

biomedics  
ASSEM  
SINDROMES DE SENSIBILIDAD CENTRAL

PROPUESTA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

# Caracterización de biomarcadores inmunológicos en Encefalomiелitis Miálgica/Síndrome de Fatiga Crónica

Coordinador

*José Luis Rivas, ASSSEMBiomédics.*

*Dra. Milagros García. Área de Inmunología, Hospital Clínic de Barcelona, ASSSEMBiomédics.*

*Dr. Juan Carlos Mejía. Equipo de investigación de enfermedades autoinmunes. Hospital Clínic de Barcelona. ASSSEMBiomédics*

Promueve ASSSEM

[www.asssem.org](http://www.asssem.org)

Coordina ASSSEMBiomédics.

Provenza 238, entlo. 3, 08008 – Barcelona (España)

[biomedics@asssem.org](mailto:biomedics@asssem.org)

## CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN EM/SFC

## Introducción

La Encefalomielitis Miálgica/Síndrome de Fatiga Crónica (EM/SFC) es una patología grave que afecta de manera física y cognitiva, incapacitante y que por el momento se diagnostica exclusivamente en base a la sintomatología (1-3).

A pesar de que la Organización Mundial de la Salud clasifica la EM como patología neurológica (ICD G93.3), se sigue empleando mayoritariamente el término SFC, cogiendo la parte por el todo y dándole mayor importancia a un aspecto, la fatiga, que aparece en muchas otras patologías como el cáncer o la esclerosis múltiple; las últimas investigaciones, de hecho, han demostrado una inflamación generalizada y neuropatología sistémica (1).

De manera clásica, el diagnóstico se ha llevado a cabo en base a un periodo de fatiga continuado (de al menos 6 meses de duración) que no es resultado de ejercicio reciente, que no remite con el descanso y que incide de manera significativa en la vida de los afectados (2).

Los criterios más recientes, los de consenso internacional (1), destierran el aspecto de los 6 meses de duración, aunque por el momento no se encuentran desarrollados.

No existe consenso acerca de la etiología de la enfermedad, abarcando, entre otras, la de tipo viral, sobre todo de herpesvirus como EBV, CMV y HHV-6 (4-8), enterovirus (9-11) una vez descartado el XMRV (12).

Se han logrado mejoras relativas con tratamiento mediante antivirales (13-15) y, recientemente, el uso del Rituximab, un anticuerpo monoclonal utilizado para el tratamiento del linfoma, se ha demostrado efectivo en un porcentaje significativo de pacientes (16,17) y en el que se evidencia el papel de la autoinmunidad (18).

A pesar de no haberse demostrado la causa de la EM/SFC, la afectación inmune es notoria (19-21), así como el perfil de citocinas alterado (22-24). En especial las células NK presentan una menor función lítica y una expresión de receptores alterada (25-29), mientras que en células T se ha observado una menor presencia de células efectoras CD8 y una sobreexpresión de células reguladoras CD4 (30). Por último, las células B parecen tener un papel activo en la patología, aunque sus alteraciones funcionales y fenotípicas no están definitivamente establecidas (31).

## CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN EM/SFC

## Antecedentes

Con el proyecto denominado “Comparativa de Biomarcadores en EM/SFC”, promovido por ASSEM, se pretendía generar un marco en el que poder dar continuidad y ampliar el estudio preliminar llevado a cabo por IrsiCaixa en relación a diferentes anormalidades inmunes en un pequeño grupo de enfermos de EM/SFC (30).

Mediante dicho estudio comparativo, se consiguieron determinar diferentes subpoblaciones inmunitarias (ver metodología) en 193 participantes y 20 controles sanos, así como diferentes determinaciones serológicas para herpes virus (ver metodología) en 80 de los 193 participantes.

Para el estudio estadístico y análisis de los resultados se contó con el asesoramiento/ayuda de IrsiCaixa y se desarrolló un trabajo bibliográfico el cual no es posible publicar ante la falta de ciertos elementos básicos para ello (ver objetivo).

Los resultados preliminares obtenidos, que corroborarían alteraciones inmunológicas en al menos 2 de las subpoblaciones a las que IrsiCaixa hacía referencia en su documento del 2013 de Curriu y colaboradores (30), pondrían de manifiesto alteraciones inmunológicas concretas en enfermos de EM/SFC, aun cuando no serían homogéneas para todos los participantes y podrían determinar subgrupos de afectación a dicho nivel.

## Hipótesis

El análisis de estos datos ha permitido identificar dos marcadores de células Natural Killer, el CD57 y el NKp46, que presentan diferencias entre controles y pacientes y que podrían determinar dos subgrupos de afectados:

- 1.- Un subgrupo mayoritario en el que los valores de NKCD57 están bajos y los valores de NKp46 están elevados.
- 2.- Un subgrupo minoritario en el que los valores de NKCD57 están elevados y los valores de NKp46 son bajos.

Estas observaciones podrían ser explicadas por la reactivación de diferentes herpes virus (CMV y EBV) que pueden afectar de manera diferente a las células Natural Killer, de manera que alrededor de 1/3 de afectados no mostrarían valores alterados. Por otro lado, queremos constatar que existe una correlación entre valores elevados de IgG para CMVH y valores elevados para subpoblaciones de células T que poseen el marcador –CD57+.

## CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN EM/SFC

## Objetivo

Poder mejorar ciertos aspectos del estudio comparativo inicial en cuanto a la metodología a fin de poder publicar los resultados a los que hemos hecho referencia.

Para ello sería necesario revisar el estudio observacional retrospectivo transversal comparativo previo mediante dos acciones:

- 1- Ampliando el número de controles sanos en una proporción de al menos 1 control sano por cada dos enfermos.
- 2- Mejorando la categorización de los pacientes. El diagnóstico de los participantes, enfermos y controles sanos, se hará por parte de dos facultativos independientes y suficientemente cualificados para ello (\*), que desconocerán en todo momento si el participante es enfermo o control.

Los criterios que se utilizarán serán los Criterios de Consenso Canadienses para EM/SFC, que son los internacionalmente aceptados y desarrollados hasta el momento.

Una vez llevado a cabo el doble diagnóstico clínico, los datos serán reanalizados y se elaborará el documento correspondiente con el que defender la hipótesis expuesta y, si cabe, profundizar en otros aspectos que puedan resultar alterados, para ser presentados ante la comunidad científica a través de alguna revista especializada.

## Metodología

Inmunofenotipado, realizado en el Centro de Diagnóstico Biomédico (CDB) del Hospital Clínic de Barcelona (\*\*), de las siguientes subpoblaciones inmunológicas en %: Linfocitos T(CD3+CD19-); Linfocitos B(CD3-CD19+); Linfocitos CD4(CD3+CD4+); Linfocitos CD8(CD3+CD8+); Ratio CD4/CD8; Linfocitos TCD16 o CD56(CD3+CD16\_56+); Linfocitos NKT(CD3+CD57+); Linfocitos CD8(CD3+CD8+CD57-); Linfocitos CD8 (CD3+CD8+CD57+); Ratio CD8(CD3+CD8+CD57-)/CD8(CD3+CD8+CD57+); NK verdaderas(CD3-CD16\_56+); NKactivadas(CD16\_56+CD3-CD69+); NKbright(CD16\_56 bright); BCD38 high en IgG+; Treg classic CD25hi FOXP3+; CD5 bright sobre CD8+; CD69 sobre CD56+CD16+; NKp46 sobre CD56+CD16+; CD57 sobre CD56+CD16+.

(\*) Dra. Milagros García, inmunóloga y médico de familia, y Dr. Juan Carlos Mejía, reumatólogo.

## CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN EM/SFC

Además se incorpora la determinación del % de perforinas en NK y en CD8 (19, 32):

Perforinas en NK

Perforinas en CD8

Asimismo, se incluyen 4 determinaciones más, relacionadas con una publicación de Bradley y col. (35), en la que se detallan alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos B, según metodologías utilizadas en la inmunodeficiencia común variable (CVID) (33,34)

% Linfocitos B Naïve (sobre % linfocitos) o B naïve

% Linfocitos L Naïve (sobre % células B) o L naïve

% Transicionales (sobre % células B) o B transicionales

% Plasmablastos (sobre % células B) o B plasmablastos

Grupo Euroclass

Serologías víricas realizadas por los Laboratorios Labco/General Labs en Barcelona (\*\*)

IgG-CMVH; IgG VCA EBV; IgG EA EBV; IgG EBNA; IgG herpes 1; IgG herpes 2; IgG herpes 6; IgG VZT; IgG Parvo B19

## Tratamiento estadístico utilizado

Se realizarán cuatro tipos de análisis:

Comparativo entre grupos, para cada uno de los parámetros estudiados. Se utiliza el test de Mann-Whitney. Este test nos indica si existen diferencias entre los valores de mediana de cada grupo.

De correlación en el GRUPO SFC. Este análisis permite identificar parámetros que tienen un comportamiento relacionado. Se utiliza el test no paramétrico de Spearman que nos indica el grado de asociación entre dos parámetros.

Estudio longitudinal de los parámetros que correlaciona la estabilidad de los mismos en el tiempo y por tanto la bondad como posible biomarcador.

Clusterización de los resultados en base a investigar posibles agrupaciones comunes.

El análisis estadístico se realizará en colaboración con el *Dr. Julià Blanco*, IrsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona).

(\*\*) Metodología analítica empleada se incluirá en el documento definitivo.

## CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN EM/SFC

## Presupuesto

1. Gastos de personal	Euros
Dos médicos que diagnosticarán a los pacientes y que intervendrán en la investigación y demás fases del estudio (*)	
(*) ASSSEM asumirá 3000 € de los gastos de esta partida.	
<b>SUBTOTAL</b>	4200 €- 3000 €= 1200 €
<b>2.- Gastos de analíticas</b>	
Analíticas inmunológicas para cubrir una proporción ideal de 1 control sano por cada 2 enfermos	
<b>SUBTOTAL 1</b>	10.800 €
<b>TOTAL 1</b>	<b>(*) 12.000 €</b>

Nota aclaratoria importante: este presupuesto está elaborado en base a poder diagnosticar a 150 participantes (100 enfermos y 50 controles sanos) y el coste de realizar 30 analíticas más en controles sanos. En caso de superarse estos ratios, el importe económico crecería de manera proporcional al número de participantes.

**(\*) Con la campaña promovida por ASSSEM #objetivo12.000 se pretende llegar a la cantidad mínima necesaria para cubrir los costes necesarios para la publicación del estudio.**

**Puede colaborar con este proyecto haciendo donaciones a través de nuestra web [www.asssem.org](http://www.asssem.org)**

## Beneficios del proyecto

Si tras conseguir la financiación y aumentar los controles sanos los resultados se mantuvieran en la línea que hemos determinado con las muestras actuales, se podrían categorizar subgrupos de pacientes afectados por EM/SFC en base a criterios inmunofenotípicos bien definidos.

Asimismo, la caracterización inmunofenotípica, en base a los marcadores descritos, podría sentar las bases para estudios más en profundidad, por ej. con la determinación de las subpoblaciones NKG2C, NKG2A y K.I.R. y/o otras técnicas de detección directa como el EBER-DNA en EBV. Se trataría de poner así de manifiesto, de manera mucho más clara, reactivaciones por EBV y/o CMVH, que directa o indirectamente –mediante autoanticuerpos- podrían condicionar la etiopatogenia del EM/SFC y otros SSC y podrían justificar ensayos con Rituximab en casos indicados.



## CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN EM/SFC

### Bibliografía más relevante

- 1 Carruthers BM, van de Sande MI, De Meirleir KL, Klimas NG, Broderick G, Mitchell T, Staines D, Powles AC, Speight N, Vallings R, Bateman L, Baumgarten-Austrheim B, Bell DS, Carlo-Stella N, Chia J, Darragh A, Jo D, Lewis D, Light AR, Marshall-Gradisbik S, Mena I, Mikovits JA, Miwa K, Murovska M, Pall ML, Stevens S.: Myalgic encephalomyelitis: International Consensus Criteria. *J Intern Med.* 2011 Oct;270(4):327-38.
- 2 Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, et al: The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. *Ann Intern Med.* 1994; 121:953-959
- 3 Jason LA, Corradi K, Torres-Harding S, Taylor RR, King C: Chronic fatigue syndrome: the need for subtypes; *Neuropsychol Rev.* 2005 Mar;15(1):29-58.
- 4 Loebel M, Strohschein K, Giannini C, Koelsch U, Bauer S, Doebis C, Thomas S, Unterwalder N, von Baehr V, Reinke P, Knops M, Hanitsch LG, Meisel C, Volk HD, Scheibenbogen C: Deficient EBV-specific B- and T-cell response in patients with chronic fatigue syndrome. *PLoS One.* 2014 Jan 15;9(1)
- 5 Lerner AM, Ariza ME, Williams M, Jason L, Beqaj S, Fitzgerald JT, Lemeshow S, Glaser R: Antibody to Epstein-Barr virus deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase and deoxyribonucleotide polymerase in a chronic fatigue syndrome subset: *PLoS One.* 2012;7(11)
- 6 Cameron B, Flamand L, Juwana H, Middeldorp J, Naing Z, Rawlinson W, Ablashi D, Lloyd A.: Serological and virological investigation of the role of the herpesviruses EBV, CMV and HHV-6 in post-infective fatigue syndrome. *J Med Virol.* 2010 Oct;82(10):1684-8
- 7 Glaser R, Padgett DA, Litsky ML, Baiocchi RA, Yang EV, Chen M, Yeh PE, Klimas NG, Marshall GD, Whiteside T, Herberman R, Kiecolt-Glaser J, Williams MV.: Stress-associated changes in the steady-state expression of latent Epstein-Barr virus: implications for chronic fatigue syndrome and cancer. *Brain Behav Immun.* 2005 Mar;19(2):91-103.
- 8 Soto NE, Straus SE: Chronic Fatigue Syndrome and Herpesviruses: the Fading Evidence: *Herpes.* 2000 May;7(2):46-50.
- 9 Chia J, Chia A, Voeller M, Lee T, Chang R: Acute enterovirus infection followed by myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) and viral persistence. *J Clin Pathol.* 2010 Feb;63(2):165-8.
- 10 Chia JK, Chia AY.: Chronic fatigue syndrome is associated with chronic enterovirus infection of the stomach: *J Clin Pathol.* 2008 Jan;61(1):43-8.
- 11 Chia JK.: The role of enterovirus in chronic fatigue syndrome: *J Clin Pathol.* 2005 Nov;58(11):1126-32.
- 12 Silverman RH, Das Gupta J, Lombardi VC, Ruscetti FW, Pfost MA, Hagen KS, Peterson DL, Ruscetti SK, Bagni RK, Petrow-Sadowski C, Gold B, Dean M, Mikovits JA.: Partial retraction. Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome: *Science.* 2011 Oct 14;334(6053):176
- 13 Montoya JG, Kogelnik AM, Bhangoo M, Lunn MR, Flamand L, Merrihew LE, Watt T, Kubo JT, Paik J, Desai M: Randomized clinical trial to evaluate the efficacy and safety of valganciclovir in a subset of patients with chronic fatigue syndrome: *J Med Virol.* 2013 Dec;85(12):2101-9.
- 14 Watt T, Oberfoell S, Balise R, Lunn MR, Kar AK, Merrihew L, Bhangoo MS, Montoya JG: Response to valganciclovir in chronic fatigue syndrome patients with human herpesvirus 6 and Epstein-Barr virus IgG antibody titers: *J Med Virol.* 2012 Dec;84(12):1967-74.

## CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN EM/SFC

- 15 Lerner AM, Beqaj SH, Deeter RG, Fitzgerald JT: Valacyclovir treatment in Epstein-Barr virus subset chronic fatigue syndrome: thirty-six months follow-up.: In Vivo. 2007 Sep-Oct;21(5):707-13.
- 16 Fluge Ø, Bruland O, Risa K, Storstein A, Kristoffersen EK, Sapkota D, Næss H, Dahl O, Nyland H, Mella O.: Benefit from B-lymphocyte depletion using the anti-CD20 antibody rituximab in chronic fatigue syndrome. A double-blind and placebo-controlled study.; PLoS One. 2011;6(10)
- 17 Fluge Ø, Mella O.: Clinical impact of B-cell depletion with the anti-CD20 antibody rituximab in chronic fatigue syndrome: a preliminary case series; BMC Neurol. 2009 Jul 1;9:28.
- 18 Morris G, Berk M, Galecki P, Maes M: The emerging role of autoimmunity in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/cfs); Mol Neurobiol. 2014 Apr;49(2): 741-56
- 19 Brenu E, Mieke Van Driel L, Marshall-Gradisnik SM: Immunological abnormalities as potential biomarkers in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. J Med Transl. 2011, 9: 81
- 20 Klimas NG, Salvato FR, Morgan R, Fletcher MA. Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome. J Clin Microbiol. 1990 Jun;28(6):1403-10
- 21 Lorusso L, Mikhaylova SV, Capelli E, Ferrari D, Ngonga GK, et al. Immunological aspects of chornic fatigue syndrome. Auotimmun Rev. 2009 Aug: 287-291
- 22 Patarca-Montero R, Antoni M, Fletcher MA, Klimas NG.: Cytokine and other immunologic markers in chronic fatigue syndrome and their relation to neuropsychological factors; Appl Neuropsychol. 2001;8(1):51-64
- 23 Fletcher MA, Zeng XR, Barnes Z, Levis S, Klimas NG: Plasma cytokines in women with chronic fatigue syndrome.; J Transl Med. 2009 Nov 12;7
- 24 Broderick G1, Fuite J, Kreitz A, Vernon SD, Klimas N, Fletcher MA: A formal analysis of cytokine networks in chronic fatigue syndrome.; Brain Behav Immun. 2010 Oct;24(7):1209-17
- 25 Brenu EW, Hardcastle SL, Atkinson GM, van Driel ML, Kreijkamp-Kaspers S, et al.: Natural killer cells in patients with severe chronic fatigue syndrome. Autoimmunity Higligthts. 2013 Apr: 1-12
- 26 Brenu EW, van Driel ML, Staines DR, Ashton KJ, Hardcastle SL, Keane J, Tajouri L, Peterson D, Ramos SB, Marshall-Gradisnik SM.: Longitudinal investigation of natural killer cells and cytokines in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis.; J Transl Med. 2012 May 9;10:88
- 27 Morrison LJ, Behan WH, Behan PO.: Changes in natural killer cell phenotype in patients with post-viral fatigue syndrome; Clin Exp Immunol. 1991 Mar;83(3):441-6.
- 28 Stewart CC, Cookfair DL, Hovey KM, Wende KE, Bell DS, Warner CL: Predictive immunophenotypes: disease-related profile in chronic fatigue syndrome.; Cytometry B Clin Cytom. 2003 May;53(1):26-33
- 29 Barker E, Fujimura SF, Fadem MB, Landay AL, Levy JA: Immunologic abnormalities associated with chronic fatigue syndrome; Clin Infect Dis. 1994 Jan;18 Suppl 1:S136-41
- 30 Curriu M, Carrillo J, Massanella M, Rigau J, Alegre J, Puig J, García-Quintana AM, Castro-Marrero J, Negro E, Clotet B, Cabrera C, Blanco J.: Screening NK-, B- and T-cell phenotype and function in patients suffering from Chronic Fatigue Syndrome; J Transl Med. 2013 Mar 20;11:68
- 31 Bradley AS, Ford B, Bansal AS. Altered functional B-cell populations in patients with chronic fatigue syndrome compared to Healthy Controls.Clin Exp Immunol. 2013 Apr;172(1):73-80.
- 32 Maher KJ, Klimas NG, Fletcher MA.: Chronic fatigue syndrome is associated with diminished intracellular perforin; Clin Exp Immunol. 2005 Dec;142(3):505-11.
- 33 Schatorjé EJ, Gemen EF, Driessen GJ, LeuveniNK J, van Hout RW, van der Burg M, de Vries E.:Age-matched reference values for B-lymphocyte subpopulations and CVID classifications in children. Scand J Immunol. 2011 Nov;74(5):502-10.
- 34 Warnatz K, Schlesier M.: Diagnostic for Common Variable Immunodeficiency Syndrome; Cellular Diagnostics. Basic, Methodes and Clinical Applications of Flow Cytometry. Basel, Karger, 2009, pp 540-557.