

Versión traducida al español del artículo original **El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial**

Sarah Myhill¹, Norman E. Booth², John McLaren-Howard³

¹Sarah Myhill Limited, Llangunllo, Knighton, Powys, Wales LD7 1SL, UK; ²Department of Physics and Mansfield College, University of Oxford, Oxford OX1 3RH, UK; ³Acumen, PO Box 129, Tiverton, Devon EX16 0AJ, UK

Recibido el 2 de diciembre de 2008; aceptado el 12 de enero de 2009; disponible online el 15 de enero de 2009.

Resumen: Este estudio tiene como objetivo mejorar la salud de los pacientes que sufren el síndrome de fatiga crónica (SFC) mediante estudios bioquímicos de la enfermedad, específicamente de la función mitocondrial y la producción de ATP (adenosín trifosfato), la moneda energética de todas las funciones corporales, reciclando ADP (adenosín difosfato) para reemplazar el suministro de ATP según su requerimiento. Pacientes atendidos por la medicina privada especializada en SFC fueron diagnosticados utilizando los criterios de los Centros para el Control de Enfermedades (Centers for Disease Control) estadounidenses. Consultando a cada paciente, un número de la Escala de Capacidad Bell para el SFC (Bell CFS Ability Scale) fue asignado, y una muestra de sangre fue tomada para el test "perfil de ATP" (ATP profile) diseñado para el SFC y otros trastornos que cursan con fatiga. Cada test produjo 5 factores numéricos que describen la disponibilidad de ATP en los neutrófilos, la fracción del complejo con magnesio, la eficiencia de la fosforilación oxidativa, y las eficiencias de transferencia de ADP hacia la mitocondria y de ATP hacia el citosol, donde la energía es utilizada. Con el consentimiento de cada uno de los 71 pacientes y de los 53 individuos sanos de control, los 5 factores han sido cotejados con la Escala de Capacidad Bell. Los factores numéricos individuales muestran que los pacientes tienen diferentes combinaciones de lesiones bioquímicas. Cuando los factores son combinados, una correlación excepcional es observada entre el grado de disfunción mitocondrial y la severidad de la enfermedad ($P < 0.001$). Solo 1 de los 71 pacientes está en la región de normalidad. Por otro lado, se demuestra que el test "perfil de ATP" es una poderosa herramienta de diagnóstico que puede diferenciar entre pacientes que tienen fatiga y otros síntomas como resultado de un gasto excesivo de energía por estrés y factores psicológicos y aquellos que tienen insuficiente energía debido a una disfunción en la respiración celular. Los resultados individuales indican qué remedios, en forma de suplementos dietéticos, medicamentos y detoxificación, tienen más probabilidades de ser beneficiosos, y qué otros tests deberían llevarse a cabo.

Palabras Clave: Síndrome de fatiga crónica, encefalomiелitis miálgica, mitocondria, neutrófilos, fosforilación oxidativa.

Organización y revisión de la traducción:

Dpto. Investigación MERCURIADOS (www.mercuriados.org)

Traducido por:

Cathy van Riel (Leader Against Pain - miembro de la Coalición Mundial Against Pain),
Carlos Luque López

Validación científica de la traducción:

D^a Ana M^a Moreno Fernández
Profesora Titular de Universidad en el área de Histología
Doctor en Medicina y Cirugía
Miembro de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla
Departamento de Citología e Histología normal y Patológica.. En investigación durante varios años ha trabajado en Inmunohistoquímica aplicado a la investigación oncológica y actualmente implicada en el estudio del estrés oxidativo en la fibromialgia.

Introducción

El síndrome de fatiga crónica es una enfermedad multisistémica que les roba a sus víctimas su salud y dignidad. Dos de los signos más característicos y debilitantes del SFC son una resistencia muy reducida y una fatiga post-ejercicio. A veces la fatiga es principalmente mental, y otras es fundamentalmente física. La fatiga se considera falta de energía, viniendo ésta del proceso metabólico básico de la oxidación de los nutrientes.

Una hipótesis ampliamente sostenida (A) es que el metabolismo en personas con SFC es normal y la fatiga y otros síntomas son debidos a factores psicológicos. Se sabe que la fatiga física es falta de energía, pero la fatiga mental es considerada como una sensación subjetiva caracterizada por una falta de motivación y alerta [1], incluso aunque el cerebro sea el principal consumidor de energía celular en estado de reposo. Los pacientes pueden mostrar una disposición negativa a la enfermedad que incrementa la severidad de los síntomas [2,3]. Sin embargo, si el metabolismo está funcionando adecuadamente, la fatiga y los síntomas relacionados deben ser debidos a que la energía está siendo malgastada por procesos mentales y físicos de estrés, ansiedad, tensión y depresión. Los pacientes deberían poder ser ayudados, y posiblemente curados, con una intervención psicológica, p.ej. la terapia cognitivo-conductual. Para explicar el malestar post-ejercicio una hipótesis alternativa (A') es necesaria, pudiendo llamarse "falta de acondicionamiento físico" debido al desuso de los músculos. Sin embargo, la hipótesis A' no se sostiene en la práctica, como veremos en muchos casos a continuación.

Una hipótesis alternativa (B) es que hay una disfunción metabólica donde no se produce la suficiente cantidad de energía. La fuente principal de energía viene de la completa oxidación de la glucosa a dióxido de carbono y agua. El sistema digestivo produce glucosa, glicerol y ácidos grasos, y aminoácidos. Si hay un problema en el sistema digestivo, p.ej. fermentación intestinal, hipoclorhidria o insuficiencia pancreática, la producción de energía se verá afectada y puede provocar una fatiga [4]. Estas condiciones pueden y deberían ser comprobadas. Las alergias y un mal funcionamiento de la glándula Tiroides también pueden producir fatiga.

Cuando el sistema digestivo funciona correctamente, el torrente sanguíneo se nutre de glucosa y lípidos, donde, junto con el oxígeno unido a la hemoglobina en los eritrocitos (glóbulos rojos), son transportados a cada célula del cuerpo. En el citosol de cada célula la glucosa se descompone, en una serie de reacciones químicas llamadas glicólisis, en dos moléculas de piruvato

que entran en los orgánulos productores de energía presentes en la mayoría de las células del cuerpo, llamados mitocondrias. Algunos detalles estructurales y el número de mitocondrias por célula depende de los requerimientos de energía en cada caso; las células cardiacas, del músculo esquelético, del hígado y del cerebro son las que las tienen mayor número. La mitocondria genera energía mediante el metabolismo oxidativo en forma de ATP (adenosín trifosfato) que cuando se hidroliza al bifosfato ADP, libera energía para producir contracciones musculares, impulsos nerviosos y cualquier proceso consumidor de energía, incluyendo la energía química necesaria para sintetizar todas las moléculas complejas del organismo [5,6]. Así, una disfunción mitocondrial resultará en fatiga y puede producir otros síntomas del SFC.

Las dos hipótesis no son mutuamente excluyentes. Algunos pacientes pueden satisfacer ambas. Sin embargo hay restricciones; el ritmo metabólico basal (alrededor de 7000 kJ por día) debe ser mantenido y la primera ley de la termodinámica no puede ser violada.

Hay pruebas evidentes de que la disfunción mitocondrial está presente en algunos pacientes de SFC. Biopsias musculares estudiadas mediante microscopio electrónico han mostrado degeneración mitocondrial anormal [7-9]. También se han encontrado en biopsias, severas deleciones genéticas en el ADN mitocondrial (mtADN), genes que están asociados con la producción bioenergética [9,10]. Una consecuencia de la disfunción mitocondrial es un incremento en la producción de radicales libres, que causan daño oxidativo. Este daño oxidativo y una incrementada actividad de las enzimas antioxidantes han sido detectados en especímenes musculares [11]. Algunos compuestos esenciales (carnitina y acil-carnitina) necesarios para algunas reacciones metabólicas en la mitocondria han sido medidos en suero, y se han encontrado reducidos en pacientes con SFC [12,13]. Ambos estudios encontraron una correlación entre los niveles de carnitina y la capacidad funcional. También se han encontrado un metabolismo oxidativo reducido [14-16] y concentraciones más altas de xenobióticos, lactato y piruvato.

En un grupo de pacientes fue observada una disminución del pH intracelular después de ejercicio moderado, y un ratio reducido de síntesis de ATP durante la recuperación fue también medido [18]. Estos hallazgos sugieren una afectación en el reciclaje mitocondrial del ADP en ATP.

Sin embargo, también hay estudios similares que no confirman la disfunción mitocondrial. Es probable que esto sea debido a los diferentes

criterios de diagnóstico utilizados. Por ejemplo, el criterio de Oxford (Oxford criteria) [1], una definición propuesta por psiquiatras, requiere solo fatiga; "otros síntomas pueden estar presentes" pero no son esenciales. El criterio de los Centros para el Control de Enfermedades [Centers for Disease Control (CDC)], es más selectivo ya que requiere cuatro síntomas adicionales de una lista de ocho [19]. En Inglaterra en 2007 el Instituto Nacional para la Calidad Clínica [National Institute for Clinical Excellence (NICE)] todavía introdujo otro criterio, fatiga más algún otro síntoma, por ejemplo dolor de garganta persistente [20]. Al otro lado del espectro están los criterios basados en estudios de pacientes con Encefalopatía Miálgica (EM) [21-23] que han culminado en el consenso de criterios Canadienses [24]; el criterio canadiense es improbable que incluya a pacientes que satisfagan sólo la hipótesis A. Todavía más confuso es el hecho de que ambos criterios, el Canadiense y el nuevo NICE de Inglaterra usan el término EM/SFC (ME/CFS) a pesar de que sus criterios son muy diferentes. Hoy en día el criterio de los CDC es internacionalmente usado como criterio para propósitos de investigación a pesar de su falta de precisión [25]. Esta situación puede cambiar en el futuro porque el criterio canadiense está ganando una aceptación más amplia, y una agencia de investigación benéfica (ME Research UK) requiere ahora ambos criterios, el de los CDC y el Canadiense, para ser usados en los proyectos de investigación que financia. Usamos los términos SFC o SFC/EM para el criterio de los CDC y EM/SFC para el criterio Canadiense. Nuestro estudio tiene como meta evaluar el rol de la disfunción mitocondrial, con el objetivo principal de ayudar a los pacientes.

La hipótesis B es atractiva porque una disfunción mitocondrial en varios órganos ofrece una posible explicación para muchos de los otros síntomas del SFC y de la EM. Hay pruebas crecientes de que los síntomas son debidos a disfunciones a un nivel celular. Se han visto anomalías en células del sistema inmune [26], y estudios de expresión genética han revelado anomalías en genes asociados con células del sistema inmune, células cerebrales, células del músculo esquelético, con la tiroides y con la mitocondria [27,28]. Otro estudio posterior identificó siete fenotipos clínicos [29]. Parece que hay tres grupos distintos de anomalías clínicas que definen el SFC [30]: (a) anomalías en el flujo sanguíneo y vasculares, como la intolerancia ortostática (sistema vascular), (b) dolor generalizado, y alta sensibilidad a comidas, temperatura, luz, ruido y olores (sensibilización del Sistema Nervioso Central), y (c) fatiga, cansancio y niebla mental (producción de energía mermada). La hipótesis B consiste en que la falta de energía en el tercer grupo se origina en las mitocondrias de las células individuales. Pero la

disfunción mitocondrial también puede producir las anomalías (a) y (b) porque el ATP producido en cada célula por sus mitocondrias es la principal fuente de energía para todas las funciones corporales.

Estas observaciones de las investigaciones biomédicas en el SFC son muy prometedoras, pero ¿cuánto tiempo tienen que esperar los pacientes antes de que haya un progreso real en la mejoría de sus síntomas? En la consulta médica privada especializada en el SFC, la meta principal es hacer que los pacientes se sientan y funcionen mejor. Se comienza el tratamiento utilizando el conocimiento biomédico existente para proporcionar una base de nutrición, del manejo del estilo de vida y del descanso. En caso de estar presentes, también se abordan los problemas tiroideos, adrenales y de alergias. La mayoría de pacientes mejora con estas intervenciones. No obstante, en muchos casos la mejoría no es tan grande como quisieran el paciente y el médico. Cuando uno de nosotros (SM) supo que se comercializaba el kit necesario para la realización del test "perfil de ATP" se pensó que podría ser útil para predecir el nivel de incapacidad y para identificar cualquier lesión bioquímica que pudiera ser la causa subyacente. El kit del test "perfil de ATP", desarrollado por uno de nosotros (JMH), se ha diseñado específicamente para el SFC y para otras condiciones donde la disponibilidad de energía está reducida. Se encontró rápidamente que el "perfil de ATP" era muy útil para predecir el nivel de incapacidad, sugiriendo además cuales eran las intervenciones que más probablemente beneficiarían a los pacientes. A los efectos de este estudio se han efectuado los tests en una determinada cantidad de pacientes y también en ciertos sujetos sanos. Una vez cotejados, los resultados de los tests mostraron evidencias completamente inesperadas. Antes de informar sobre los procedimientos de los tests y sus resultados, proporcionamos un breve resumen sobre la manera en la que las mitocondrias producen energía.

Metabolismo energético mitocondrial

En cada célula la glucosa es descompuesta en piruvato, proceso en el que se produce algo de ATP (2 moléculas netas por cada molécula de glucosa). El piruvato y los ácidos grasos entran en las mitocondrias de cada célula, como muestra de forma esquemática la **Figura 1**, donde ocurren dos procesos metabólicos coordinados: el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), también conocido como ciclo de Krebs, que produce algo de ATP, y la cadena de transporte de electrones (ETC, también llamada Cadena Respiratoria porque utiliza la mayoría del oxígeno que respiramos) que regenera el ATP desde el ADP mediante el proceso de la fosforilación oxidativa (ox-phos). En total se

producen algo más 30 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, y éstas constituyen los paquetes más importantes de energía celular, usados para todos los procesos vitales. Además de los alimentos y el oxígeno, las vías metabólicas requieren todos los nutrientes implicados en la producción de una gran cantidad de enzimas que controlan la multitud de reacciones bioquímicas implicadas y todos los cofactores necesarios para activar las enzimas [31-33]. La mayoría de las enzimas están codificadas por el ADN nuclear (nADN) de los núcleos celulares y unas pocas están codificadas por el mtADN. Algunas de las enzimas dependen de otros órganos. Por ejemplo, la hormona tiroidea es necesaria para el ciclo TCA. Por otra parte el hipertiroidismo, puede desacoplar el proceso ox-phos [34]; o sea que un problema tiroideo puede llevar a desarrollar fatiga y esto puede ser analizado. El cuerpo humano contiene normalmente menos de 100 gr. de ATP en cualquier instante, pero puede consumir hasta 100 Kg. al día. Por esto el proceso ox-phos de reciclaje es extremadamente importante y produce más del 90% de nuestra energía celular. Las características y los procesos más importantes están ilustrados de manera simplificada en la **Figura 1** (se pueden encontrar más detalles en cualquier libro de texto de bioquímica de nivel pre-universitario, p.ej. [6], y en libros de texto de biología de nivel avanzado de

la escuela secundaria, p.ej. [35]). El ETC culmina con el complejo proteínico ATP sintasa que es como un motor secuencial reversible en el que se producen 3 moléculas de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P) en cada revolución [36]. Debido a la historia evolutiva el ATP se produce dentro de la membrana interna de las mitocondrias, pero se utiliza fuera de ella, en el citosol, donde libera energía al convertirse en ADP y Pi. Como ión negativo el P es co-transportado de vuelta hacia dentro junto con el H⁺, mientras que el ADP³⁻ es transportado también hacia dentro a través de la proteína Translocasa, adenina nucleótido translocasa (TL o ANT), intercambiándose por el ATP⁴⁺ que sale y entra en el citosol. Aquí hay problemas potenciales porque se sabe que ciertas moléculas específicas (p.ej. la atractilisida) bloquean la transferencia hacia el interior, mientras otras pueden bloquearla hacia el exterior [37], y existe la posibilidad de que haya otras moléculas, incluyendo contaminantes ambientales que puedan bloquear dichas transferencias.

¿Qué ocurre cuando alguna parte de estas vías metabólicas celulares funciona incorrectamente? Si no funciona correctamente la fuente de energía mitocondrial pueden aparecer muchos síntomas de enfermedad [38] incluyendo los síntomas del SFC.

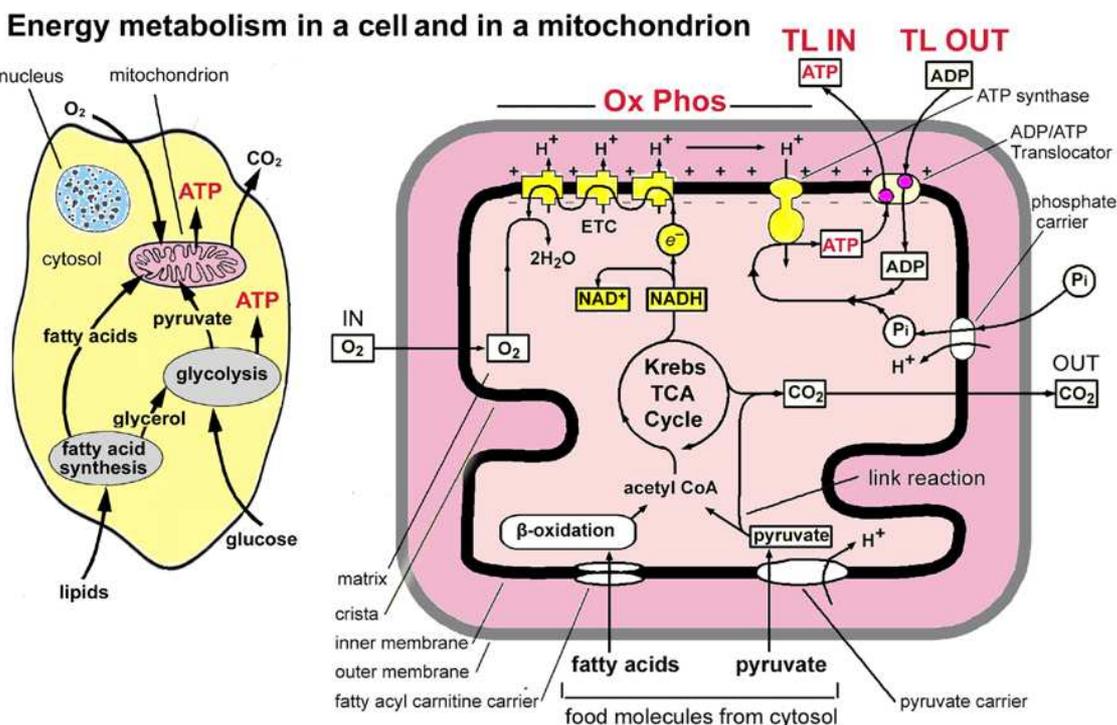


FIGURA 1. Metabolismo energético en una célula y en la mitocondria

Fases más importantes y localización del metabolismo energético en una célula humana (izquierda), y detalles simplificados de una mitocondria que muestra los ciclos metabólicos principales y la cadena respiratoria de fosforilación oxidativa (derecha). La membrana mitocondrial externa es muy permeable, mientras que la interna lo es solamente para agua y gases. Proteínas especiales transportadoras y Translocasas pasan los reactantes a través de ella. Arriba están las proteínas implicadas en la cadena respiratoria del traspaso de electrones (ETC) y en el traspaso de ATP y ADP entre el citosol y la mitocondria. EL ADP y el Pi son combinados por la ATP sintasa para fabricar ATP. La Translocasa ADP/ATP se abre hacia fuera (OUT) para transferir ADP a la matriz y se abre hacia dentro (IN) para transferir ATP al citosol. La enzima nicotinamida adenina dinucleótido juega un papel

fundamental en su forma oxidada NAD⁺ y en su forma reducida NADH + H⁺ en el transporte y en la transferencia de protones (H⁺) y electrones (e⁻). Adaptado de: [35] y [5].

Supongamos que la demanda de ATP es más alta que el ritmo al que puede ser reciclado. Esto ocurre a los atletas durante la carrera de 100 metros. Las células musculares entran en el metabolismo anaeróbico donde cada molécula de glucosa es convertida en 2 moléculas de ácido láctico. Este proceso es muy ineficiente (5.2% de producción de energía comparada con el 100% de la oxidación completa) y solo puede durar unos pocos minutos. El incremento de acidez produce dolor muscular. Asimismo, cuando la concentración de ADP en el citosol incrementa y éste no puede ser reciclado suficientemente rápido en ATP, ocurre otra reacción química. Esto se vuelve importante si hay cualquier disfunción mitocondrial. Dos moléculas de ADP interactúan para producir una de ATP y una de AMP (adenosín monofosfato). El AMP no puede ser reciclado [6] y a consecuencia se pierde la mitad del potencial del ATP. Esto precisa de algunos días para reponerse y puede contribuir al síntoma de malestar post-esfuerzo experimentado por los pacientes [39-43].

Por esto la disfunción mitocondrial que resulta en un deterioro de la producción y del reciclaje del ATP es una hipótesis biológicamente plausible, y hay considerable evidencia de que esto es un factor contributivo en el SFC, al menos en un subgrupo de pacientes. Nuestro estudio puede considerarse como un test de esta hipótesis.

Métodos

Participantes

Setenta y un pacientes, 54 mujeres de media de edad de 47 (rango de 14 a 75) y 17 hombres de media de edad de 52 (rango de 20 a 86), fueron seleccionados de un total de 116 pacientes consecutivos que acudieron a una clínica médica privada especializada en SFC/EM. Solamente se excluyeron a los pacientes si no cumplían los criterios de diagnóstico para el SFC de los CDC [19] o si se habían realizado el test "perfil de ATP" antes de haberlos visto clínicamente. Se efectuaron, cuando eran apropiados, evaluaciones, tests e intervenciones, por problemas dietéticos y de sueño, alergias, y problemas tiroideos y adrenales. También se les dio consejo sobre el reposo requerido. Después de esta fase se mantuvo una reunión con cada paciente durante la cual se les asignó una acordada Habilidad numérica, la cual fue registrada en las notas clínicas. La Escala integral de Habilidad SFC [44] va de 0 a 10 y se adjunta en el **Apéndice A**. Se propuso a aquellos pacientes que no habían mejorado hasta un nivel clínico aceptable después de estas intervenciones que se realizaran el test

"perfil de ATP". Todos los pacientes participantes tenían una puntuación de 7 o menos en la Escala de Habilidad SFC.

Se explicó la naturaleza del test y cada paciente accedió (y pagó) a realizarse el test "perfil de ATP" (se necesitaba una muestra de 3 ml de sangre venosa). El laboratorio que efectuó los tests (Biolab Medical Unit, www.biolab.co.uk) desconocía la Habilidad asociada con cada muestra de sangre. A medida que se realizaban los test en más pacientes, quedaba patente que los resultados del "perfil de ATP" estaban proporcionando información útil, y se les pidió a los pacientes un permiso escrito e informado para utilizar de manera anónima los datos de sus tests. Todos los pacientes lo dieron.

Como Director del Laboratorio Biolab y hasta su retiro de ese puesto en 2007, uno de nosotros (JMH) recolectó muestras sanguíneas de cincuenta y tres voluntarios sanos. Biolab obtuvo el permiso escrito con el consentimiento informado de cada voluntario. Se procesaron de la misma manera las muestras del grupo de pacientes y del grupo de sujetos sanos (de control). El grupo de control consistía en 40 mujeres con una media de edad de 36 (rango de 18 a 63) y en 13 hombres cuya media de edad era de 35 (rango de 18 a 65).

Para ambos grupos todos los procedimientos fueron consistentes con la Declaración de Helsinki (2000) de la "World Medical Association" (www.wma.net) y este informe sigue las guías del "International Committee of Medical Journal Editors" (icmje.pdf disponible en www.icmje.org).

Procedimientos

El ATP está presente en las células, sobre todo como un complejo con magnesio y es hidrolizado al difosfato (ADP) como la fuente de energía más importante para los músculos y otros tejidos. La conversión de ADP en ATP dentro de las mitocondrias puede ser bloqueada o parcialmente bloqueada por ciertos contaminantes ambientales. Específicamente, la TL en la membrana mitocondrial que controla la transferencia de ADP desde el citosol y de ATP hacia el citosol, puede ser químicamente inhibida, siendo su eficacia también dependiente del pH. Los cambios en el equilibrio ácido-base, la disponibilidad de magnesio y la presencia de productos metabólicos anormales pueden tener similares efectos que la inhibición xenobiótica de la TL.

Se han desarrollado unos cuantos métodos para medir el ATP. Métodos como la espectroscopia con resonancia magnética (MRS) de ^{31}P requieren unos medios disponibles solamente en grandes hospitales o en institutos de investigación. Se pueden hacer biopsias de músculo esquelético, pero no de órganos vitales, como del corazón, cerebro o hígado. Los métodos que emplean muestras sanguíneas (específicamente neutrófilos) son relativamente no invasivos y se pueden llevar a cabo como tests rutinarios. Además, el flujo sanguíneo llega casi a todas las células del cuerpo y lleva mucha información de lo que está ocurriendo. El método para medir el ATP utilizado en el "perfil de ATP", data de 1947 cuando McElroy vertió una solución de ATP en colas de luciérnaga pulverizadas y observó una brillante luminiscencia, encontrando que la cantidad de luz producida era proporcional a la concentración de ATP [45]. Así mostró que la energía que contiene el ATP puede producir luz y esto llevó al desarrollo de mediciones bioluminiscentes que se pueden realizar de manera rutinaria y reproducible con kits de ensayos bioquímicos comercialmente disponibles y con equipos de bioluminiscencia [46-49]. La luz es producida cuando el ATP reacciona con la D-luciferina y el oxígeno en presencia de Mg^{2+} y de la enzima luciferasa. Cuando el ATP es el reactivo limitante, la luz emitida es proporcional al ATP presente.

El test "perfil de ATP"

El test "perfil de ATP" encuentra 5 factores numéricos independientes de 3 series de mediciones, (A), (B) y (C) en muestras de sangre (neutrófilos). En el **Apéndice B** se dan detalles sobre las medidas efectuadas y de cómo se han calculado los factores numéricos. Las 3 series son:

(A). La concentración de ATP en los neutrófilos se mide en presencia de un exceso de magnesio que se necesita para las reacciones del ATP. Esto da el factor ATP en unidades de nmoles por millones de células (o fmoles/célula), correspondiente a la medida de cuánto ATP hay presente. Luego se hace una segunda medición, con sólo el magnesio endógeno presente. El Ratio ATP es el cociente entre la cantidad de ATP medida con magnesio endógeno y la cantidad medida con magnesio añadido. Esto nos indica qué fracción de ATP hay disponible para el suministro de energía.

(B). La eficiencia del proceso de la fosforilación oxidativa se mide al inhibir primero la conversión de ADP en ATP en el laboratorio con sodio azida. Este producto químico inhibe tanto la proteína mitocondrial citocromo a3 (último paso en el ETC), como la ATP sintasa [50]. El ATP debe entonces ser consumido rápidamente y dar una

concentración baja al ser medido. Luego, se elimina el inhibidor lavando y volviendo a mantener las células en una solución tampón. Las mitocondrias deben entonces rápidamente recuperar el ATP a partir del ADP y restaurar la concentración de ATP. El resultado neto da el Ox Phos, que es la eficiencia de reciclaje del ADP en ATP, proceso que aporta más energía disponible según se requiera.

(C). La TL varía un único sitio de fijación entre dos emplazamientos. En la primera posición el ADP es recuperado del citosol para ser reconvertido en ATP, y en la segunda el ATP producido en las mitocondrias es traspasado al citosol para liberar su energía. Se realizan las mediciones atrapando las mitocondrias en un medio con afinidad cromatográfica. Primero se mide el ATP mitocondrial. Luego, se añade un tampón contenedor de ADP a un pH que fuertemente incita a la TL hacia la recolección del ADP para ser convertido en ATP. Después de 10 minutos se mide el ATP en las mitocondrias. Esto nos da el número TL OUT. Ésta es la medida de la eficiencia de la transferencia de ADP desde el citosol para su reconversión en ATP en las mitocondrias. En la siguiente medición se añade un tampón a un pH que fuertemente incita la TL en la dirección de devolver el ATP al citosol. Después de 10 minutos se lavan las mitocondrias para liberarlas del tampón y se mide el ATP restante en las mitocondrias y esto da el número TL IN. Esta es una medida de la eficiencia del traspaso de ATP desde las mitocondrias al citosol, donde puede liberar su energía según se requiera.

Resultados

Los factores numéricos individuales

La **Figura 2** muestra unas gráficas de dispersión (un punto para cada paciente) de cada uno de los 5 factores vs. Habilidad SFC. Como veremos más adelante es conveniente dividir los datos de los 71 pacientes en 3 categorías, "muy severo", "severo" y "moderado", que tienen más o menos la misma cantidad de entradas (25, 21 y 25). A la derecha de cada gráfica de dispersión mostramos un histograma de proyección estratificado para las 3 categorías de Habilidad (para los pacientes) y más a la derecha un histograma para los sujetos de control. Si se mira primero el histograma de ATP para los sujetos de control vemos un valor mínimo bien definido, con una larga cola hacia arriba hasta un valor máximo de 2.89 fmoles/célula. El valor medio es 2.00 ± 0.05 [EEM (Error estándar de la media), $n=53$] que puede ser comparado con la medición, 1.9 ± 0.1 (EEM=12), hecha hace unos 25 años con la misma técnica en un estudio de la energética de la fagocitosis en neutrófilos[51].

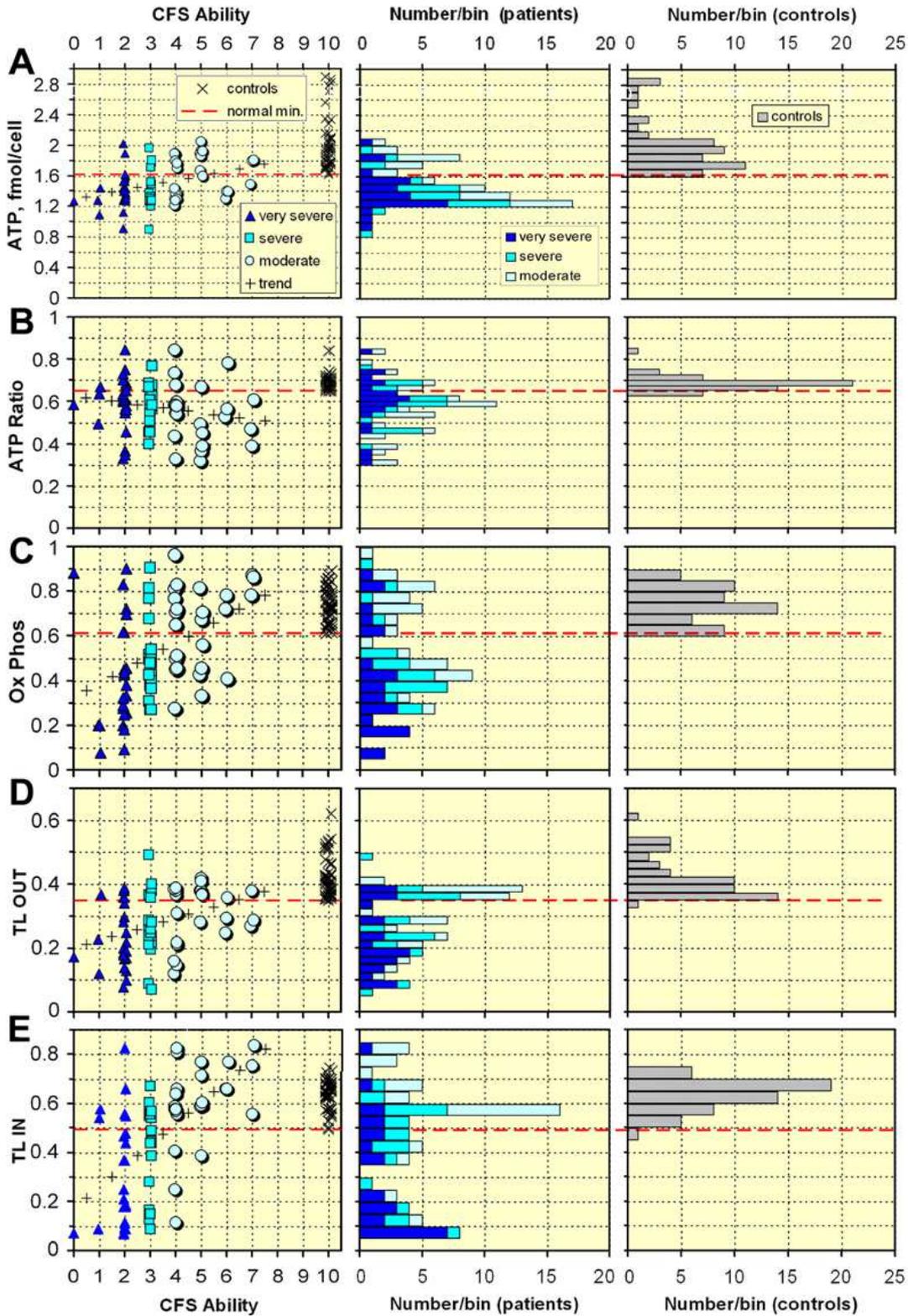


Figura 2. Gráficas de dispersión de los 5 factores (Desde A hasta E) medidos en el test "perfil del ATP" vs. Habilidad SFC. En el medio están los histogramas de proyección estratificados de las 3 categorías del grupo de pacientes, y a la derecha los histogramas de proyección del grupo de control. Las gruesas líneas de guiones horizontales corresponden al valor mínimo de cada factor medido para el grupo de control.

El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial

El histograma estratificado para los pacientes y para los datos relativos a la Habilidad SFC muestra claramente que algunos pacientes están en la región normal y que algunos están por debajo, separándose en dos grupos con muy poco solapamiento. En vez de comparar a los pacientes con la media del grupo de control como se acostumbra, preferimos compararlos con los valores mínimos del grupo de control, que está más claramente definido. Este método también nos permite clasificar los pacientes según se encuentren en la región normal o por debajo. Esto se puede cambiar fácilmente y se dan todos los números en la **Figura 2**. Por tanto mostramos con una gruesa línea de guiones horizontal el valor mínimo de cada factor medido en los controles.

La **Figura 2A**, ATP vs. Habilidad SFC, muestra que la mayoría de los pacientes "muy severos" y "severos" están por debajo del mínimo normal, pero muy pocos están debajo del 75% de este mínimo. Apuntar que 3 de los pacientes "muy severos" están dentro de la región normal; Éstos tienen problemas con uno o más de los otros 4 factores. Sobre el 50% de los pacientes "moderados" están en la región normal. Hay una pequeña correlación positiva que se indica con las cruces "trend". No hay un suave incremento en el ATP con la Habilidad, pero sí un aumento de la fracción de los pacientes por encima de la línea mínima de normalidad.

La **Figura 2B** muestra el Ratio de ATP vs. Habilidad SFC. La mayoría de pacientes en las 3 categorías están por debajo del mínimo normal y aproximadamente 1/3 de los pacientes "moderados" están por debajo de 75% del mínimo normal. La correlación con la Habilidad es ligeramente negativa. Los valores para los sujetos de control están sin embargo claramente agrupados con un mínimo de 0.65 y una media de 0.69.

La gráfica para el Ox Phos en la **Figura 2C** muestra un amplio rango de valores y una fuerte correlación positiva para este factor con respecto al grupo de pacientes. La proyección estratificada claramente muestra que hay dos grupos – por encima y por debajo del mínimo normal y el grupo de arriba abarca un rango similar a los

controles. Destacar el alto valor para el único paciente con Habilidad SFC=0. Este paciente también tiene ATP=1.26 y un ATP Ratio=0.59 que no están muy por debajo de los mínimos normales.

La gráfica TL OUT de la **Figura 2D** también muestra dos grupos, sin embargo en este caso con un pico en las proyecciones estratificadas, justo por encima del mínimo normal, y esto se ajusta estrechamente con la proyección del grupo de control. Muchos pacientes, particularmente los "muy severos" están muy por debajo del mínimo normal.

La gráfica TL IN de la **Figura 2E** también muestra un pico en la región normal. No obstante, algunos pacientes tienen valores muy bajos, incluyendo el paciente con Habilidad SFC=0. El producto TL OUT \times TL IN es solamente 0.012 para este paciente que está gravemente enfermo, mientras que este producto es 0.17 para el mínimo normal, un múltiplo mayor de 14. Si solamente se hubiera medido el ATP y el Ox Phos no se hubiera detectado la muy severa disfunción mitocondrial de este paciente. Destacar la fuerte correlación positiva para el TL IN.

La mayoría de pacientes están por debajo de lo normal en más de un factor (El [rango] medio es 3.7 [de 2 a 5] para "muy severos", 3.5 [de 2 a 5] para "severos" y 2.2 [de 1 a 4] para "moderados"). Algunas de estas características están resumidas numéricamente en la **Tabla 1**.

Para la mayoría de factores, el porcentaje de pacientes que están en la región normal incrementa al ir de "muy severos" a "severos" y a "moderados". La excepción es el Ratio ATP que disminuye ligeramente, siendo constante el error estadístico del mismo. Tanto el TL IN, como el producto TL OUT \times TL IN, incrementan por múltiplos altos. Para los pacientes de la categoría "moderada" la influencia más importante en su enfermedad parece ser el Ratio ATP.

La **Tabla 1** también ilustra la importancia de medir más de un factor. Por ejemplo, si se hubiera medido solamente el ATP, el 28% de todos los pacientes se hubieran clasificado como normales, y de haber medido únicamente el Ox Phos, el 32% de

El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial

los pacientes "muy severos" se hubieran clasificado como normales.

Correlaciones entre los factores numéricos

También es útil observar las correlaciones entre las parejas de factores numéricos. Los 5 ejemplos más relevantes se muestran en la **Figura 3**.

En las gráficas de dispersión de la **Figura 3**, la región normal es la región rectangular en la esquina derecha superior definida por las líneas de guiones mínimas de normalidad. En la gráfica correspondiente al Ratio ATP vs. ATP (**Figura 3A**), la mayoría de pacientes está bastante cerca de la región normal, menos un grupo pequeño que está en ATP Ratio ~ 0.35 .

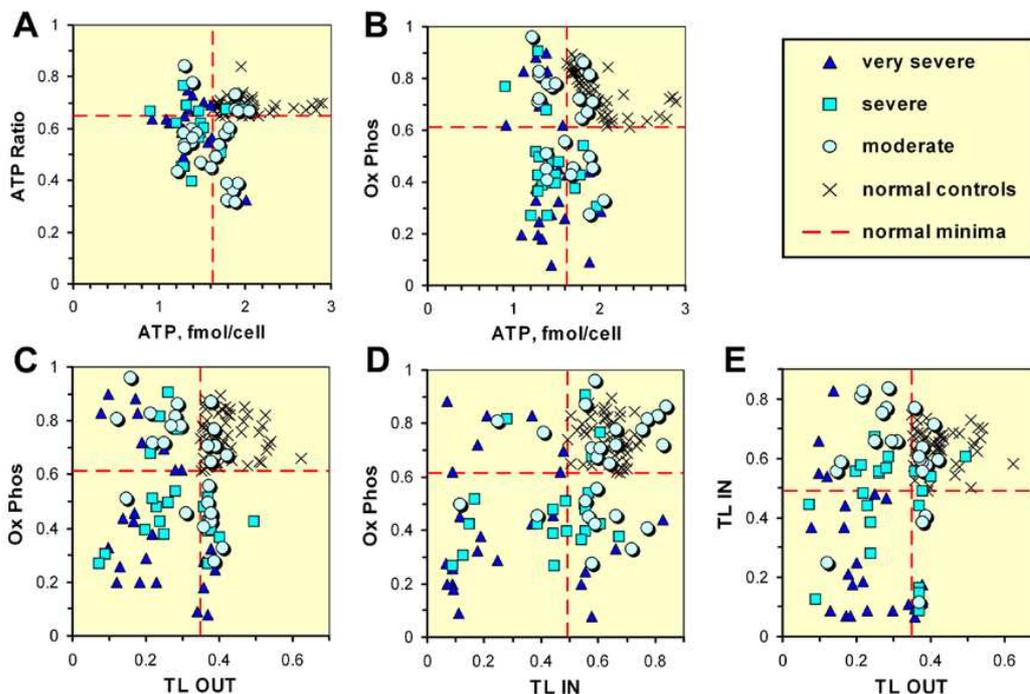
En la gráfica Ox Phos vs. ATP (**Figura 3B**)

hay sólo unos pocos pacientes, todos "moderados", en la región normal para ambos factores. Algunos de los pacientes "muy severos" y "severos" están en la región normal para Ox Phos y algunos están muy por debajo. Observar la notoria correlación negativa para los controles normales. Esto muestra que para los sujetos normales hay un sistema compensatorio; p.ej. si el ATP está alto, el Ox Phos está bajo y viceversa. Esto es de esperar porque la concentración de ATP es el factor fundamental en el control del ritmo del proceso ox-phos, ajustándose así el suministro de energía para cubrir su demanda. No hay evidencia obvia de este efecto en el grupo de pacientes.

Tabla 1. Algunas características de los factores medidos en los tests "perfil de ATP"

Categoría	Porcentaje de pacientes en la región normal					
	ATP	Ratio ATP	Ox Phos	TL OUT	TL IN	TL OUT×TL IN
todos (N=71)	28 ± 5	28 ± 5	38 ± 6	39 ± 6	52 ± 6	30 ± 5
muy severo	12 ± 7	32 ± 10	32 ± 10	24 ± 9	24 ± 9	8 ± 6
Severo	19 ± 9	29 ± 10	19 ± 9	38 ± 11	48 ± 11	14 ± 8
Moderado	52 ± 10	24 ± 9	60 ± 10	56 ± 10	84 ± 8	64 ± 10

Los errores mostrados son ± 1 DE (Desviación Estándar), calculados con la distribución binomial.



El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial

Figura 3. Gráficas de dispersión de correlaciones entre las parejas de factores medidos en el "perfil de ATP".

En la gráfica Ox Phos vs. TL OUT (**Figura 3C**) sólo 6 pacientes (todos "moderados") están en la región normal de ambos factores. Observar cómo los resultados para el TL OUT muestran 2 grupos, una banda estrecha a la derecha de la línea de guiones vertical y un grupo esparcido a la izquierda de esta línea. Mirándolo verticalmente, vemos que para el primer grupo, la Habilidad de los pacientes (indicada por las 3 categorías) está correlacionada con su valor de Ox Phos. Hay un gran esparcimiento para esta variable, y de nuevo parece haber dos grupos, más o menos divididos por la línea del mínimo normal horizontal. Algunos de los pacientes de las 3 categorías están por encima de esta línea, pero tienen problemas con uno o más de los otros factores. Algunos de los pacientes "muy severos" tienen el Ox Phos por debajo del mínimo normal, con diferencias de un orden de magnitud.

En la gráfica Ox Phos vs. TL IN (**Figura 3D**) hay muchos más pacientes en la región normal para ambos factores, pero también muchos con valores muy bajos para una o ambas variables.

En la gráfica TL IN vs. TL OUT (**Figura 3E**) hay dos grupos, uno en la esquina derecha superior que corresponde a la región normal para ambos factores, y otro muy por debajo, en el TL IN ~ 0.1 . Algunos pacientes están también muy por debajo del mínimo normal para ambas variables.

Según los métodos bioquímicos empleados podríamos esperar cierta correlación entre los factores TL y Ox Phos, pues ambos están muy relacionados, interactuando conjuntamente en el ciclo de reconversión del ADP en ATP. Sin embargo las gráficas indican que los métodos bioquímicos utilizados permiten separar los factores TL y Ox Phos y medirlos así de manera individual.

Creemos que esta es la primera vez que han sido observados estos efectos de manera tan detallada.

La Puntuación de la Energía Mitocondrial

Las mediciones bioquímicas obtenidas por el "perfil de ATP" separan los procesos de generación de energía y de reciclaje en 5

pasos. Como en cualquier proceso secuencial, por ejemplo en la producción de potencia eléctrica o en una cadena de montaje, la eficiencia del proceso global es el producto de las eficiencias de los pasos individuales. Cualquier índice de ponderación relativa es irrelevante; únicamente tiene consecuencia dentro de un factor general de normalización. El producto de ATP y Ratio ATP es la concentración celular de ATP en complejo con magnesio y esto corresponde al suministro de energía disponible en forma de ATP. Ox Phos es la eficiencia del ETC que convierte el ADP en ATP. Sin embargo, para producir más energía disponible mediante el reciclaje del ADP, la proteína Translocasa debe encarar de manera eficiente su sitio de unión hacia fuera, para recoger el ADP (TL OUT), y alternativamente encararlo hacia dentro (TL IN), para transmitir de manera eficiente el ATP desde la mitocondria hacia el citosol, donde su energía pueda ser utilizada.

Hemos concluido que es útil calcular el producto de los cinco factores, esto es, la eficiencia relativa global de producción de energía mitocondrial, a la que hemos llamado "Puntuación de Energía Mitocondrial". Simplemente multiplicamos los 5 factores para cada paciente y para cada control. El valor mínimo para los controles es 0.182 fmoles/célula. Hemos elegido este valor como nuestro punto de normalización, por el cual hemos dividido la Puntuación de Energía Mitocondrial (tanto para los pacientes como para los controles), obteniendo de esta forma un valor de Puntuación de Energía Mitocondrial ≥ 1 para todos los controles.

En la **Figura 4A** se muestra una gráfica de dispersión de la Puntuación de Energía para cada paciente y cada sujeto sano de control, con respecto a su Habilidad SFC. La línea de guiones horizontal indica el valor mínimo para los sujetos de control y éste es nuestro valor de normalización de 1.00. Solo uno de los 71 pacientes tiene una Puntuación de Energía > 1 (exactamente de 1.25, con una Habilidad SFC = 7). No obstante, este paciente muestra 2 de los 5 factores por debajo del mínimo de normalidad.

El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial

Destacar el alto grado de correlación entre la Puntuación de Energía y la Habilidad SFC, siendo esto independiente de dónde esté el valor medio o el mínimo de los sujetos normales. Es natural pensar que es más probable que la Habilidad SFC de los pacientes dependa de la disfunción mitocondrial que viceversa, y por esto realmente deberíamos mostrar la Habilidad SFC en función de la Puntuación de Energía. Sin embargo la Habilidad fue medida primero, y la **Figura 4A** muestra de manera convincente que la disfunción mitocondrial es un factor de riesgo mayor, y esto no ha sido demostrado con anterioridad. También se muestra en la **Figura 4A** la línea recta de regresión ajustada para las 71 entradas. El ajuste es

bueno, pero no hay ninguna razón para que la relación de dichas entradas debiera ser una línea recta. La **Tabla 2** nos muestra los parámetros del ajuste. El error estándar de la pendiente de la línea recta de regresión ajustada es tan pequeño, que la probabilidad P de la hipótesis nula (p.ej. que la pendiente fuese cero), es extremadamente pequeña, $P < 0.001$, habiendo sido calculada mediante la distribución t de Student [52]. EL intervalo de confianza del 99.9% es $0.092 < \beta < 0.174$, donde β es la pendiente verdadera, estando este límite bajo todavía algunos errores estándar sobre cero.

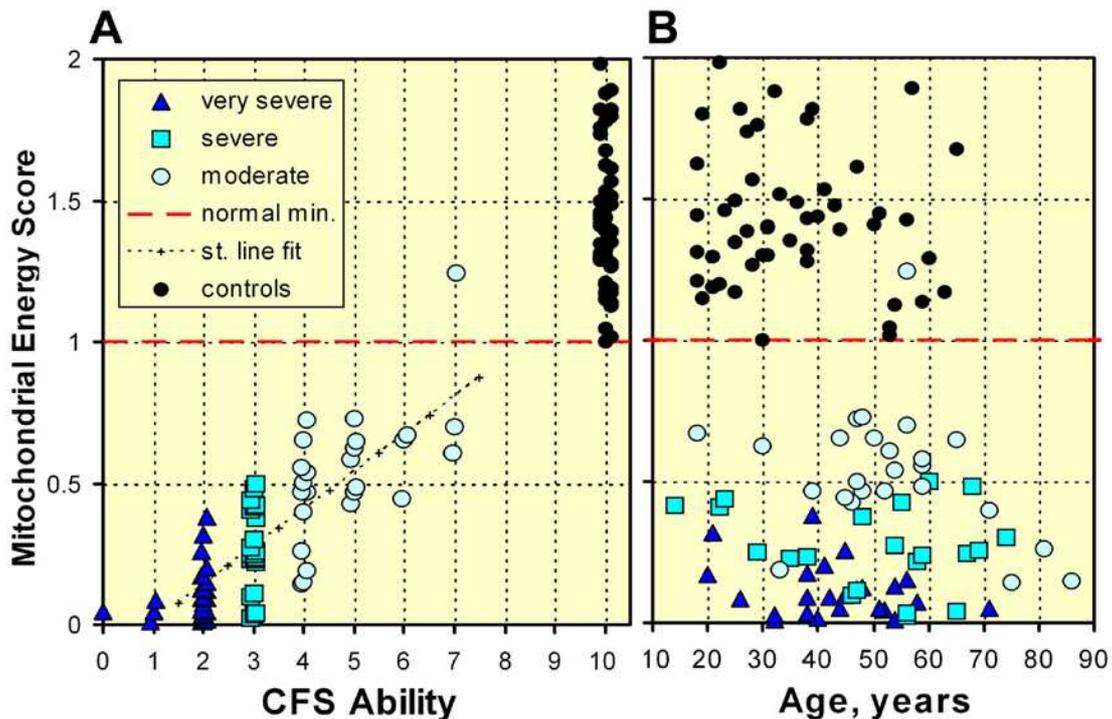


Figura 4. La Puntuación de Energía Mitocondrial. **A.** La gráfica de la Puntuación de Energía (Mitochondrial Energy Score) contra la Habilidad SFC (CFS Ability) con un punto para cada paciente. Los puntos para cada control aparecen graficados en la Habilidad SFC = 10. La línea de guiones horizontal en la Puntuación de Energía=1.00 es nuestra normalización correspondiente al valor mínimo de Puntuación de Energía de los controles. **B.** Gráfica Puntuación de Energía vs. Edad de pacientes y controles.

Tabla 2. Parámetros de la línea recta de regresión ajustada a los datos de la Puntuación de Energía Mitocondrial

Resultados de la línea recta de regresión ajustada			
Pendiente	0.132± 0.012	Test- t Observado	11.4
Intersección	- 0.123± 0.042	Grados de Libertad	69†
R^2	0.645*	probabilidad P del test- t	< 0.001

* R^2 (llamado el "coeficiente de determinación" o la "variación explicada") es el cuadrado del producto del coeficiente de correlación momento-producto.

El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial

† Hay 71 puntos de datos y 2 parámetros, pendiente e intersección.

En la **Figura 4B**, las Puntuaciones de Energía están graficadas en función de la edad de cada participante. Se cree que las mitocondrias juegan un papel fundamental en el proceso de envejecimiento [31, 33] por lo que cabría la posibilidad de que la edad media de los más jóvenes del grupo de control en comparación con el grupo de pacientes pudiera influenciar nuestros resultados. Hemos mirado la dependencia de cada uno de los 5 factores con respecto a la edad y no hemos encontrado ninguna relación; esto no es ninguna sorpresa si tenemos en cuenta la amplia extensión de valores de cada factor. La Puntuación de Energía es una de las medidas más fiables para la disfunción mitocondrial. En la **Figura 4B** no hay evidencia de dependencia respecto a la edad en el grupo de control, pero la edad máxima es sólo de 65 años (se han omitido los puntos de tres controles debido a que su Puntuación de Energía era mayor de 2.00, con un máximo de 2.83). Hay seis pacientes de edad ≥ 70 años, uno "muy severo" con Habilidad=2, uno "severo" con Habilidad=3, y cuatro "moderados" todos con Habilidad=4. Estos cuatro pacientes tienen una Puntuación de Energía por debajo de la media (0.42) para esta Habilidad, por lo que sí puede haber una disminución con la edad. Por otro lado hay un paciente de 33 años que también tiene una Habilidad=4 que está bastante por debajo de la media. Excluyendo los seis pacientes de edad ≥ 70 años, mejora ligeramente la línea recta de regresión lineal ($R^2=0.677$), pero su efecto es insignificante sobre los otros parámetros o sobre nuestras conclusiones.

Discusión

Los resultados del "perfil de ATP" muestran una disfunción mitocondrial en los neutrófilos de los pacientes de nuestro grupo de estudio. Además el grado de esta disfunción está correlacionado de manera muy precisa con la severidad de su enfermedad. Los neutrófilos son las células efectoras principales del sistema inmune, y la disfunción mitocondrial observada seguramente tenga efectos nocivos en este sistema. Notar que previamente se había observado un incremento de la apoptosis de los neutrófilos en las personas con SFC [26]. Las mitocondrias son partes

funcionales importantes de casi todas las células humanas, pero no podemos afirmar a partir del presente estudio que las mitocondrias de otras células sufran el mismo grado de disfuncionalidad. La biología humana provee energía a los órganos vitales, a expensas de las partes menos importantes. No obstante, las disfunciones en las células cardíacas y en las del sistema nervioso central, podrían explicar respectivamente los grupos de anomalías clínicas vasculares y de sensibilización central, mencionadas en la introducción. De esta manera, nuestros resultados sugieren claramente que la causa inmediata de los síntomas del SFC/EM es la disfunción mitocondrial.

No podemos enfatizar lo suficiente la importancia de un diagnóstico meticuloso utilizando los criterios de los CDC [19], o incluso mejor con los criterios Canadienses que describen de forma más precisa los síntomas [24]. (Está disponible una versión abreviada de estos últimos para profesionales de la salud, pacientes y cuidadores en: www.mefmaction.net/Patients/Overviews/tabid/122/Default.aspx; y también es español en: <http://www.mefmaction.net/Portals/0/docs/ME%20Overview-Spanish.pdf>). No puede asegurarse que una selección de pacientes con criterios menos selectivos encontrara el alto grado de correlación observado aquí.

Los distintos valores encontrados para los factores individuales que se conjugan para obtener la Puntuación de Energía Mitocondrial, indican que no todos los pacientes están afectados de la misma manera. Esto puede deberse a la naturaleza heterogénea de los agentes precipitadores o a las variaciones en la manera en que los pacientes reaccionan a ellos. Los resultados indican lesiones bioquímicas específicas y algunas de ellas pueden ser susceptibles de mejora con las intervenciones apropiadas. Las mitocondrias necesitan todas sus vitaminas esenciales, minerales, ácidos grasos esenciales y aminoácidos para funcionar eficientemente [31-33]. Esto es muy importante desde el punto de vista clínico de ayudar a los pacientes; el típico protocolo poco individualizado y casi

El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial

aleatorio que además requiere mucho tiempo, puede ser remplazado por intervenciones basadas en información y comprensión bioquímica [53]. El análisis de los resultados de las intervenciones que están llevándose a cabo (ver www.drmyhill.co.uk), será el tema de una futura publicación.

Conclusiones

Hemos demostrado la capacidad y la utilidad del test "perfil de ATP" al confirmar y determinar con precisión las disfunciones bioquímicas en las personas con SFC.

Nuestras observaciones nos permiten señalar con solidez la disfunción mitocondrial como la causa inmediata de los síntomas del SFC. No obstante, no podemos determinar si el daño en la función mitocondrial es un efecto primario, o secundario a una o más condiciones primarias, por ejemplo a la hipoxia celular [30], o al estrés oxidativo, incluyendo un exceso de peroxinitrito [54-58]. La disfunción mitocondrial está también asociada a algunas otras enfermedades, y esto no es sorprendente teniendo en cuenta el importante papel que desempeñan las mitocondrias en casi todas las células del cuerpo, aunque este hecho parece haber sido reconocido sólo en los últimos años [34, 38, 59, 60].

Las observaciones aquí presentadas deberían ser confirmadas en un estudio debidamente planificado y financiado. Se deberían realizar los tests bioquímicos en los pacientes con SFC, antes y después de las intervenciones clínicas apropiadas y posiblemente también en pacientes con otras condiciones incapacitantes que cursen con fatiga. También sería bueno poder confirmar los resultados de los tests bioquímicos en un segundo laboratorio (quizás apoyado por el gobierno).

Agradecimientos

Agradecemos los útiles comentarios de los Dres. Derek Pheby y Neil Abbot.

Dirección para la correspondencia: Norman E. Booth, PhD, 'Applegate', Orchard Lane, East Hendred, Wantage OX12 8JW, UK, Teléfono: +44 (0)1235 833486

E-mail: n.booth1@physics.ox.ac.uk

Apéndice A – La escala de Bell de Habilidad SFC (Bell CFS Ability Scale)

Esta escala es una medición útil y sensible del nivel de actividad y habilidad para funcionar de los pacientes con SFC/EM [44]. Es similar a la Puntuación del Índice de Energía (Energy Index Point Score) (EIPS™, www.cfsviral-treatment.com) [61]. Va de 0 a 10 con:

0. Síntomas Severos constantes; confinado en la cama todo el tiempo; incapaz de cuidarse solo.
1. Síntomas Severos en reposo; confinado en la cama la mayoría del tiempo. No sale de casa. Marcados síntomas cognitivos que afectan a la concentración.
2. Síntomas moderados a severos en reposo. Incapaz de realizar actividad intensa. Actividad global del 30-50% de lo esperado. Incapaz de salir de casa excepto en ocasiones puntuales. Confinado en la cama la mayoría del día. Incapaz de concentrarse durante más de 1 hora al día.
3. Síntomas moderados a severos en reposo. Severos síntomas con cualquier ejercicio; nivel de actividad global reducido al 50% de lo esperado. Usualmente confinado en casa. Incapaz de realizar tareas extenuantes. Capaz de hacer trabajo de oficina durante 2-3 horas al día, pero requiere periodos de descanso.
4. Síntomas moderados en reposo. Moderados a severos síntomas con ejercicio o actividad; el nivel global de actividad está reducido al 50-70% de lo esperado. Capaz de salir una o dos veces por semana de casa. Incapaz de llevar a cabo tareas extenuantes. Capaz de realizar trabajo sentado en casa durante 3-4 horas al día, pero requiere periodos de descanso.
5. Síntomas moderados en reposo. Moderados a severos síntomas con ejercicio o actividad; el nivel global de actividad está reducido al 70% de lo esperado. Incapaz de hacer tareas extenuantes, pero capaz de realizar ligeras tareas o trabajo de oficina durante 4-5 horas al día, pero requiere periodos de descanso.
6. Síntomas leves a moderados en reposo. La limitación en las actividades diarias se notan claramente. Funcionamiento general del 70% al 90%. Incapaz de trabajar a jornada completa en trabajos que requieran actividad física (incluyendo simplemente estar de pie), pero capaz de trabajar a jornada completa en actividades ligeras (estando sentado) si el horario es flexible.
7. Síntomas leves en reposo; algunas limitaciones en las actividades diarias se notan claramente. El funcionamiento global está cerca del 90% de lo esperado, excepto para actividades que requieran esfuerzo. Capaz, pero con dificultades, de trabajar a jornada completa.
8. Síntomas leves en reposo. Los síntomas empeoran con el esfuerzo. Sólo se percibe una

El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial

mínima limitación en aquellas actividades que requieren esfuerzo. Capaz de trabajar a jornada completa, con dificultades en aquellos trabajos que requieran esfuerzo.

9. Ningún síntoma en reposo. Síntomas leves con la actividad. Un nivel normal de actividad global; capaz de trabajar a jornada completa sin dificultades.

10. Ningún síntoma en reposo o con ejercicio; nivel normal de actividad general. Capaz de trabajar o realizar tareas caseras a tiempo completo sin dificultades.

Apéndice B – Los tests “perfil de ATP”

Los tests “perfil de ATP” fueron desarrollados y llevados a cabo en la unidad médica Biolab, Londres, GB (www.biolab.co.uk), donde uno de nosotros (JMH) fue Director de Laboratorio hasta su retiro en 2007. Las muestras de sangre se recibieron en tubos de heparina de 3 ml y eran testadas y procesadas en un máximo de 72 horas desde la venipuntura. Describimos aquí brevemente las 3 series de mediciones, (A), (B) y (C) y cómo se calcularon los 5 factores numéricos. (Se pueden obtener los detalles paso por paso contactando a JMH en acumenlab@hotmail.co.uk).

Se separan los neutrófilos mediante la centrifugación de gradiente de densidad Histopaque™, según el Procedimiento Sigma® No. 1119 (1119.pdf disponible en www.sigmaaldrich.com). Se comprueba la pureza celular mediante microscopio óptico y se evalúa la concentración celular utilizando un contador de células automático. La medición cuantitativa de la bioluminiscencia del ATP se realizó usando el Kit de Ensayo de Bioluminiscencia de Células Somáticas Adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Sigma®) [Sigma® Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Somatic Cell Assay Kit, (FLASC)], de acuerdo con el Boletín Técnico Sigma® (Technical Bulletin No. BSCA-1 (FLASCBUL.pdf). En este método se consume el ATP y se emite luz cuando la luciferasa de la luciérnaga cataliza la oxidación de la D-luciferina. La luz emitida es proporcional al ATP presente, y se mide con un espectrómetro fluorescente Perkin-Elmer LS 5B equipado con un (flow-through micro cell). Se utiliza el Sigma® ATP Standard (FLAA.pdf) como control y como método adicional de control de calidad para comprobar la recuperación. Hay kits similares disponibles de otros proveedores, p.ej. el sistema de ensayo ATP ENLITEN™ (ENLITEN™ ATP Assay System) [Boletín Técnico en www.promega.com], y ahora hay disponibles instrumentos accesorios, p.ej. “Modulus Luminescence Modules” (ver las instrucciones de aplicación:

www.turnerbiosystems.com/doc/app/notes/PDF/997_9304.pdf).

(A). Se mide primero el ATP con un exceso de magnesio añadido mediante la Mezcla de Ensayo Sigma® (Sigma® ATP Assay Mix) lo cual proporciona el resultado *a*. Esto es el primer factor,

la concentración del ATP en las células completas, $ATP = a$ en unidades de nmoles/ 10^6 células (o fmoles/célula).

Se repite la medición únicamente con el magnesio endógeno presente, utilizando los mismos reactivos producidos en el propio laboratorio sin magnesio añadido, dando el resultado *b* en las mismas unidades. El ratio, $c = b/a$, e el segundo factor, el Ratio ATP.

(B). Para medir la eficiencia de conversión del ADP en ATP vía el proceso ox-phos, se utiliza el resultado ATP, *a* (con exceso de magnesio), y entonces se inhibe la conversión en el laboratorio con sodio azida durante 3 min y se obtiene el resultado *d* (también con exceso de magnesio). Luego se elimina el inhibidor de laboratorio lavándolo con un tampón salino y las mitocondrias deberían recuperar (otra vez durante 3 min) rápidamente los niveles de ATP a partir del ADP. Esto proporciona el resultado *e* en las mismas unidades. La eficiencia de conversión Ox Phos viene determinada por:

$$f = [(e - d) / (a - d)].$$

(C). Para medir la efectividad de la Translocasa (TL) en la membrana mitocondrial se destruyen las células y se atrapan las mitocondrias en pellas en un medio de afinidad cromatografía adulterado con una baja concentración de atractilósido. Esto inmoviliza las mitocondrias mientras se eliminan los otros componentes de las células al lavarse. Los tampones utilizados en este momento liberan las mitocondrias dejando la atractilósida como soporte sólido que no interviene más en el proceso. La concentración de ATP mitocondrial se mide, obteniendo el resultado *g*, en unidades de pmoles/millones de células. Para la siguiente medición algunas pellas son sumergidas en una solución tampón (que actúa como un citosol artificial), que contiene ADP con un pH = (5.5 ± 0.2) , que incita a la Translocasa a recoger el ADP para convertirlo en ATP en la mitocondria. Después de 10 minutos el ATP se mide de nuevo, dando el resultado *h* en las mismas unidades. El factor TL OUT es el incremento fraccional de ATP

$$j = [(h - g) / g].$$

Para las siguientes mediciones se sumergen las pellas en un tampón que no contiene ADP y se estimula a la TL para que deje de recoger ADP, y en su lugar transfiera ATP al citosol artificial a un pH = (8.9 ± 0.2) . Después de 10 minutos se mide otra vez el ATP mitocondrial dando el resultado *k*, siendo el factor TL IN la disminución fraccional

$$l = [(g - k) / g].$$

Referencias

[1] Sharpe MC, Archard LC, Banatvala JE, Borysiewicz LK, Clare AW, David A, Edwards RHT, Hawton KEH, Lambert HP, Lane RJM, McDonald EM, Mowbray JF, Pearson DJ, Peto TEA, Preedy VR, Smith AP, Smith D, Taylor DJ, Tyrrell DAJ, Wessely S and White PD. A report - chronic fatigue syndrome: guidelines for research. J R Soc Med 1991; 84: 118-121.

El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial

- [2] Wessely S, David A, Butler S and Chalder T. Management of chronic (post-viral) fatigue syndrome. *J R Coll Gen Pract* 1989; 39: 26-29.
- [3] Moss-Morris R and Petrie KJ. Experimental evidence for interpretive but not attention biases towards somatic information in patients with chronic fatigue syndrome. *Br J Health Psychol* 2003; 8: 195-208.
- [4] Howard JM. Intestinal dysbiosis. *Complement Ther Med* 1993; 1: 153-157.
- [5] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, 2002.
- [6] Voet D, Voet JG and Pratt CW. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- [7] Behan WMH, More IAR and Behan PO. Mitochondrial abnormalities in the postviral fatigue syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991; 83: 61-65.
- [8] Byrne E, Trounce I and Dennett X. Chronic relapsing myalgia (?postviral): clinical, histological and biochemical studies. *Aust N Z J Med* 1985; 15: 305-308.
- [9] Vecchiet L, Montanari G, Pizzigallo E, Iezzi S, de Bigontina P, Dragani L, Vecchiet J and Giamberardino MA. Sensory characterization of somatic parietal tissues in humans with chronic fatigue syndrome. *Neurosci Lett* 1996; 208: 117-120.
- [10] Zhang C, Baumer A, Mackay IR, Linnane AW and Nagley P. Unusual pattern of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of an adult human with chronic fatigue syndrome. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 751-754.
- [11] Fulle S, Mecocci P, Fano G, Vecchiet I, Vecchini A, Racciotti D, Cherubini A, Pizzigallo E, Vecchiet L, Senin U and Beal MF. Specific oxidative alterations in vastus lateralis muscle of patients with the diagnosis of chronic fatigue syndrome. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1252-1259.
- [12] Kuratsune H, Yamaguti K, Takahashi M, Misaki H, Tagawa S and Kitani T. Acylcarnitine deficiency in chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis* 1994; 18: S62-S67.
- [13] Plioplys AV and Plioplys S. Serum levels of carnitine in chronic fatigue syndrome: clinical correlates. *Neuropsychobiology* 1995; 32: 132-138.
- [14] Arnold DL, Bore PJ, Radda GK, Styles P and Taylor DJ. Excessive intracellular acidosis of skeletal muscle on exercise in a patient with a post-viral exhaustion/fatigue syndrome. *Lancet* 1984; 323: 1367-1369.
- [15] McCully KK, Natelson BH, Iotti S, Sisto S and Leigh JS. Reduced oxidative muscle metabolism in chronic fatigue syndrome. *Muscle Nerve* 1996; 19: 621-625.
- [16] Wong R, Lopaschuk G, Zhu G, Walker D, Catellier D, Burton D, Teo K, Collins-Nakai R and Montague T. Skeletal muscle metabolism in the chronic fatigue syndrome. *Chest* 1992; 102: 1716-1722.
- [17] Buist R. Elevated xenobiotics, lactate and pyruvate in C.F.S. patients. *J Orthomolecular Med* 1989; 4: 170-172.
- [18] Lane RJM, Barrett MC, Taylor DJ, Kemp GJ and Lodi R. Heterogeneity in chronic fatigue syndrome: evidence from magnetic resonance [19] Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG and Komaroff A. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. *Ann Intern Med* 1994; 121: 953-959.
- [20] Baker R and Shaw EJ. Diagnosis and management of chronic fatigue syndrome or myalgic encephalomyelitis (or encephalopathy): summary of NICE guidance. *BMJ* 2007; 335: 446-448.
- [21] Acheson ED. The clinical syndrome variously called benign myalgic encephalomyelitis, Iceland disease and epidemic neuromyasthenia. *Am J Med* 1959; 26: 569-595.
- [22] Dowsett EG, Ramsay AM and McCartney RA. Myalgic encephalomyelitis - a persistent enteroviral infection? *Postgrad Med J* 1990; 66: 526-530.
- [23] Ramsay AM. Myalgic Encephalomyelitis and Postviral Fatigue States: The saga of Royal Free disease. The ME Association, 1988.
- [24] Carruthers BM, Jain AK, De Meirleir KL, Peterson DL, Klimas NG, Lerner AM, Bested AC, Flor-Henry P, Joshi P, Powles ACP, Sherkey JA and van de Sande MI. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Clinical Working Case Definition, Diagnostic and Treatment Protocols *J Chronic Fatigue Syndr* 2003; 11: 7-115.
- [25] Kennedy G, Abbot NC, Spence V, Underwood C and Belch JJF. The specificity of the CDC-1994 criteria for chronic fatigue syndrome: comparison of health status of three groups of patients who fulfill the criteria. *Ann Epidemiol* 2004; 14: 95-100.
- [26] Kennedy G, Spence V, Underwood C and Belch JJF. Increased neutrophil apoptosis in chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol* 2004; 57: 891-893.
- [27] Kaushik N, Fear D, Richards SCM, McDermott CR, Nuwaysir EF, Kellam P, Harrison TJ, Wilkinson RJ, Tyrrell DAJ, Holgate ST and Kerr JR. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol* 2005; 58: 826-832.
- [28] Vernon SD, Whistler T, Cameron B, Hickie IB, Reeves WC and Lloyd A. Preliminary evidence of mitochondrial dysfunction associated with post-infective fatigue after acute infection with Epstein Barr Virus. *BMC Infect Dis* 2006; 6:15: [Epub].
- [29] Kerr JR, Burke B, Petty R, Gough J, Fear D, Matthey DL, Axford JS, Dalgleish AG and Nutt DJ. Seven genomic types of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a detailed analysis of gene networks and clinical phenotypes. *J Clin Pathol* 2008; 6: 730-739.
- [30] Bell DS. *Cellular Hypoxia and Neuro-Immune Fatigue*. Livermore: WingSpan Press, 2007.
- [31] Ames BN, Atamna H and Killilea DW. Mineral and vitamin deficiencies can accelerate the mitochondrial decay of aging. *Mol Aspects Med* 2005; 26: 363-378.
- [32] Aw TY and Jones DP. Nutrient supply and mitochondrial function. *Annu Rev Nutr* 1989; 9: 229-251.
- [33] Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 359-407.

El Síndrome de Fatiga Crónica y la disfunción mitocondrial

- [34] Cohen BH and Gold DR. Mitochondrial cytopathy in adults: What we know so far. *Cleve Clin J Med* 2001; 68: 625-626, 629-642.
- [35] Bradfield P, Dodds J, Dodds J and Taylor N. *A2 Level Biology*. Pearson Education, 2002.
- [36] Schultz BE and Chan SI. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001; 30: 23-65.
- [37] Fiore C, Trezeguet V, Le Saux A, Roux P, Schwimmer C, Dianoux AC, Noel F, Lauquin GJ-M, Brandolin G and Vignais PV. The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie* 1998; 80: 137-150.
- [38] Pieczenik SR and Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol* 2007; 83: 84-92.
- [39] Paul L, Wood L, Behan WMH and Maclaren WM. Demonstration of delayed recovery from fatiguing exercise in chronic fatigue syndrome. *Eur J Neurol* 1999; 6: 63-69.
- [40] Scroop GC and Burnet RB. To exercise or not to exercise in chronic fatigue syndrome? *Med J Aust* 2004; 181: 578-580.
- [41] VanNess JM, Snell CR and Stevens SR. Diminished cardiopulmonary capacity during post-exertional malaise in chronic fatigue syndrome. *J Chronic Fatigue Syndr* 2008; 14: 77-85.
- [42] Yoshiuchi K, Cook DB, Ohashi K, Kumano H, Kuboki T, Yamamoto Y and Natelson BH. A real-time assessment of the effect of exercise in chronic fatigue syndrome. *Physiol Behav* 2007; 92: 963-968.
- [43] Newton JL, Okonkwo O, Sutcliffe K, Seth A, Shin J and Jones DEJ. Symptoms of autonomic dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Q J Med* 2007; 100: 519-526.
- [44] Bell DS. *The Doctor's Guide to Chronic Fatigue Syndrome*. New York: Da Capo Press, 1994.
- [45] McElroy WD. The energy source for bioluminescence in an isolated system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1947; 33: 342-345.
- [46] Jabs CM, Ferrell WJ and Robb HJ. Microdetermination of plasma ATP and creatine phosphate concentrations with a luminescence biometer. *Clin Chem* 1977; 23: 2254-2257.
- [47] Kricka LJ. Chemiluminescence and bioluminescence. *Anal Chem* 1995; 67: 499R-502R.
- [48] Steinberg SM, Poziomek EJ, Engelmann H W and Rogers KR. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere* 1995; 30: 2155-2197.
- [49] Turner GK. Measurement of light from chemical or biochemical reactions. In: Van Dyke K, editors. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1985. p. 43-78.
- [50] Gribble FM, Ashfield R, Ammala C and Ashcroft FM. Properties of cloned ATP-sensitive K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* 1997; 498: 87-98.
- [51] Borregaard N and Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Invest* 1982; 70: 550-557.
- [52] Samuels ML and Witmer JA. *Statistics for the Life Sciences*. Prentice Hall, 1999.
- [53] Marriage B, Clandinin MT and Glerum DM. Nutritional cofactor treatment in mitochondrial disorders. *J Am Diet Assoc* 2003; 100: 1029-1038.
- [54] Pall ML. Elevated, sustained peroxynitrite levels as the cause of chronic fatigue syndrome. *Med Hypotheses* 2000; 54: 115-125.
- [55] Richards RS, Roberts TK, McGregor NR, Dunstan RH and Butt HL. Blood parameters indicative of oxidative stress are associated with symptom expression in chronic fatigue syndrome. *Redox Report* 2000; 5: 35-41.
- [56] Zeevalk GD, Bernard LP, Song C, Gluck M and Ehrhart J. Mitochondrial inhibition and oxidative stress: Reciprocating players in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1117-1139.
- [57] Kennedy G, Spence VA, McLaren M, Hill A, Underwood C and Belch JJJ. Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 584-589.
- [58] Pall ML. *Explaining "Unexplained Illnesses"*. New York: Harrington Park Press, 2007.
- [59] Duchon MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 365-451.
- [60] Enns GM. The contribution of mitochondria to common disorders. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 11-26.
- [61] Lerner AM, Beqaj SH, Deeter RG and Fitzgerald JT. Valacyclovir treatment in Epstein-Barr virus subset chronic fatigue syndrome: thirty-six months follow-up. *In Vivo* 2007; 21: 707-713.