

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA**

**SAN VICENTE MÁRTIR**



**Título de la tesis: Identificación de biomarcadores  
del Síndrome de Fatiga Crónica/Encefalomiелitis  
Miálgica en sangre periférica**

**PRESENTADA POR: D. Eloy Almenar Pérez**

**DIRIGIDA POR: Dra. Elisa Oltra García**

**AÑO DE DEFENSA: 2021**

Título de la tesis: Identificación de biomarcadores del Síndrome de Fatiga Crónica /Encefalomiелitis Miálgica en sangre periférica.

Nombre del autor: Eloy Almenar Pérez

Directora: Dra Elisa Oltra García

Número de páginas de la tesis completa: 340

Los primeros indicios del Síndrome de Fatiga Crónica/Encefalomiелitis Miálgica se remontan al año 1934, cuando se registró un brote de casos de una enfermedad sin identificar. Todos los pacientes presentaban una sintomatología similar, destacando malestar general, dolor muscular y de los ganglios linfáticos, así como signos de encefalomiелitis. Inicialmente se presumió que estos casos se debían a brotes de poliomielitis, pero al no detectarse la presencia de este virus en ninguno de los pacientes, se determinó que debía tratarse de una nueva enfermedad a la que acuñaron como Neuromiastenia epidémica.

En años posteriores el Royal Free Hospital de Londres, reportó un aumento significativo de casos de una enfermedad desconocida hasta ese momento, sin poderse identificar su foco. La sintomatología era muy variada, destacando malestar general, dolor de los nódulos linfáticos y dolor de garganta, así como signos de encefalomiелitis comunes entre todos los pacientes. Estos síntomas guardaban una alta similitud con la Neuromiastenia epidémica, pero al no poder vincular directamente ambas enfermedades, se concluyó que debía tratarse de una nueva enfermedad a la que denominaron como Encefalomiелitis Miálgica Benigna.

Al no identificarse los factores desencadenantes de esta enfermedad, ni explicaciones fisiológicas que acreditaran los síntomas reportados por los pacientes, la Sociedad Europea de Psiquiatría propuso que el origen de esta enfermedad debía ser psicológico, aconsejando la derivación de estos pacientes a especialistas en este campo. Esta propuesta acabó siendo aceptada por gran parte de la comunidad médica, debido en gran parte a la necesidad de dar una explicación clínica a esta enfermedad. Sin embargo acabó derivando en la estigmatización de la enfermedad, así como en notables retrasos de su investigación.

En contraposición a este enfoque, científicos como el Doctor Melvin Ramsay, firme defensor de la tesis de que la aparición de esta enfermedad estaba vinculada a procesos biológicos que aún no habían sido identificados, y que rechazaban lo expuesto por la Sociedad Europea de Psiquiatría, siguieron trabajando con la finalidad de identificar factores clave de esta enfermedad que pudieran ser empleados para diagnosticarla. Estos esfuerzos dieron sus frutos en el año 1986 con la publicación de la primera definición de la enfermedad. El susodicho documento recogía datos que indicaban que la Encefalomiелitis Miálgica (EM), nombre con la que se denominó a esta enfermedad, se trataba de una forma única de fatiga muscular originada por el mínimo esfuerzo. Entre los síntomas

característicos destacaban dolor de garganta y ganglios linfáticos, dolor de cabeza, mialgias y artralgias de duración indeterminada.

Al mismo tiempo que el Dr. Ramsay publicaba este documento, en EEUU se detectó un aumento de casos de una enfermedad sin identificar, caracterizada por una fatiga crónica altamente debilitante acompañada de un gran espectro de síntomas. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades estadounidense, alarmado por esta situación, impulsó una investigación profunda de esta nueva enfermedad. Los resultados mostraron que se trataba de brotes de EM. Los norteamericanos aconsejaron la redefinición de la enfermedad, y una nueva nomenclatura: Síndrome de Fatiga Crónica (SFC), por constituir una descripción más neutral de la sintomatología asociada a la misma. Pero como en gran parte de Europa ya se la conocía como EM, se decidió aunar ambas nomenclaturas, emergiendo de esta manera el término Síndrome de Fatiga Crónica/Encefalomiелitis Miálgica (SFC/EM), que ha sido aceptado por la mayor parte de la comunidad médica a nivel global.

La sintomatología asociada con el SFC/EM es muy diversa, siendo las alteraciones del sistema inmune las más estudiadas. Destaca una inflamación crónica y generalizada, alteraciones en el patrón de inmunoglobulinas, cambios en la actividad de las células NK, así como, estados de hiperestimulación inmune que acaban generando procesos de autoinmunidad. Así mismo, también se han reportado alteraciones del Sistema Nervioso Central (SNC) y del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, anomalías metabólicas y de la microbiota intestinal.

Actualmente, existen un total de veinte criterios diferentes para realizar el diagnóstico de esta enfermedad, entre los cuales los criterios de Fukuda y los del Consorcio Canadiense, con su última actualización en el 2010, son los más utilizados. Todos estos criterios están basados en aspectos clínicos, dada la falta de biomarcadores validados de esta enfermedad.

El objetivo principal de este trabajo es la identificación de biomarcadores en sangre periférica de pacientes de SFC/EM severos con la finalidad de desarrollar futuros test diagnósticos de carácter objetivable. Para dar respuesta a este objetivo se ha evaluado el patrón de microARNs en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y en vesículas extracelulares (VEs) de plasma sanguíneo. Además también se han estudiado las características físico-químicas de estas VEs.

Con la finalidad de minimizar la variabilidad vinculada al diagnóstico de esta enfermedad y a la heterogeneidad poblacional, en la primera parte de este trabajo se analizaron un total de 30 muestras (15 por grupo) procedentes de un único

Biobanco: el biobanco monográfico ME UK de Londres. Las muestras incluidas en el estudio constaron de 30 muestras de CMSP (15 por grupo) y 60 muestras de plasma pobre en plaquetas (30 por grupo).

La caracterización de la población analizada reflejó que los pacientes participantes en este trabajo se caracterizaban por mostrar una clara afectación del componente físico sobre el psicológico, tal como indicaban los resultados de los cuestionarios SF-36, GHQ-28, los cuestionarios de Escala de Severidad de la Fatiga, Escala Visual Analógica para el dolor y el cuestionario de Somnolencia de Epworth, empleados para completar el diagnóstico. Todos ellos mostraron que los pacientes participantes en este estudio se caracterizaban por presentar fatiga severa, una percepción del dolor moderada-alta y no presentar trastornos del sueño.

Las analíticas de sangre completa de los participantes solamente mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los niveles plasmáticos de la proteína Creatina fosfoquinasa, pudiéndose identificar una tendencia ( $p < 0,1$ ) en otras variables como el aumento de los niveles de la fosfatasa alcalina y la hormona T4, y una reducción del número de eosinófilos.

La evaluación de la expresión de los microARNs en las CMSPs y en las VEs reflejó un bajo número de microARNs que superasen los filtros establecidos, ya que de los 800 microARNs analizados solamente un 11% en CMSPs y un 19 % en VEs los superaron, hecho que podía deberse a que el nCounter Human microRNA panel v3, incluye un número limitado de sondas, por lo que muchos de los microARNs expresados en CMPS y VEs podrían no estar presentes en este panel, constituyendo una limitación al estudio. Comparando los microARNs que superaron los filtros entre ambos grupos se pudo observar que un total de 49 microARNs se hallaban presentes en ambas fracciones, mientras que 42 eran exclusivos de la fracción de CMSP y 101 de la fracción de VEs.

El análisis de expresión diferencial de microARNs en CMSPs arrojó un total de 17 microARNs diferencialmente expresados entre los que los microARNs hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-4516, hsa-miR-340-5p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-106a-5p & hsa-miR-17-5p y hsa-miR-106b mostraban unos niveles de expresión mayores en el grupo de pacientes y los microARNs hsa-miR-644a, hsa-miR-451a, hsa-miR-4454 & hsa-miR-7975, hsa-miR-549a, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-1253 y hsa-miR-590-5p mostraban niveles más bajos de expresión en este grupo. El análisis de la capacidad discriminante de estos microARNs mostró que de entre los 17 microARNs diferencialmente expresados, solamente 14 mostraban unos valores de Área bajo la curva (AUC) superiores a 0,75, siendo los microARNs hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-4516 y hsa-

miR-340-5p los que mayor capacidad discriminante mostraban. Con respecto a la sensibilidad y especificidad de estas variables, todos ellos presentaron unos valores de sensibilidad bajos, oscilando entre el 46 al 55%, mientras que los valores de especificidad fueron altos, oscilando entre el 73 al 100%.

Con respecto al análisis de expresión diferencial de microARNs en VEs, se identificaron un total de 10 microARNs con diferencias en el patrón de expresión entre ambos grupos. Entre ellos los microARNs hsa-miR-4454 & hsa-miR-7975, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-347a-5p y hsa-miR-130a-3p mostraron niveles elevados de expresión en el grupo de pacientes y los microARNs hsa-miR-183-3p y hsa-miR-33a-5p mostraron bajos niveles de expresión en este grupo. Tras analizar la capacidad discriminante de estos microARNs solamente 7 presentó valores de AUC superiores a 0,75, siendo los microARNs hsa-miR-4454 y hsa-miR-7975 los que mostraron una mejor capacidad discriminante. Como en el caso de los microARNs diferencialmente expresados en CMSPs, tras analizar la sensibilidad y especificidad de estas variables, se pudo identificar niveles bajos de sensibilidad entorno al 50%, mientras que la especificidad fue elevada, oscilando entre el 77 al 100%.

Para tratar de interpretar el significado biológico del patrón de microARNs identificado, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de los genes potencialmente regulados por estos microARNs. Este análisis que se realizó separando los microARNs sobrerrepresentados de los infrarrepresentados con la finalidad de comprobar más adecuadamente el posible efecto funcional de cada grupo. Sorprendentemente tras realizar este análisis se pudo identificar un conjunto de rutas celulares comunes a todos ellos, entre las que destacaron rutas celulares relacionadas con la señalización mediada por NTRKs, el silenciamiento post-traducciona mediado por ARNs de pequeño tamaño, así como un gran conjunto de rutas celulares relacionadas con la acción de la proteína MECP2. La afectación de estas rutas, interesantemente, podría explicar parte de la sintomatología asociada con el SFC/EM.

Para tratar de validarla afectación de estas rutas celulares se seleccionaron genes clave de todas ellas y se, analizaron sus niveles de expresión en las muestras de CMSP de estos mismos pacientes mediante RT-qPCR. En concreto se midieron los niveles de expresión de los genes NTRK1, AGO2 y MECP2. Los resultados mostraron cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en sus niveles de expresión, confirmando la sospecha de afectación de todas estas rutas celulares.

Los resultados obtenidos en esta parte de proyecto han permitido la identificación de un patrón de microARNs específico de SFC/EM severo en ambas fracciones. MicroARNs que podrían ser utilizados como biomarcadores de la

enfermedad una vez validados poblacionalmente. Así mismo, los análisis de enriquecimiento funcional, han mostrado la afectación de un conjunto de rutas celulares que podrían explicar qué procesos biológicos desencadenan la aparición de los síntomas de la enfermedad, siendo de gran utilidad para la búsqueda de agentes desencadenantes y la exploración de tratamientos farmacológicos.

Con respecto a la caracterización fisicoquímica de las VEs derivadas del plasma pobre en plaquetas de los pacientes de SFC/EM, inicialmente no se observaron cambios significativos ( $p$ valor $<0,05$ ) en su abundancia, pero sí en su tamaño medio y en la electronegatividad de sus membranas, con respecto al grupo control, siendo los valores de ambos parámetros inferiores en el grupo de pacientes. Tras reanalizar las muestras añadiendo un pretratamiento con proteinasa K, dirigido a eliminar posibles proteínas plasmáticas contaminantes, se comprobó que el grupo de pacientes de SFC/EM presentaba un aumento significativo del número de vesículas en el plasma, además de confirmar los cambios previamente identificados, con respecto al tamaño medio y la electronegatividad de estas partículas. Siendo la interpretación que en el protocolo que obvia el tratamiento con proteinasa K limita el aislamiento de vesículas, posiblemente debido a la interferencia de proteínas abundantes como la albúmina en el proceso.

Tras analizar la capacidad discriminante de estas características, se pudo comprobar que todas ellas presentaban unos valores de AUC superiores a 0,75, siendo más significativos en las muestras que incluyeron pretratamiento con proteinasa K. Tras analizar la sensibilidad y especificidad de estas variables se concluyó que este grupo de variables presentaban bajos niveles de sensibilidad, entorno al 50%, mientras los niveles de especificidad fueron altos oscilando entre 72 al 100%; siguiendo tendencias similares a las previamente identificadas en los microARNs.

Para tratar de dar una explicación biológica a los cambios hallados en la caracterización fisicoquímica de las VEs, en especial a los cambios en la electronegatividad de sus membranas, se analizaron las VEs mediante espectroscopia Raman. Metodología que permitiría identificar cambios en la composición básica de estas partículas a modo de huella molecular. Los resultados sugirieron cambios en la abundancia relativa de ciertos compuestos presentes en la membrana plasmática de estas partículas que podrían alterar la función biológica de estas partículas.

Por último, se analizó la actividad biológica de las VEs de los pacientes de SFC/EM, siguiendo la metodología basada en el sistema MitoXpress-Intra Intracellular Oxygen Assay, sistema que permite monitorizar cambios en el

metabolismo de las células producidos por agentes externos. Para esta parte del estudio se reclutó una segunda cohorte de pacientes, dada la imposibilidad de obtener muestras adicionales de la misma cohorte inicial del estudio. La nueva colección de muestras se obtuvo de participantes locales diagnosticados con los mismos criterios aplicados en UK y fue procesada siguiendo los mismos métodos que utiliza el Biobanco monográfico en Reino Unido.

Inicialmente, se ensayó el efecto que producía el PPP sobre el metabolismo celular. Fue interesante observar que el tratamiento PPP producía un efecto sobre el metabolismo celular de la línea sensora, independientemente del plasma utilizado. Tras comparar el efecto entre ambos grupos, se identificaron diferencias claras en la cinética de consumo de oxígeno de las células que recibieron el plasma del grupo control con respecto a las que recibieron el plasma del grupo de pacientes, confirmando cambios en la composición del plasma de los pacientes de SFC/EM.

Tras comprobar que el PPP de los pacientes de SFC/EM produce cambios en el metabolismo de las células sensoras, se repitieron los ensayos, esta vez tratando las células directamente con las VEs derivadas del PPP. Como resultado se pudo observar que el tratamiento con VEs producía un efecto similar sobre el metabolismo celular al previamente identificado con el plasma completo, indicando cambios funcionales de estas partículas en los enfermos.

Los hallazgos de esta segunda etapa del trabajo muestran cambios en las características fisicoquímicas de las VEs del PPP de los pacientes de SFC/EM con un efecto ligado a su actividad biológica. En este sentido, estos resultados constituyen un avance en la identificación de la naturaleza del “factor plasmático” vinculado al plasma de los pacientes SFC/EM descrito con anterioridad por otros autores, pudiendo ser las VEs los agentes de este factor.

A modo de conclusión, este trabajo ha identificado cambios en el patrón de expresión de microARNs en CMSP y VEs de pacientes severos de SFC/EM, con capacidad discriminante aceptable. El análisis de enriquecimiento funcional de los genes diana de estos microARNs, muestra la afectación de ciertas rutas celulares cuya alteración, validada mediante RT-qPCR, puede vincularse con parte de la sintomatología asociada a esta enfermedad.

La caracterización de las VEs derivadas del PPP de los pacientes de SFC/EM arroja cambios en el número, tamaño y electronegatividad de las VEs de los pacientes de SFC/EM severos, variables que así mismo mostraron una aceptable capacidad discriminante. Los cambios de la composición de estas vesículas evidenciados por espectroscopia Raman pueden posiblemente explicar



las diferencias metabólicas asociadas tal como revelan los ensayos funcionales MitoXpress. Validar los hallazgos de este estudio poblacionalmente y estudiar su asociación con el nivel de afectación de la enfermedad son tareas a completar por estudios de continuación.