, Edgar M, et al. The association of the human herpesvirus-6 and MS. *Mult Scler* 1999;5:355-62.
- 60.- Virtanen JO, Färkkilä M, Multanen J, Uotila L, Jääskeläinen AJ, Vaheri A, et al. Evidence for human herpesvirus 6 variant A antibodies in multiple sclerosis: diagnostic and therapeutic implications. *J Neurovirol* 2007;13:347-52.
- 61.- Kuusisto H, Hyöty H, Kares S, Kinnunen E, Elovaara I. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis: a Finnish twin study. *Mult Scler* 2008;14:54-58.
- 62.- Ben-Fredj N, Ben-Selma W, Rotola A, Nefzi F, Benedetti S, Frih-Ayed M, et al. Prevalence of human herpesvirus U94/REP antibodies and DNA in Tunisian multiple sclerosis patients. *J Neurovirol* 2013;19:42-7.
- 63.- Hong J, Tejada-Simon MV, Rivera VM, Zang YC, Zhang JZ. Anti-viral properties of interferon beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2002;8:237-42.
- 64.- Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo M, Bartolome M, Garcia-Martinez MA, Arroyo R, et al. Human herpesvirus 6 and effectiveness of interferon β 1b in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2011;18:1027-35.
- 65.- Soldan SS, Leist TP, Juhng KN, McFarland HF, Jacobson S. Increased lymphoproliferative response to human herpesvirus type 6A variant in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2000;47:306-13.
- 66.- Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003;53:189-97.
- 67.- Knox KK, Brewer JH, Henry JM, Harrington DJ, Carrigan DR. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: systemic active infections in patients with early disease. *Clin Infect Dis* 2000;31:894-903.
- 68.- Chapenko S, Millers A, Nora Z, Logina I, Kukaine R, Murovska M. Correlation between HHV-6 reactivation and multiple sclerosis disease activity. *J Med Virol* 2003;69:111-7.
- 69.- Tomson V, Logina I, Millers A, Chapenko S, Kozireva S, Murovska M. Association of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 with demyelinating diseases of the nervous system. *J Neurovirol* 2001;7:564-9.
- 70.- Martínez A, Alvarez-Lafuente R, Mas A, Bartolomé M, García-Montojo M, de Las Heras V, et al. Environment-gene interaction in multiple sclerosis: human herpesvirus 6 and MHC2TA. *Hum Immunol* 2007;68:685-9.
- 71.- Alvarez-Lafuente R, Martínez A, García-Montojo M, Mas A, De Las Heras V, Dominguez-Mozo MI, et al. MHC2TA rs4774C and HHV-6A active replication in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2010;17:129-35.
- 72.- Dominguez-Mozo MI, García-Montojo M, De Las Heras V, García-Martinez A, Arias-Leal AM, Casanova I, et al. MHC-2TA mRNA levels and human herpesvirus 6 in multiple sclerosis patients treated with interferon beta along two-year follow-up. *BMC Neurol* 2012;12:107.
- 73.- Martin C, Enbom M, Söderström M, Fredrikson S, Dahl H, Lycke J, et al. Absence of seven human herpesviruses, including HHV-6, by polymerase chain reaction in CSF and blood from patients with multiple sclerosis and optic neuritis. *Acta Neurol Scand* 1997;95:280-3.
- 74.- Goldberg SH, Albright AV, Lisak RP, González-Scarano F. Polymerase chain reaction analysis of human herpesvirus-6 sequences in the sera and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neurovirol* 1999;5:134-9.
- 75.- Mirandola P, Stefan A, Brambilla E, Campadelli-Fiume G, Grimaldi LM. Absence of human herpesvirus 6 and 7 from spinal fluid and serum of multiple sclerosis patients. *Neurology* 1999;53:1367-8.
- 76.- Al-Shammari S, Nelson RF, Voevodin A. HHV-6 DNAemia in patients with multiple sclerosis in Kuwait. *Acta Neurol Scand* 2003;107:122-4.
- 77.- Alvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolomé M, Picazo JJ, Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch Neurol* 2004;61:1523-7.
- 78.- Fogdell-Hahn A, Soldan SS, Shue S, Akhyani N, Refai H, Ahlqvist J, et al. Co-purification of soluble membrane cofactor protein (CD46) and human herpesvirus 6 variant A genome in serum from multiple sclerosis patients. *Virus Res* 2005;110:57-63.
- 79.- Alvarez-Lafuente R, García-Montojo M, De las Heras V, Bartolomé M, Arroyo R. Clinical parameters and HHV-6 active replication in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Clin Virol* 2006;37 Suppl 1:S24-6.
- 80.- Ahram M, El-Omar A, Baho Y, Lubad MA. Association between human herpesvirus 6 and occurrence of multiple sclerosis among Jordanian patients. *Acta Neurol Scand* 2009;120:430-5.
- 81.- Franciotta D, Bestetti A, Sala S, Perucca P, Jarius S, Price RW, et al. Broad screening for human herpesviridae DNA in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum. *Acta Neurol Belg* 2009;109:277-82.
- 82.- Nora-Krukle Z, Chapenko S, Logina I, Millers A, Platkajis A, Murovska M. Human herpesvirus 6 and 7 reactivation and disease activity in multiple sclerosis. *Medicina (Kaunas)* 2011;47:527-31.

- 83.- Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, et al. Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 2001;287:321-32.
- 84.- Sotgiu S, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Arru G, et al. Multiple sclerosis (MS)-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study. *Neurology* 2002;59:1071-3.
- 85.- Firouzi R, Rolland A, Michel M, Jouvin-Marche E, Hauw JJ, Malcus-Vocanson C, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J Neurovirol* 2003;9:79-93.
- 86.- Antony JM, Van Marle G, Opii W, Butterfield A, Mallet F, Yong VW, et al. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nature Neurosci* 2004;7:1088-95.
- 87.- Mameli G, Poddighe L, Astone V, Delogu G, Arru G, Sotgiu S. Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSRVenv and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis. *J Virol Methods* 2009;161:98-106.
- 88.- Perron H, Lang A. The Human Endogenous Retrovirus Link between Genes and Environment in Multiple Sclerosis and in Multifactorial Diseases Associating Neuroinflammation. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;39:51-61.
- 89.- Perron H, Germe R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, Farinelli L, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler* 2012;18:1721-36.
- 90.- Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez A, De las Heras V, Casanova I, et al. The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity. *PLoS One* 2013;8:e53623.
- 91.- Christensen T, Dissing Sørensen P, Riemann H, Hansen HJ, Munch M, Haahr S, et al. Molecular characterization of HERV-H variants associated with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2000;101:229-38.
- 92.- Brudek T, Christensen T, Aagaard L, Petersen T, Hansen HJ, Møller-Larsen A. B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology* 2009;16:6:104.
- 93.- Petersen T, Møller-Larsen A, Ellermann-Eriksen S, Thiel S, Christensen T. Effects of interferon-beta therapy on elements in the antiviral immune response towards the human herpesviruses EBV, HSV, and VZV, and to the human endogenous retroviruses HERV-H and HERV-W in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2012;249:105-8.
- 94.- Tai AK, O'Reilly EJ, Alroy KA, Simon KC, Munger KL, Huber BT, et al. Human endogenous retrovirus-K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;14:1175-80.
- 95.- de la Hera B, Varadé J, García-Montojo M, Lamas JR, de la Encarnación A, Arroyo R, et al. Role of the Human Endogenous Retrovirus HERV-K18 in Autoimmune Disease Susceptibility: Study in the Spanish Population and Meta-Analysis. *PLoS One* 2013;8:e62090.
- 96.- Nexø BA, Christensen T, Frederiksen J, Møller-Larsen A, Oturai AB, Villesen P, et al. The etiology of multiple sclerosis: genetic evidence for the involvement of the human endogenous retrovirus HERV-Fc1. *PLoS One* 2011;6:e16652.
- 97.- Hansen B, Oturai AB, Harbo HF, Celius EG, Nissen KK, Laska MJ, et al. Genetic association of multiple sclerosis with the marker rs391745 near the endogenous retroviral locus HERV-Fc1: analysis of disease subtypes. *PLoS One* 2011;6:e26438.
- 98.- Laska MJ, Brudek T, Nissen KK, Christensen T, Møller-Larsen A, Petersen T, et al. Expression of HERV-Fc1, a human endogenous retrovirus, is increased in patients with active multiple sclerosis. *J Virol* 2012;86:3713-22.
- 99.- Lafon M, Jouvin-Marche E, Marche PN, Perron H. Human viral superantigens: to be or not to be transactivated? *Trends Immunol* 2002;23:238-9.
- 100.- Perron H, Suh M, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Stoebner P, et al. Herpes simplex virus ICP0 and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell line from a patient with multiple sclerosis. *J Gen Virol* 1993;74:65-72.
- 101.- Brudek T, Lühdorf P, Christensen T, Hansen HJ, Møller-Larsen A. Activation of endogenous retrovirus reverse transcriptase in multiple sclerosis patient lymphocytes by inactivated HSV-1, HHV-6 and VZV. *J Neuroimmunol* 2007;187:147-55.
- 102.- Tai AK, Luka J, Ablashi D, Huber BT. HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen. *J Clin Virol* 2009;46:47-8.
- 103.- Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Sotgiu S, Serra C, et al. Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. *PLoS One* 2012;7:e44991.