

Anomalías inmunológicas como potenciales biomarcadores en el Síndrome de Fatiga Crónica/ Encefalomiелitis Miálgica

Journal of Translational Medicine 2011, 9:81 doi:10.1186/1479-5876-9-81 - Ekuá W Brenu (ebrenu@student.bond.edu.au) Mieke L van Driel (mvandrie@bond.edu.au) Don R Staines (Don_Staines@health.qld.gov.au) Kevin J Ashton (keashton@bond.edu.au) Sandra B Ramos (sannibahia@gmail.com) James Keane (james.keane@bond.edu.au) Nancy G Klimas (smarshal@bond.edu.au) Sonya M Marshall-Gradisnik (smarshal@bond.edu.au) . *Journal of Translational Medicine* –

Enlace del artículo donde están las figuras <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/81>

Abstracto

Antecedentes

El Síndrome de Fatiga Crónica/Encefalomiелitis Miálgica (SFC/EM) se caracteriza por una fatiga severa y prolongada, y disminuciones de las funciones cognitivas y otras fisiológicas, que resultan en una severa pérdida de la calidad de vida, difícil manejo clínico y altos costes para el sistema sanitario. Hasta la fecha no hay ningún demostrado patomecanismo que explique satisfactoriamente este desorden. Estudios han identificado anomalías en la función inmune pero estos datos son inconsistentes. Hemos investigado el perfil de los marcadores del funcionamiento inmune (incluyendo marcadores nuevos) en pacientes con SFC/EM.

Métodos

Hemos incluido 95 SFC/EM pacientes y 50 controles sanos. Se valoraron todos los participantes por sus actividades citotóxicas de las células natural killer (NK) y las CD8+T, el perfil de citocinas Th1 y Th2 de las células CD4+T, la expresión del vasoactivo intestinal péptido receptor 2 (VPACR2), el nivel de los fenotipos de los NK (CD56bright y CD56dim) y las células-T reguladoras que expresan el factor de transcripción FoxP3.

Resultados

En comparación con las personas sanas, los pacientes con SFC/EM mostraban significativos incrementos de las células IL-10, IFN- γ , TNF- α , CD4+CD25+ T, FoxP3 y la expresión de la VPACR2. La actividad citotóxica de las NK y las CD8+T y los fenotipos de las NK, en particular las células NK CD56bright estaban disminuidos de manera significativa en los pacientes con SFC/EM. Adicionalmente, la expresión de la granzima A y la granzima K estaba reducida, mientras que los niveles de expresión de la perforina estaba significativamente incrementado en la población con SFC/EM en relación con la población control. Estos datos sugieren una significativa desregulación del sistema inmune en los pacientes con SFC/EM.

Conclusiones

Nuestro estudio encontró anomalías inmunológicas que pueden servir de biomarcadores en pacientes con SFC/EM con un potencial de ser aplicado como herramienta diagnóstica.

Antecedentes

El Síndrome de Fatiga Crónica/Encefalomiелitis Miálgica (SFC/EM) sigue siendo un desorden médicamente inexplicado a pesar de numerosas investigaciones científicas que se hacen en todo el mundo. Se estima que el ratio actual de prevalencia en el mundo de SFC/EM es de un 0.5% [1] con una prevalencia más alta en las mujeres en comparación con los hombres, con un ratio de hasta 6:1 [2]. El gasto anual para el tratamiento y el manejo de SFC/EM en los EEUU se estima en 319 millones de US\$, siendo el gasto directo de 7.406 US\$ por paciente [3].

Generalmente los pacientes con SFC/EM experimentan severa fatiga, alteraciones neuropsicológicas y otros síntomas estilo gripe asociados antes de conseguir un diagnóstico firme de SFC/EM [4]. Se ha observado que SFC/EM persiste durante más de seis meses durante los cuales los síntomas pueden disminuir, seguir estables o empeorar [3].

La estrategia diagnóstica actual para los profesionales de la salud se basa en la definición del caso, aunque este no es el método más ideal porque permite diagnóstico erróneo.

SFC/EM puede compartir homología con ciertos desordenes clasificados como desordenes relacionados con la fatiga, en los que las personas experimentan fatiga y uno o más de los síntomas relacionados con SFC/EM. Aparte de esto, no hay biomarcadores disponibles para afirmar el diagnóstico, complicando así el tratamiento.

Estudios basados en la población han sugerido un vínculo entre infecciones, disfunciones neurológicas y neuroinmunes y clínicas en SFC/EM [5-10].

La inmunidad ha sido ampliamente investigada en pacientes con SFC/EM, pero los resultados de estos estudios son inconsistentes, reportan diferentes cantidades de células linfocíticas y distribuciones de citocinas en pacientes con SFC/EM.

No obstante, hallazgos en inmunoglobulinas, marcadores de complementos y activación de moléculas en SFC/EM, pueden demostrar una infracción subyacente de la función inmune [8, 11, 12]. La disminuida función de los linfocitos, en particular la actividad citotóxica de las células Natural Killer (NK) en pacientes con SFC/EM en comparación con controles sanos, parece ser un hallazgo consistente [13-16]. La capacidad funcional de otras células inmunes, como las células T, y la contribución de otras moléculas en el mecanismo patofisiológico de SFC/EM, sigue sin determinarse. En particular, el papel de subgrupos de poblaciones de células CD4+T y CD8+T no ha sido estudiado del todo en SFC/EM.

Es importante que recientes datos de la distribución de citocinas en pacientes con SFC/EM apunten a un incremento de citocinas proinflamatorias lo cual sugiere la presencia de una subyacente prevalencia viral en estos pacientes [17, 18] y esto puede ir en detrimento de los procesos inflamatorios inmunes.

Es ampliamente conocido que los neuropéptidos regulan la inmunidad. Relevante entre estos son los neuropéptidos vasoactivos (VNs), específicamente el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y el polipéptido pituitario adenilato activador de la ciclasa (PACAP). Regulan y suprimen procesos inmunes proinflamatorios mediante la vía PKA/cAMP [19]. Su papel en SFC/EM sigue sin aclararse, aunque hay sugerencias de que se les puede implicar en actividades relacionadas con las células CD4+T, como la secreción de citocinas y la expresión de FoxP3 [20].

La cantidad de células inmunes no necesariamente son indicadores de estados de enfermedad, como declarado previamente se ha demostrado que son inconsistentes en SFC/EM. No obstante, la capacidad funcional de estas células durante la progresión de la enfermedad puede proporcionar una mejor comprensión del mecanismo asociado con desordenes inexplicados, como SFC/EM. Alternativamente, esto puede ayudar a identificar específicos parámetros inmunes que se pueden utilizar como marcadores diagnósticos para SFC/EM.

Este estudio explora, por esto, anomalías inmunológicas que pueden servir de biomarcadores para diagnosticar SFC/EM. Adicionalmente, este es el primer estudio que examina el papel de VNs, VIP y PACAP y la expresión de FoxP3 en SFC/EM.

Métodos

El proyecto fue revisado con un procedimiento (Expedited Review Procedure) y consiguió una beca por el Bond University Human Research Ethics Committee (BUHREC). Todos los participantes del presente estudio firmaron un consentimiento informado aprobado por el Bond University Human Research Ethics Committee (BUHREC).

Participantes

Todos los participantes, tanto los con SFC/EM como los controles no-fatigados, fueron reclutados en los estados de Queensland y New South Wales en Australia mediante los grupos de pacientes de SFC/EM, periódicos y anuncios por email para un estudio prospectivo, como casos (pacientes con SFC/EM) o como controles no-fatigados (voluntarios sanos). Los participantes eran elegibles si tenían entre 25 y 65 años. Antes de su inclusión, todos los participantes completaron un formulario de consentimiento y un cuestionario sobre el Síndrome de Fatiga Crónica basado en la definición del caso del Centre for Disease Prevention and Control (CDC 1994) [4]. Fueron excluidos del estudio, los participantes previamente diagnosticados con desordenes autoinmunes, psicosis, epilepsia, enfermedad cardiaca, o que estaban embarazadas o amamantaban.

Preparación de la muestra y mediciones rutinarias

Se tomaba una muestra de 25ml de sangre de la vena antecubital de los participantes heparinizada en litio y en tubos EDTA entre las 9am y las 11am. Las muestras de sangre se analizaban antes de 12 horas después de sacarlas. Se hacían recuentos rutinarios de sangre para las células sanguíneas rojas, los linfocitos, granulocitos y monocitos con un contador celular automático (ACT Differential Analyzer, Beckman Coulter, Miami, FL).

Valoración de la actividad citotóxica de las NK

Se aislaban las células NK de las muestras completas de sangre con Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences; Milan, Italy) density gradient centrifugation. Se valoraba, como previamente descrita la actividad citotóxica de los linfocitos de las NK [21]. Brevemente, se etiquetaban las células aisladas con 0.4% PKH-26 (Sigma, St Louis, MO). Se incubaban las células NK con células K562 como efector con un ratio diana de 25:1, durante 4 horas a 37°C en 95% aire, 5% CO₂. Se medía la apoptosis de las células tumorales mediante FACS Calibur citometría de flujo con el Cell Quest Software (Becton Dickinson (BD), San Diego, CA), con Annexin V-FITC y el reagente 7-AAD (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se calculaban los % de lisis de las células K562 como previamente descrito [21].

Valoración de la actividad citotóxica de los linfocitos CD8+T

Se aislaban las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) de las muestras completas de sangre con Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences; Milan, Italy) centrifugación gradiente de densidad. Los linfocitos CD8+T eran aislados preferencialmente de las PMBCs con el kit de aislamiento de células CD8+T (Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch-Gladbach, Germany) según las instrucciones del fabricante. En breve, se manchaban las células con un cóctel biotin-anticuerpos para células CD8+T, incubándolas durante 10 minutos y luego se teñían con un cóctel micorbead para células CD8+T durante 15 minutos. Luego se pasaban las células por columnas de separación donde se recogían las células de interés para ser analizadas a continuación. Se hacía citolisis como descrito previamente utilizando las células

P815 como células diana [22]. Resumiendo, se teñía las células P815 con 0.4% PKH-26 y se activaba con anti-CD3 (BD Bioscience, San Diego, CA). Luego se incubaban las células Diana con células CD8+T en un efector con un ratio Diana de 25: 1, durante 4 horas a 37°C en 95% de aire y 5% de CO₂. Se empleaba la citometría de flujo Annexin V-FITC para la detección de apoptosis para valorar la muerte celular de las células tumorales. Se calculaba como descrito previamente el % de la lisis de las células P815 [22].

Expresión génica en células NK y CD8+T

Aislar las células NK y CD8+T se hizo con MACS separación (Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch-Gladbach, Germany), como especificado por el fabricante. La pureza se determinaba con el citómetro de flujo mediante el software Cell Quest. Para determinar la pureza de las células NK, se revestían las células NK aisladas con anticuerpos monoclonales PE-CD56CD16 y FITC-CD3 (BD Pharmingen, San Diego, CA). Para establecer la pureza de las células CD8+T, se teñían e incubaban las células CD8+T con anticuerpos monoclonales PE-CD8 y FITC-CD3 (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se congelaban rápidamente las células en nitrógeno líquido y se mantenían congeladas a menos 80 grados para más valoraciones. Se hicieron extracciones de ARN total con el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) y se cuantificaron con el NanoDrop 3300 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Se sintetizaba el ARN en cDNA con el SuperScriptTM III First-Strand síntesis SuperMix para qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) tal como especificaba el fabricante y se almacenaba a menos 20 ° C para su análisis posterior. Se hizo RT-qPCR con IQ SYBR Green Super Mix (Bio-Rad, Hercules, CA) con *GAPDH* como housekeeping gen. Se reunieron los niveles de expresión de granzima A, granzima K, perforina e interferón (IFN)- γ (*GZMA*, *GZMK*, *PRF1* and *IFN-G*) genes y se cuantificaron con iQCyler (Bio-Rad, Hercules, CA).

Cuantificación de los fenotipos NK

Se valoró la distribución de los fenotipos de las células NK como previamente descrito [23]. Se aislaron los linfocitos de las NK de la sangre completa mediante selección negativa con RosetteSep Human Natural Killer Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, BC) y se etiquetaron con anticuerpos monoclonales CD56-FITC y CD16-PE (BD Pharmingen, San Jose, CA).

Estimulación de VPACR2

Las muestras de la sangre entera (10mL) diluidas con 1x PBS fueron distribuidas en capas sobre Ficoll-Hypaque para aislar las células mononucleares de la sangre periférica. Se estimularon las células con o sin 1 μ g de Lipopolisacarida (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron durante 48 horas. Se teñían las células con vasoactivo intestinal peptide receptor 2 (Sigma, St Louis, MO), FITC-IgG (Sigma, St Louis, MO) y anticuerpos CD4-PE antimouse monoclonales y se analizaron en el citómetro de flujo para detectar monocitos y linfocitos que expresan VPACR2 [24]. Se grababa el porcentaje de células que expresaban tanto CD4-PE, como VIP2-FITC en estas poblaciones para determinar el nivel de VPACR2 expresado en estas células. En el gate de los linfocitos se hacía específica referencia para las células CD4+T.

Determinación de citocinas

PBMCs aisladas se estimularon de manera mitogénica con 1 μ g de fitohemaglutinina y se cultivaron con una concentración de 1x10⁶ células/mL durante 72 horas. Después de la incubación, se apartaron los supernatantes y se almacenaron a -800C para una valoración posterior. Se investigaron las expresiones de citocinas de las T helper (Th)1, Th2 y Th17 con el kit citométrico bead array (BD Pharmingen, San Diego, CA) [25] para determinar los niveles de interleukina (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , INF- γ y IL-17A. Las

citocinas seleccionadas para este estudio - aunque no conclusivas – eran suficientes para determinar los mecanismos de Th1/Th2/Th17 en los pacientes con SFC.

Valoración reguladora de células T

Se determinó la expresión de FoxP3 Tregs en las células CD4+CD25+. Se tiñeron las células PBMC con anticuerpos monoclonales FITC-CD4 y APC-CD25 (BD Pharmingen, San Diego, CA) y a continuación las células se permeabilizaron y tiñeron con anti-FoxP3 y PE-Foxp3 respectivamente y se analizaron con citometría de flujo [26].

Análisis estadísticas

Se hicieron Análisis estadísticas con SPSS software versión 16.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Se requirió una muestra de 59 participantes por grupo para obtener resultados estadísticamente significativos con un tamaño de efecto de 0.5 y una fuerza de 85%. Todos los representados en este estudio se reportan como media plus orminus standard error de la media (\pm SEM). Se hicieron valoraciones comparativas entre los participantes (los sujetos con SFC/EM y los controles) con el análisis del test de variación (ANOVA) y el t-test de muestra independiente. Todos los resultados estadísticamente significativos tenían *p*-valores menos que o igual a 0.05.

Autorización ética (Ethical Clearance) y selección de participantes

La aprobación de este estudio se consiguió después de la revisión por el Comité Ético de Investigaciones Humanas de la Universidad de Bond (Bond University Human Research Ethics Committee = RO852A).

Resultados

De los 168 participantes reclutados, 95 cumplían los criterios del CDC para SFC/EM y 50 cualificaron como controles sanos. Se rechazaron 23 participantes por no cumplir los criterios de inclusión de SFC/EM (Figura 1). El 58.2% de los pacientes con SFC/EM indicaron que experimentaron 6 o más de los síntomas listados en la lista de criterios del CDC y el 21.4% solo experimentaron 4 síntomas. Las características base de los participantes son ilustradas en la Tabla 1.

Actividad citotóxica de los linfocitos

La actividad citotóxica de las NK y de las CD8+T (*n*=71), medida como la habilidad de las células NK y CD8+T para lisar efectivamente las células K562 y P815 estaba respectivamente disminuida de manera significativa (*p*< 0.05) en los pacientes con SFC/EM en comparación con los sujetos control (Figura 2). Similarmente, la expresión de la granzima A estaba disminuida de manera significativa, tanto en las células NK, como en las CD8+T en la población con SFC/EM. No obstante, la IFN- γ y la granzima K solamente estaban disminuidas en las células NK del grupo con SFC/EM en comparación con los controles sanos, como muestran Figuras 3A y 3B.

Alterados perfiles de NK en SFC/EM

Para este estudio se clasificaron los fenotipos de las NK en dos, las células CD56brightCD16- y las CD56dimCD16+NK. La cantidad de células NK que expresaban CD56brightCD16- era significativamente más baja (*p*< 0.001) en los pacientes con SFC/EM en comparación con los sujetos control (Figura 4C). Sin embargo, las células CD56dimCD16+NK estaban sin cambios en todos los grupos (Figura 4C). Los datos en bruto se presentan en 4A y 4B.

Perfil de células citocinas CD4+T y VPACR2 en SFC/EM

Después de 72 horas de cultivo, las secreciones de las citocinas Th1 y Th2 eran considerablemente diferentes entre los grupos, pero la citocina Th17 IL-17A seguía sin

cambios. No obstante, la producción de IL-10, IFN- γ y TNF- α era elevada de manera significativa en el grupo con SFC/EM en comparación con el grupo control (Figura 5).

Otras citocinas, IL-2 y IL-6, aunque incrementadas en la población con SFC/EM, no eran estadísticamente diferentes entre los grupos (Figura 5).

IL-17A era similarmente y no significativamente diferente entre dos grupos. La secreción FoxP3 por Tregs era significativamente más alta en el grupo con SFC/EM en comparación con los participantes sanos (Figura 6). Incidentalmente, los recuentos de células Treg eran también más altas en el grupo SFC/EM en comparación con la población sana (0.77 ± 0.10 vs. 0.24 ± 0.02). La expresión de linfocitos de VPACR2 era significativamente más alta en los pacientes con SFC/EM en comparación con el grupo control (Figura 7).

Discusión

Este es el primer estudio que demuestra niveles significativamente más altos de receptores VPACR2, expresión de CD4+CD25+Tregs y FoxP3+Treg en los pacientes con SFC/EM en comparación con los controles sanos. Además, los pacientes con SFC/EM tenían niveles significativamente más altos de citocinas antiinflamatorias IL-10 y proinflamatorias IFN- γ y TNF- α . Este perfil refleja una significativa e importante desregulación inmunológica que podría explicar algunos de los síntomas clínicos, por ejemplo la experiencia incesante de estar enfermo de los pacientes con SFC/EM.

Este es el primer estudio que proporciona una investigación a fondo del perfil de las células CD4+T en pacientes con SFC/EM mediante la valoración de la secreción de citocinas y de los niveles de las proteínas reguladoras, en particular los receptores VPACR2 y la expresión de FoxP3.

Las citocinas son proteínas solubles con efectos o antiinflamatorios, o proinflamatorios. Se han reportado patrones equívocos de expresión de citocinas en pacientes con SFC/EM sin una definitiva identificación respecto qué citocinas pueden estar específicamente vinculados con SFC/EM.

Posibles explicaciones de las inconsistencias en la distribución de citocinas en los estudios son la naturaleza heterogénea del desorden y las diferencias en los métodos analíticos utilizados.

No obstante, se han desarrollado ensayos más nuevos y más sensible desde que se reportaron los resultados conflictivos [17]. Se ha sugerido que el mecanismo subyacente a SFC/EM puede implicar un cambio de la producción de citocinas que lleva a un perfil de citocinas predominante Th1 o bien Th2 [27-29].

En el sistema inmune adaptivo, subgrupos de células CD4+T, Th1, Th2, Th17 y células reguladoras T (Tregs) son los reguladores más importantes de la secreción de citocinas y de la respuesta inmune inflamatoria.

En este estudio se observó una respuesta bimodal Th1/Th2. Una respuesta inmune predominante Th1 y Th17 ha sido vinculado con el desarrollo o con la presencia de una enfermedad autoinmune, mientras que incrementos de citocinas Th2 sugieren la presencia de otros desordenes sistémicos [30, 31].

Las células Th1 segregan citocinas IFN- γ y IL-2, mientras que las células Th2 segregan citocinas IL-4 y IL-10 [32] y las Th17 segregan las proinflamatorias IL-17a, IL-17f y IL-22 [33, 34].

Recientes datos sobre las redes de citocinas en SFC/EM demuestran un perfil predominante Th2/antiinflamatorio en SFC/EM, con un perfil Th1 debilitado [17].

Este estudio apoya la presencia de un posible desequilibrio de la respuesta Th1/Th2 en SFC/EM caracterizado por un significativo incremento de la IL-10, junto con significativos incrementos de IFN- γ y TNF- α . Semejantes incrementos de la IL-10 son sugestivos de un persistente estado de infección crónica y pueden ser asociados con una amortiguación de la respuesta inmune de las células NK y CD8+T [22].

Otros han demostrado que la IL-10RA se expresa de manera diferencial en pacientes con SFC/EM, destacando un potencial compromiso de la función de la IL-10 o de su receptor en pacientes con SFC/EM [35, 36].

No obstante, niveles incrementados de IL-10, IFN- γ y TNF- α indican la presencia de infección por hongos, bacterias o virus [37]. Incidentalmente, en el VIH, la elevación de IL-10, IFN- γ y TNF- α denota la presencia de una crónica infección y esto correlacionaba con la carga viral [38].

Similarmente, en el SFC, semejantes alteraciones en estas citocinas también pueden sugerir un incremento de la carga viral y la ocurrencia de síntomas estilo gripe. Un incremento de la IL-10 también puede contribuir a la disminuida actividad citotóxica observada en las células NK y CD8+T [39, 40].

El incremento de citocinas proinflamatorias, como la TNF- α , también puede dibujar la presencia de un intestino inflamado o del síndrome de colon irritable en algunos pacientes con SFC/EM [41]. La inflamación intestinal puede alterar el sistema nervioso central [42, 43] y afecta a varios mecanismos fisiológicos, incluyendo los neuropéptidos.

Los cambios, tanto en las respuestas Th1, como en las Th2, pueden sugerir cambios en la función del VN receptor VPACR2, el cual es un promotor y estimulador clave de citocinas antiinflamatorias, como las IL-10 [44].

Es importante denotar que VNs, VIP o PACAP jamás fueron valoradas previamente en SFC/EM. Estos importantes neuropéptidos incrementan la expresión génica de IL-10 mediante la vía cAMP response element DNA binding complex; por esto cambios en las VNs, como elevaciones en la VPACR2 pueden sugerir un incremento de la IL-10 [45]. Además, un incremento de la TNF- α y la IFN- γ sugieren una incapacidad del aumento de VPACR2 para suprimir la secreción de TNF- α y IFN- γ , porque se sabe que estos neuropéptidos suprimen las citocinas proinflamatorias y a la vez favorecen las secreciones de citocinas antiinflamatorias [46].

Adicionalmente, incrementos de la VPACR2 sugieren potencialmente cambios de la cAMP asociados con la respuesta inmune inflamatoria en SFC/EM. Aunque nuestro estudio no valoró los niveles de la cAMP presentes en pacientes con SFC/EM, se sabe que el sitio de unión de VIP con su receptor, en este caso VPACR2, estimula la presencia de FoxP3+ la cual asiste la regulación de la respuesta de las células T. Por esto es consistente que el aumento del nivel de la VPACR2 se traducirá en un aumento de la expresión de la FoxP3. La FoxP3+ Tregs también segrega IL-10 la cual mantiene la expresión de la FoxP3 en Tregs [47].

El incremento de la expresión de la IL-10 y la expresión relativamente más alta de la FoxP3, junto con significativos incrementos de la actividad supresora de CD4+CD25+Tregs sugiere un requerimiento para hacer frente a una significativa respuesta proinflamatoria en estos pacientes.

Aunque que no se midieron los niveles de antígenos virales en este estudio, estas observaciones pueden sugerir una plausible prevalencia de antígenos virales, adyuvantes o autoanticuerpos de la circulación periférica de los pacientes con SFC/EM [48, 49].

La actividad citotóxica de las NK en SFC/EM ha recibido mucha atención, aunque solamente un estudio ha examinado la actividad citotóxica de las células CD8+T. La mayoría de estudios han encontrado significativas disminuciones de la actividad de las NK, y solo un estudio encontró una disminuida actividad citotóxica de las células CD8+T en una población con SFC/EM en comparación con un grupo control. Estos hallazgos son confirmados en nuestro estudio. En un estudio previo [13], y en este estudio, en una población más grande, hemos encontrado que la actividad citotóxica de las NK y los fenotipos de las CD56bright NK están disminuidos en pacientes con SFC/EM. Estas respuestas citotóxicas atípicas pueden estar vinculadas con las vías de muerte celular mediadas por las granulas comprometidas que implican mediadores, perforina y granzimas apoptósicos.

La perforina forma estructuras estilo poras (“pore-like”) para facilitar la entrada de granzimas en la célula diana [50], y las granzimas activan varias vías de apoptosis que aseguran el asesinato efectivo de la célula diana [51].

Se ha demostrado que la perforina y las granzimas están disminuidas, tanto en las células NK, como en las CD8+T en SFC/EM [16, 52]. Al contrario, tanto la granzima A, como la granzima K estaban disminuidos de manera significativa, mientras que los niveles de perforina estaban elevados, tanto en las células NK, como en las CD8+T de los pacientes con SFC/EM.

Por esto la reducida actividad citotóxica puede ser un importante componente de la desregulación inmune que se ve en SFC/EM.

Conclusiones

Estos resultados ilustran que en SFC/EM hay un mecanismo inmunomodulador severamente comprometido, donde los intentos para regular o restaurar la homeostasis inmune parecen estar deteriorada.

Estos hallazgos sugieren que ciertos biomarcadores inmunológicos, como demostrado en este estudio, pueden ser únicos para SFC/EM. Hasta la fecha no se han identificado marcadores inmunológicos inmunes clínicos disponibles de manera rutinaria que caracterizan SFC/EM, resultando en un pobre reconocimiento y manejo de los pacientes.

Las anomalías inmunológicas identificadas en nuestro estudio pueden posiblemente llenar este vacío como biomarcadores potenciales y ayudar a los médicos clínicos y a los pacientes a diagnosticar y manejar esta condición debilitadora severa. Estos biomarcadores pueden incluir fenotipos de las NK, actividad de las NK, actividad de las células CD8+T, IL-10, IFN- γ TNF α , FoxP3 y VPACR2. Estos marcadores, que parecen ser únicos en los pacientes con SFC/EM podrían ayudar a identificarles como una población distinta, permitiendo una gestión clínica más apropiada e investigaciones científicas con objetivos más adecuados en relación con los patomecanismos subyacentes a esta enfermedad.

Contribuciones de los autores

Concibieron y diseñaron el experimento: EWB DRS SMMG. Realización del experimento: EWB SBR JK. Análisis de los datos: EWB. Suministro de las herramientas de análisis y los reagentes: SMMG MVD KJA. Redacción del informe: EWB DRS SMMG MVD. Revisión del informe de manera crítica: SMMG, KJA, MVD, DRS, NGK. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito completo.

Intereses de competencia

A nuestro leal saber, los autores querrán declarar que no tienen intereses de competencia.

Agradecimientos

Agradecemos a Prof. Chris Del Mar y a Dr. Paul Glasziou por su inestimable contribución y feedback al trabajo aquí presentado. También queremos agradecer a la Fundación Mason, la Fundación Hunter y el gobierno de Queensland por su contribución financiera a esta investigación.

Tabla 1. Características de los participantes de este estudio

Parámetros medidos	SFC (n=95)	Controles (n=50)	Valores p
Sexo	Femenino 70,5%	Femenino 57,7%	
	Masculino 29,5%	Masculino 42,3%	
Prom. Edad	46,47±11,7	41,9±9,6	0,11
Altura (cm)	167,47±13,2	167,9±8,9	0,16
Peso (libras)	169,8±140,7	159,8±46,5	0,11
Glóbulos Blancos	5,8±1,4	6,3±1,8	0,68
Linfocitos (%)	38±5,7	33,6±7,9	0,03
Monocitos (%)	5,90±1,4	5,6±2,2	0,30
Granulocitos (%)	56,3±7,1	60,8±8,2	0,06
Linfocito (x10 ³ /μL)	2,3±0,8	2,03±0,6	0,24
Monocitos (x10 ³ /μL)	0,8±4,2	0,34±0,2	0,51
Granulocitos (x10 ³ /μL)	3,3±1,0	3,87±1,5	0,21
Glóbulos Rojos (x10 ⁶ /μL)	4,3±0,5	4,56±0,4	0,08
Hemoglobina (g/L)	131,6±12,4	137,0±11,7	0,15

Referencias

- Grinde B: **Is chronic fatigue syndrome caused by a rare brain infection of a common, normally benign virus?** *Med Hypotheses* 2008, **71**(2):270-274.
- Devanur LD, Kerr JR: **Chronic fatigue syndrome.** *J Clin Virol* 2006, **37**(3):139-150.
- Jason LA, Benton MC, Valentine L, Johnson A, Torres-Harding S: **The Economic impact of ME/CFS: Individual and societal costs.** *Dyn Med* 2008, **7**:6.
- Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, Komaroff A: **The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study.** *International Chronic Fatigue Syndrome Study Group.* *Ann Intern Med* 1994, **121**(12):953-959.
- Arnett SV, Alleva LM, Korossy-Horwood R, Clark IA: **Chronic fatigue syndrome – A neuroimmunological model.** *Med Hypotheses* 2011.
- Biswal B, Kunwar P, Natelson BH: **Cerebral blood flow is reduced in chronic fatigue syndrome as assessed by arterial spin labeling.** *J Neurol Sci* 2011, **301**(1-2):9-11.
- Lakhan SE, Kirchgessner A: **Gut inflammation in chronic fatigue syndrome.** *Nutr Metab (Lond)* 2010, **7**:79.
- Lorusso L, Mikhaylova SV, Capelli E, Ferrari D, Ngonga GK, Ricevuti G: **Immunological aspects of chronic fatigue syndrome.** *Autoimmun Rev* 2009, **8**(4):287-291.
- Natelson BH, Weaver SA, Tseng CL, Ottenweller JE: **Spinal fluid abnormalities in patients with chronic fatigue syndrome.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, **12**(1):52-55.
- Schutzer SE, Angel TE, Liu T, Schepmoes AA, Clauss TR, Adkins JN, Camp DG, Holland BK, Bergquist J, Coyle PK Smith, RD, Fallon, BA, Natelson, BH: **Distinct cerebrospinal fluid proteomes differentiate post-treatment Lyme disease from chronic fatigue syndrome.** *PLoS One* 2011, **6**(2):e17287.

11. Sorensen B, Jones JF, Vernon SD, Rajeevan MS: **Transcriptional control of complement activation in an exercise model of chronic fatigue syndrome.** *Mol Med* 2009, **15**(1-2):34- 42.
12. Nijs J, van Eupen I, Vandecauter J, Augustinus E, Bleyen G, Moorkens G, Meeus M: **Can pacing self-management alter physical behavior and symptom severity in chronic fatigue syndrome? A case series.** *J Rehabil Res Dev* 2009, **46**(7):985-996.
13. Brenu EW, Staines DR, Baskurt OK, Ashton KJ, Ramos SB, Christy RM, Marshall-Gradisnik SM: **Immune and hemorheological changes in chronic fatigue syndrome.** *J Transl Med* 2010, **8**:1.
14. Fletcher MA, Zeng XR, Maher K, Levis S, Hurwitz B, Antoni M, Broderick G, Klimas NG: **Biomarkers in chronic fatigue syndrome: evaluation of natural killer cell function and dipeptidyl peptidase IV/CD26.** *PLoS One* 2010, **5**(5):e10817.
15. Klimas NG, Salvato FR, Morgan R, Fletcher MA: **Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome.** *J Clin Microbiol* 1990, **28**(6):1403-1410.
16. Maher KJ, Klimas NG, Fletcher MA: **Chronic fatigue syndrome is associated with diminished intracellular perforin.** *Clin Exp Immunol* 2005, **142**(3):505-511.
17. Broderick G, Fuite J, Kreitz A, Vernon SD, Klimas N, Fletcher MA: **A formal analysis of cytokine networks in Chronic Fatigue Syndrome.** *Brain Behav Immun* 2010, **In Press**.
18. Kuratsune H: **[Overview of chronic fatigue syndrome focusing on prevalence and diagnostic criteria].** *Nippon Rinsho* 2007, **65**(6):983-990.
19. Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martinez C: **VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1070**:51-74.
20. Staines DR: **Is chronic fatigue syndrome an autoimmune disorder of endogenous neuropeptides, exogenous infection and molecular mimicry?** *Med Hypotheses* 2004, **62**(5):646-652.
21. Aubry JP, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, Jeannin P, Herbault N, Caron G, Moine V, Bonnefoy JY: **Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity.** *Cytometry* 1999, **37**(3):197-204.
22. White L, Krishnan S, Strbo N, Liu H, Kolber MA, Lichtenheld MG, Pahwa RN, Pahwa S: **Differential effects of IL-21 and IL-15 on perforin expression, lysosomal degranulation, and proliferation in CD8 T cells of patients with human immunodeficiency virus-1 (HIV).** *Blood* 2007, **109**(9):3873-3880.
23. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA: **Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset.** *Blood* 2001, **97**(10):3146-3151.
24. Sun W, Hong J, Zang YC, Liu X, Zhang JZ: **Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis.** *Int Immunol* 2006, **18**(12):1691-1700.
25. Collins DP, Luebering BJ, Shaut DM: **T-lymphocyte functionality assessed by analysis of cytokine receptor expression, intracellular cytokine expression, and femtomolar detection of cytokine secretion by quantitative flow cytometry.** *Cytometry* 1998, **33**(2):249-255.
26. Okwor I, Muleme H, Jia P, Uzonna JE: **Altered proinflammatory cytokine production and enhanced resistance to Trypanosoma congolense infection in lymphotoxin beta-deficient mice.** *J Infect Dis* 2009, **200**(3):361-369.
27. Skowera A, Cleare A, Blair D, Bevis L, Wessely SC, Peakman M: **High levels of type 2 cytokine-producing cells in chronic fatigue syndrome.** *Clin Exp Immunol* 2004, **135**(2):294-302.
28. Swanink CM, Vercoulen JH, Galama JM, Roos MT, Meygaard L, van der Ven-Jongekrijg J, de Nijs R, Bleijenberg G, Fennis JF, Miedema F, van der Meer, JW: **Lymphocyte subsets, apoptosis, and cytokines in patients with chronic fatigue syndrome.** *J Infect Dis* 1996, **173**(2):460-463.
29. Nakamura T, Schwander SK, Donnelly R, Ortega F, Togo F, Broderick G, Yamamoto Y, Cherniack NS, Rapoport D, Natelson BH: **Cytokines across the night in chronic fatigue syndrome with and without fibromyalgia.** *Clin Vaccine Immunol*, **17**(4):582-587.
30. Drulovic J, Savic E, Pekmezovic T, Mesaros S, Stojavljevic N, Dujmovic-Basuroski I, Kostic J, Vasic V, Stojkovic MM, Popadic D: **Expression of T(H)1 and T(H)17 cytokines and transcription factors in multiple sclerosis patients: Does baseline T-Bet mRNA predict the response to interferon-beta treatment?** *J Neuroimmunol* 2009, **215**(1-2):90-95.
31. Nevala WK, Vachon CM, Leontovich AA, Scott CG, Thompson MA, Markovic SN: **Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(6):1931-1939.

32. Zhu J, Paul WE: **CD4 T cells: fates, functions, and faults.** *Blood* 2008, **112**(5):1557-1569.
33. Paust HJ, Turner JE, Steinmetz OM, Peters A, Heymann F, Holscher C, Wolf G, Kurts C, Mittrucker HW, Stahl RA, Kurts, C, Panzer, U: **The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(5):969-979.
34. Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S, Moles JP, Danger Y, Ravon E, Lesaux S, Yssel, H, Gascan, H: **Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes.** *J Immunol* 2008, **180**(11):7423-7430.
35. Kaushik N, Fear D, Richards SC, McDermott CR, Nuwaysir EF, Kellam P, Harrison TJ, Wilkinson RJ, Tyrrell DA, Holgate ST, Kerr, JR: **Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome.** *J Clin Pathol* 2005, **58**(8):826-832.
36. Kerr JR: **Gene profiling of patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis.** *Curr Rheumatol Rep* 2008, **10**(6):482-491.
37. Couper KN, Blount DG, Riley EM: **IL-10: the master regulator of immunity to infection.** *J Immunol* 2008, **180**(9):5771-5777.
38. Norris PJ, Pappalardo BL, Custer B, Spotts G, Hecht FM, Busch MP: **Elevations in IL-10, TNF-alpha, and IFN-gamma from the earliest point of HIV Type 1 infection.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006, **22**(8):757-762.
39. den Haan JM, Kraal G, Bevan MJ: **Cutting edge: Lipopolysaccharide induces IL-10- producing regulatory CD4+ T cells that suppress the CD8+ T cell response.** *J Immunol* 2007, **178**(9):5429-5433.
40. Szkaradkiewicz A, Karpinski TM, Drews M, Borejsza-Wysocki M, Majewski P, Andrzejewska E: **Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer.** *J Biomed Biotechnol*, **2010**:901564.
41. Scully P, McKernan DP, Keohane J, Groeger D, Shanahan F, Dinan TG, Quigley EM: **Plasma cytokine profiles in females with irritable bowel syndrome and extra-intestinal co-morbidity.** *Am J Gastroenterol*, **105**(10):2235-2243.
42. Goehler LE, Lyte M, Gaykema RP: **Infection-induced viscerosensory signals from the gut enhance anxiety: implications for psychoneuroimmunology.** *Brain Behav Immun* 2007, **21**(6):721-726.
43. Lakhan SE, Kirchgessner A: **Gut inflammation in chronic fatigue syndrome.** *Nutr Metab (Lond)*, **7**:79.
44. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D: **Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies.** *J Immunol* 1999, **162**(3):1707-1716.
45. Pozo D, Delgado M, Martinez M, Guerrero JM, Leceta J, Gomariz RP, Calvo JR: **Immunobiology of vasoactive intestinal peptide (VIP).** *Immunol Today* 2000, **21**(1):7-11.
46. Pozo D, Delgado M: **The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide?** *FASEB J* 2004, **18**(12):1325-1334.
47. Gonzalez-Rey E, Delgado M: **Vasoactive intestinal peptide and regulatory T-cell induction: a new mechanism and therapeutic potential for immune homeostasis.** *Trends Mol Med* 2007, **13**(6):241-251.
48. Nancy AL, Shoenfeld Y: **Chronic fatigue syndrome with autoantibodies--the result of an augmented adjuvant effect of hepatitis-B vaccine and silicone implant.** *Autoimmun Rev* 2008, **8**(1):52-55.
49. Buskila D, Atzeni F, Sarzi-Puttini P: **Etiology of fibromyalgia: the possible role of infection and vaccination.** *Autoimmun Rev* 2008, **8**(1):41-43.
50. Scott GB, Meade JL, Cook GP: **Profiling killers; unravelling the pathways of human natural killer cell function.** *Brief Funct Genomic Proteomic* 2008, **7**(1):8-16.
51. Chowdhury D, Lieberman J: **Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death.** *Annu Rev Immunol* 2008, **26**:389-420.
52. Saiki T, Kawai T, Morita K, Ohta M, Saito T, Rokutan K, Ban N: **Identification of marker genes for differential diagnosis of chronic fatigue syndrome.** *Mol Med* 2008, **14**(9- 10):599-607.

Figuras

Figura 1. Proceso de selección para los grupos experimentales.

Los participantes del presente proyecto fueron agrupados en SFC/EM, o grupos control no fatigados, en base a la definición de criterios de síntomas de caso CDC 1994. Los participantes, es decir, tanto los SFC/EM, como los controles no fatigados, consistían en hombres y mujeres seleccionados mediante anuncios y grupos de apoyo de SFC/EM. Los controles no fatigados fueron aleatoriamente seleccionados en la población general mediante anuncios en periódicos y emails. El esquema de flujo arriba ilustra el proceso utilizado para generar la población final de la investigación.

Figura 2. Reducida función lítica de células citotóxicas en SFC/EM.

La valoración *In vivo* de la lisis de las células NK y CD8+T (actividad citotóxica) de las células tumorales en líneas K562 y P815 respectivamente en SFC/EM (barras negras) en comparación con controles (barras blancas). La actividad lítica es representada como por ciento (%) de lisis en el eje y. *Denota resultados estadísticamente significativos. Datos presentados como media \pm SEM.

Figura 3. Expresión mRNA de moléculas citotóxicas en células NK y CD8+T.

La transcriptasa reversa cuantitativa (RT)-PCR demostró la relativa expresión de granzima A, granzima K, perforina y IFN- γ en las células NK (A) y CD8+T (B). En las células NK y CD8+T los niveles de expresión celular de *GZMA*, *GZMK* y *IFN-G* estaban disminuidas en SFC/EM (barras negras) en comparación con los controles (barras blancas). La *PRF1* estaba sin embargo incrementada en el grupo SFC. *Denota resultados estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$). Datos presentados como media \pm SEM.

Figura 4. Distribución de fenotipos de NK.

Los fenotipos de las NK que fueron examinados están denotados como NK Bright (CD56brightCD16-) o NK Dim (CD56dimCD16+). (A). Los box plots representan los datos brutos de células NK Bright en ambos grupos. Los pacientes con SFC/EM estaban más disminuidos en la cantidad de células para este particular fenotipo de NK. (B).

Sin embargo, los datos brutos de células CD56dimCD16+ NK que fueron examinados en los grupos control y SFC/EM, se encontraron similar. (C). Se dedujeron los recuentos totales de las células NK utilizando los datos brutos de los resultados de la citometría de flujo. Tramando estas mediciones con las barras de los gráficos, las células CD56brightCD16-NK están más reducidas en el grupo SFC/EM (barras negras) en comparación con los controles barras blancas). *Denota resultados estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$). Datos presentados como media \pm SEM.

Figura 5. Examen de niveles de expresión de citocinas relacionadas con células CD4+T en SFC/EM después de estimulación mitogénica.

Células CD4+T, niveles de citocinas Th1, Th2 y Th17 en SFC/EM (barras negras) y participantes control (barras blancas) medidas después de estimulación mitogénica con PHA. Las concentraciones de las citocinas se midieron en pg/mL. Tanto las citocinas antiinflamatorias (IL-10), como las proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α) estaban incrementadas en el grupo SFC/EM después de la estimulación mitogénica. *Resultados estadísticamente significativos con $p < 0.05$. Datos presentados como media \pm SEM.

Figura 6. Expresión FoxP3 y células CD4+CD25+T en SFC/EM.

El porcentaje de células CD4+T que expresa marcadores CD4+CD25+FoxP3+ está representado en el gráfico de barras. Tregs de interés en este estudio fueron los positivos para FoxP3 e CD4+CD25+ en SFC/EM (barras negras) y participantes control (barras blancas). *Resultados estadísticamente significativos con $p < 0.05$. Datos presentados como media \pm SEM.

Figura 7. Células inmunes VPAC2R en SFC/EM.

Se valoró la expresión VPAC2R en las células CD4+T en SFC/EM (barras negras) y en controles (barras blancas). Los datos presentados aquí están basados en los porcentajes de células positivas para CD4 y VPAC2R. *Resultados estadísticamente significativos con $p < 0.05$. Datos presentados como media \pm SEM.