

**ASOCIACIÓN DE BIOMARCADORES
INMUNOLÓGICOS CON EL DIAGNÓSTICO DE LA
ENCEFALOMIELITIS MIÁLGICA-SÍNDROME DE
FATIGA CRÓNICA
(EM-SFC)**

bi:medics
ASSEM
SINDROMES DE SENSIBILIDAD CENTRAL

PROPUESTA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Investigadora Principal

Dra. Milagros García. Especialista en inmunología y patologías autoinmunes. Área de Inmunología, Hospital Clínic y Provincial de Barcelona, ASSEMBiomedics

Co-investigadores

Dra. Teresa Palencia Domínguez, Especialista en Bioquímica Clínica y patología humana, Coordinadora Médica de ASSEMBiomedics; *Dra. Anna Camps Puig*, Especialista en Medicina General, Homeópata, Máster en Inmunología, colaborado de ASSEMBiomedics; *Dra. Hilda Girón Gálvez*, Especialista en Medicina Deportiva y Judicial, colaboradora de ASSEMBiomedics; *Jose Luis Rivas*, Licenciado en Farmacia, Presidente de ASSEM (Asociación de Sanitarios al Servicio de la Encefalomiелitis Miálgica), Coordinador de ASSEMBiomedics

Coordinación

José Luis Rivas, *Farmacéutico*, ASSEMBiomedics.

Promueve ASSEM

www.asssem.org

Coordina ASSEMBiomedics.

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

biomedics@asssem.org

93 461 49 07



Resumen

En el 2012 ASSEM (Asociación de Sanitarios al Servicio de la Encefalomiелitis Miálgica/Síndrome de Fatiga Crónica), basándose en un pequeño estudio iniciado por IrsiCaixa (30) (Institut de Recerca contra la SIDA ubicado en el Hospital Germans Trias i Pujol) en el que se observaban diferencias inmunológicas características en afectados por Encefalomiелitis Miálgica/Síndrome de Fatiga Crónica, consigue de manera preliminar, reproducir y ampliar dichas determinaciones, observándose posibles perfiles inmunes que podrían ser característicos para dicha patología.

Concretamente se observa una relación entre dos marcadores de Natural Killer, el CD57 y el NKp46 nunca antes observada y que podrían corresponderse con reactivaciones virales por virus de tipo herpes.

La concreción de un/os perfil/es inmunológico/s podría servir para mejorar el diagnóstico de este tipo de enfermedades denominadas Síndromes de Sensibilidad Central (Síndrome de Fatiga Crónica, Fibromialgia y Síndrome Químico Múltiple) y como consecuencia, mejoras en el tratamiento y en la aceptación y normalización de las mismas.

La falta suficiente de apoyos y el diseño de estos resultados preliminares iniciales imposibilitaron su publicación, pero dotaron de una visión global muy importante en la concepción de este nuevo proyecto.

Es por ello que nos planteamos este nuevo reto, con pacientes y controles doblemente diagnosticados en base a criterios internacionalmente reconocidos, una batería de analíticas inmunológicas muy extensa (3.2.1) y dirigida a buscar de manera indirecta pero clara posibles reactivaciones víricas, y serologías de EBV y CMV en todos los participantes para poder tener unos resultados contrastados y robustos.

Las analíticas se llevarán a cabo en el Centro Diagnóstico Biomédico del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona (CDB), mientras que las exploraciones diagnósticas y el análisis de los resultados se realizarán en la Unidad de ASSEMBiomédics de la capital condal.

La investigadora principal del estudio es la Dra Milagros García Ormaetxea, inmunóloga del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, especialista en patologías autoinmunes, y contará con la colaboración de un equipo médico/investigador multidisciplinar en las diferentes áreas de la medicina (bioquímica clínica, patología molecular, medicina del deporte, microinmunoterapia, farmacología, etc) en calidad de coinvestigadores.

La dotación estimada para este nuevo proyecto es de 36.000 € de los cuales se disponen ya 18.000 € y por tanto faltarían recaudar 18.000 € (ver pto 7 – Memoria económica).

0.-Introducción

El sistema inmune en pacientes con EM/SFC

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).

1.- Hipótesis

El análisis de estos datos preliminares ha permitido identificar dos posibles 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 explicarse en base a la reactivación de diferentes herpes virus (CMV y EBV) que podrían afectar de manera diferente a las células Natural Killer, no observándose dichas alteraciones en alrededor de 1/3 de afectados. 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+.

2.- Objetivo

3.1 Principal:

Estudiar si determinados biomarcadores inmunológicos se asocian con el diagnóstico de la EM-SFC.

3.2 Secundarios:

1. Confirmar el diagnóstico clínico de EM-SFC.
2. Evaluar si existe una asociación entre la presencia de determinados biomarcadores y la gravedad de la EM-SFC.
3. Evaluar si existe asociación entre determinados perfiles de combinaciones de biomarcadores y subgrupos de pacientes con EM-SFC.
4. Explorar si existe correlación entre determinados biomarcadores inmunológicos y serologías víricas.

3.- Metodología

Estudio de casos y controles para el estudio de biomarcadores inmunológicos en personas con (casos) y sin (controles) diagnóstico de Encefalomielitis Miálgica-Síndrome de fatiga crónica (EM-SFC).

3.1 Predeterminación del tamaño muestral

No se ha realizado un cálculo del tamaño de la muestra formal. Éste quedará determinado de la siguiente manera:

- **Casos:** Personas **con** diagnóstico de EM-SFC. Se propondrá a todas (n=120 aproximado) las personas con diagnóstico de EM-SFC de "ASSEM" e historia clínica de su enfermedad disponible. Se estima una colaboración de un 80% de los pacientes (n=96) y una concordancia de diagnóstico entre los dos investigadores de un 80-90% (n=76-86).
- **Controles:** Personas **sin** diagnóstico de EM-SFC de la población general. Se prevé incluir una persona sin diagnóstico de EM-SFC por cada persona con diagnóstico de EM-SFC (1:1) emparejada por edad, sexo y siempre que se pueda, por entorno social.

3.2 Variables e instrumentos de medida. Análisis estadístico

3.2.1 Variables de estudio

- Diagnóstico de EM-SFC según los Criterios de Consenso Canadienses
- Biomarcadores inmunológicos:
 - ▶ Se realizará **inmunofenotipado** de las siguientes subpoblaciones inmunológicas en células sanguíneas por citometría de flujo, con protocolos diseñados para este estudio:

Linfocitos NK bright (CD16dim/- CD56 bright); NK dim (CD16bright CD56dim); Linfocitos T (CD3+CD57+); Linfocitos NKT (CD3+CD8-CD57+); Linfocitos CD8 cit (CD3+CD8+CD57-); Linfocitos CD8 sup (CD3+CD8+CD57+); Ratio CD8 (CD3+CD8+CD57)/CD8 (CD3+CD8+CD57+); Tregs; CD5 en CD8; NK CD69; NKp46; NK CD57; NKG2C; NKG2A; KIR (LT2)
 - ▶ Se realizará **determinación de anticuerpos víricos**, por la metodología habitual para el diagnóstico de infecciones víricas, de los siguientes anticuerpos en suero:
 - Ac. IgG anti-Citomegalovirus (CMV), por quimioluminiscencia
 - Ac. IgG anti- antígeno de la capsida del virus Epstein Barr (EBV VCA), por quimioluminiscencia

4.- Aspectos Éticos

Este estudio se llevará a cabo siguiendo los principios éticos básicos contenidos en la Declaración de Helsinki, adoptada por la 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013.

El estudio cuenta con la evaluación favorable de un Comité Ético Hospitalario acreditado.

La participación de los participantes en este estudio es libre, voluntaria e independiente.

El promotor y los investigadores del estudio garantizarán la confidencialidad de los datos de los sujetos y velarán porque se cumpla en todo momento con lo establecido por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

El procesamiento de los datos que el Promotor del Estudio recopile durante el estudio estará sujeto a la legalidad vigente en cuanto a la protección de datos. Los pacientes y participantes se identificarán en los registros únicamente con el número de código. Al paciente/participante se le deberá garantizar el anonimato y se le deberá informar que toda comunicación se llevará a cabo entre él y el investigador y no con el promotor del estudio.

5.- Duración prevista

La duración prevista de este estudio desde la redacción del protocolo hasta el informe final es de aproximadamente 8 a 12 meses desde su inicio previsto para Febrero-Marzo 2016

6.- Beneficios del proyecto

El poder concretar un o unos perfil/es inmunológico/s característicos para la Encefalomiелitis Miálgica/Síndrome de Fatiga Crónica (Biomarcadores) podría significar un punto de inflexión en la mejora del diagnóstico de la enfermedad (actualmente basado sólo en la sintomatología) y como consecuencia un impulso en la búsqueda de estrategias en el tratamiento farmacológico y en la normalización de estos mal denominados "síndromes".

7.- Memoria económica

Concepto	Euros
GASTOS	
1.- Gastos de personal	
Apoyo en el diagnóstico e investigación	
SUBTOTAL 1	4.000 €
2.- Gastos analíticas	
Analíticas inmunológicas e infecciosas para 200 pacientes (100 casos + 100 controles)	
SUBTOTAL 2	30.000 €
3.- Otros gastos (publicación, etc)	
SUBTOTAL 3	2.000 €
SUBTOTAL 1	36.000 €
INGRESOS	
1.- Objetivo 12.000	-12.000 €
(Se recaudaron 12.000 € para ampliar controles sanos para la Comparativa de biomarcadores de ASSEEM)	
2.- Aportación de ASSEEM	-4.000 €
3.- Lotería ¿?	-2.000 €
SUBTOTAL 2	-18.000 €
TOTAL	18.000 €

Agradecimientos

El que iniciativas como esta, surgidas e implementadas desde y para los afectados, puedan ver la luz y arrojar no sólo investigación básica en EM/SFC sino una potencial herramienta en la práctica del diagnóstico clínico, no hacen más que demostrarnos el enorme poder que tiene un colectivo afectados si se organiza y se lo propone y desde aquí agradecer todo el apoyo y difusión que se le pueda dar a este estudio de todos/as y para todos/as.

Afectuosamente,

José Luis Rivas

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.
- 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)

ASOCIACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS CON EL DIAGNÓSTICO DE LA EM-SFC

- 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 chronic 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 Highlights.* 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.