



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA
SAN VICENTE MÁRTIR**

**ESTUDIO CORRELACIONAL DE INFECCIONES VIRALES Y
ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO INNATO
EN PACIENTES DE FIBROMIALGIA Y SÍNDROME DE
FATIGA CRÓNICA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA**

TESIS DOCTORAL Presentada por:

Dña. MARÍA GARCÍA ESCUDERO

DIRIGIDA POR:

Dra. Dña. ELISA OLTRA GARCÍA

Dr. D. GERMÁN CERDÁ OLMEDO

AÑO DE DEFENSA: 2014



Dra. ELISA OLTRA GARCIA,

Profesora del Grado de Medicina, Facultad de Medicina UCV.

Dr. GERMÁN CERDÁ OLMEDO,

Decano Facultad de Medicina y Odontología UCV.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral titulada ESTUDIO CORRELACIONAL DE INFECCIONES VIRALES Y ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO INNATO EN PACIENTES DE FIBROMIALGIA Y SÍNDROME DE FATIGA CRÓNICA DE LA COMUNIDAD VALENCIANA ha sido realizada bajo su dirección en el Programa de Doctorado INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO por Dña. MARÍA GARCÍA ESCUDERO para la obtención del título de Doctor por la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

Para que así conste a los efectos legales oportunos, se presenta esta tesis doctoral y se extiende la presente certificación en Valencia a 24 de Enero de 2014.

Fdo.: Dra. Dña. Elisa Oltra García

Fdo.: Dr. D. Germán Cerdá Olmedo

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo José Manuel por sus ánimos, paciencia y apoyo incondicional.

A mis hijos por su tiempo y sus sonrisas en los momentos más difíciles.

A mi directora la Dra. Elisa Oltra por su valiosa ayuda, colaboración y dedicación desde
el inicio del proyecto.

Al Dr. Germán Cerdá por sus buenos consejos, paciencia y su amistad.

Por último agradecer a los pacientes de fibromialgia voluntarios su colaboración
desinteresada, sin la que no hubiera sido posible la realización de este estudio.

A todos ellos, muchísimas gracias.

INDICE

ABREVIATURAS

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

RESUMEN	ix
SUMMARY	xi
1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 Prevalencia.....	2
1.3 Aspectos clinicos	3
1.4 Diagnóstico	5
1.5 Clasificaciones.....	10
1.6 Manejo terapeutico de la FM	14
1.7 Etiología	17
1.8 Infección viral en enfermos de FM	18
1.9 Sistema inmunológico.....	28
2 HIPÓTESIS	39
3 OBJETIVOS	41
4 MATERIAL Y MÉTODO	43
4.1 Participantes en el estudio	43
4.1.1 Criterios de inclusión	43
4.1.2 Criterios de exclusión	45
4.2 Confirmación de diagnóstico y pruebas adicionales a las que fueron sometidos los pacientes participantes	45

4.3 Toma de muestra, procesamiento y almacenaje	46
4.3.1 Toma de muestra.....	46
4.3.2 Fracciones obtenidas a partir de las muestras:.....	46
4.4 Obtención de ADN genómico de ratón.....	50
4.5 Amplificaciones de secuencias provirales mediante PCR anidada	50
4.5.1 Diseño de primers para amplificación de secuencias XMRV.....	50
4.5.3 Amplificación por PCR anidada del virus XMRV	53
4.5.4 Amplificación por PCR anidada del virus HTLV-2	54
4.6 Amplificaciones de secuencias genómicas mediante PCR.....	55
4.6.1 Diseño de primers para la amplificación de secuencias presentes en el genoma humano.....	55
4.6.2 Diseño de primers para la detección de IAPs contaminación murina.....	56
4.6.3 Amplificación por PCR de secuencias genómicas.....	56
4.6.4 Amplificación por PCR de secuencias IAP.....	56
4.7 Visualización de ADN	57
4.7.1 Visualización de ADN genómico	57
4.7.2 Visualización de los productos de PCR	57
4.8 Purificación, subclonación y secuenciación de fragmentos de ADN	58
4.9 Análisis de expresión de la RNasa L mediante análisis por Western Blot	59
4.10 Análisis estadístico.....	59
5 RESULTADOS:.....	63
5.1 Confirmación del diagnóstico de FM y síndrome de fatiga de los participantes	63
5.2 Determinación de la presencia de secuencias del provirales XMRV en el ADN genómico de pacientes de FM y participantes sanos.....	65
5.2.1 Calidad del ADN genómico	65

5.2.2 Hallazgo de resultados positivos para el virus XMRV.....	67
5.2.3 Comprobación de la secuencia del virus XMRV en los positivos obtenidos	73
5.2.4 Evaluación de contaminación con ADN genómico murino	75
5.2.5 Amplificación inconsistente de secuencias <i>env</i> e imposibilidad de amplificación de secuencias <i>gag</i> del virus XMRV.....	77
5.2.6 Ausencia de amplificación de secuencias <i>env</i> en preparaciones independientes de pacientes y controles que habían presentado previa positividad.....	78
5.2.8 Sensibilidad de los ensayos de amplificación de secuencias XMRV por PCR anidada.....	81
5.3 Determinación de la presencia de secuencias del provirales HTLV-2 en el ADN genómico de pacientes de FM y participantes sanos.....	82
5.3.1 Suelcionación de secuencias HTLV-2 para ser utilizadas como control positivo en cribados virales.....	83
5.3.2 Ausencia de amplificación de secuencias específicas del virus HTLV-2.....	83
5.3.3 Sensibilidad de los ensayos de amplificación de secuencias HTLV-2 mediante PCR anidada	84
5.4 Análisis de la expresión de RNasa L	85
5.4.1 Estudio de la abundancia relativa de la forma truncada de la RNasa L respecto a la forma íntegra.....	86
5.4.2 Análisis estadístico de los valores de abundancia relativa de la forma truncada de la RNasa L respecto a la forma íntegra en enfermos de FM frente a participantes sanos	89
6 DISCUSIÓN	91
7 CONCLUSIONES.....	101
8 BIBLIOGRAFÍA	103

ANEXOS.....	115
ANEXO I.....	117
ANEXO II.....	119
ANEXO III.....	121
ANEXO IV.....	123
ANEXO V.....	125
ANEXO VI.....	127
ANEXO VII.....	129
ANEXO VIII.....	131
ANEXO IX.....	137
ANEXO X.....	147
ANEXO XI.....	151
ANEXO XII.....	153
ANEXO XIII.....	163

ABREVIATURAS

FM: Fibromialgia

SFC: Síndrome fatiga crónica

XMRV: Virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia murina

MLV: Virus de la leucemia murina

HTLV-2: Virus linfotrópico de células T humanas tipo 2

RNasa L: Enzima ribonucleasa L

2'-5'A: Oligoadenilato 2'-5'

OAS: Oligoadenilato sintetasa

ADNg: Ácido desoxirribonucléico genómico

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

ARN: Acido ribonucléico

FIQ: Cuestionario de impacto de fibromialgia

MFI: Cuestionario multidimensional de fatiga

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Tm: Temperatura de fusión

IAP: Partícula A intracisternal

bp: pares de bases

kDa: kilodalton

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Prevalencia de los síntomas nucleares y asociados a la FM expresado en porcentaje.....	4
Tabla 2: Clasificación de subgrupos de FM según Giesecke.....	11
Tabla 3: Clasificación de subgrupos de FM según Müller <i>et al.</i>	12
Tabla 4: Clasificación de subgrupos de FM según Thieme <i>et al.</i>	13
Tabla 5: Clasificación de subgrupos de FM según Hasset <i>et al.</i>	14
Tabla 6: Tratamientos y técnicas de fisioterapia para FM	15
Tabla 7: Propuesta de tratamientos según nivel de afectación de Iglesias <i>et al</i>	16
Tabla 8: Relación de primers utilizados.....	52
Tabla 9: Descriptivos de los cuestionarios. Puntuaciones máximas y mínimas, medias y desviaciones típicas de las variables recogidas en el MFI, FIQ y SF36.	64
Tabla 10: Resultados análisis PCR de las muestras analizadas de pacientes de FM.....	68
Tabla 11: Resultados análisis por PCR de las muestras analizadas de pacientes y de controles.....	70
Tabla 12: Resultados descriptivos del análisis estadístico de la abundancia relativa de la enzima RNasa L.....	89
Tabla 13: Cribado de retrovirus por PCR anidada	95
Tabla 14: Resultados del Western Blot de muestras de pacientes de FM.....	151
Tabla 15: Resultados del Western Blot de muestras de controles sanos.	152

Figura 1. Localización de los puntos sensibles al dolor de la FM	7
Figura 2: Estructura del virus XMRV.....	21
Figura 3: Ciclo de vida de los retrovirus.	25
Figura 4: Estructura del virus HTLV-1.	26
Figura 5: El Sistema 2-5A.....	29
Figura 6: Estructura de la RNasa L por dominios y modelo de activación..	31
Figura 7: Modelo de los mecanismos de acción de la RNasa L en la defensa celular frente a la infección y en el control antiproliferativo	35
Figura 8: Diagrama cíclico de la desregulación de la vía-2'5'oligoadenilato sintetasa de la RNasa L.....	36
Figura 9: Integridad del ADN genómico obtenido.....	66
Figura 10: Amplificación por PCR de secuencias genómicas.....	66
Figura 11: Amplificación positiva de secuencias <i>env</i> XMRV en muestras de FM y participantes sanos.....	72
Figura 12: Alineación BLASTN de la secuencia amplificada a partir del ADN genómico del paciente de FM 62 secuenciado con el primer XMRV-env-inner-6334-F..	73
Figura 13: Secuencia amplificada a partir del ADN genómico del paciente de FM 62, secuenciada con el primer XMRV-env-inner-6334-F.....	74
Figura 14: Ausencia de contaminación murina de muestras y reactivos.....	76
Figura 15: Sensibilidad del ensayo de PCR para la detección de ADN murino.	77
Figura 16: Amplificación inconsistente de secuencias <i>env</i> e imposibilidad de amplificación de secuencias <i>gag</i> del virus XMRV.....	78
Figura 17: Ausencia de amplificación de secuencias <i>env</i> en preparaciones independientes de pacientes y controles que habían presentado previa positividad.. .	79

Figura 18: Inespecificidad de los productos amplificados con los primers específicos de la región <i>gag</i> del virus XMRV..	80
Figura 19: Sensibilidad del ensayo de PCR anidada para la detección de secuencias provirales XMRV.	82
Figura 20: Ausencia de amplificación de secuencias específicas del virus HTLV-2 <td>84</td>	84
Figura 21: Sensibilidad del ensayo de PCR anidada para la detección de secuencias provirales HTLV-2.	85
Figura 22: Análisis por Western Blot de la RNasa L en extractos de PBMCs.....	87
Figura 23: Abundancia relativa de la forma truncada de la enzima RNAsa L (37 kDa) con respecto a la forma intacta (83kDa) en pacientes de FM y participantes control.....	88
Figura 24: Diagrama de tallo y hojas mostrando las diferencias entre abundancia relativa de la forma truncada de la enzima RNAsa L (37 kDa) con respecto a la forma intacta (83kDa) en enfermos de FM (casos-1) y participantes sanos (controles-0) tras descartar valores “outliers” $p>0.5$	90

RESUMEN

Actualmente la etiología de la fibromialgia y el síndrome de fatiga crónica (FM/SFC) es desconocida. La hipótesis de infección viral recurrente como explicación a los síntomas de dolor y cansancio que presentan estos pacientes puede encontrarse frecuentemente en la literatura. Sin embargo la asociación de 2 retrovirus huérfanos: el retrovirus gamma xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia murina (MLV) denominado XMRV y el retrovirus delta linfotrópico de células T humano Tipo 2 (HTLV-2) no han sido confirmadas hasta la fecha así como tampoco lo ha sido la propuesta de que la forma truncada de la enzima RNasa (Ribonucleasa) L es un biomarcador de la fatiga crónica.

En este estudio, se realizó un cribado de la presencia de secuencias virales relacionadas con la del retrovirus MLV y la del HTLV-2 en ADN genómico obtenido de 75 pacientes de fibromialgia (FM) afectados de fatiga crónica y 79 sujetos sanos locales pareados por edad. Inicialmente se obtuvo amplificación del gen *env* del XMRV en el 20% de las muestras ensayadas (24% pacientes y 15% controles). Sin embargo, estos resultados no pudieron reproducirse en preparaciones independientes de ADN genómico de los mismos individuos. Adicionalmente, ninguna de las 154 muestras de ADN genómico rindieron amplificación específica del virus HTLV-2, llevándonos a concluir que las asociaciones previas entre infecciones retrovirales relacionadas con MLV o HTLV-2 y la fatiga crónica deben ser desestimadas.

Por otro lado, el análisis de extractos proteicos preparados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de 62 enfermos de FM y 41 participantes control por Western Blot no rindió diferencias significativas en abundancia relativa de la forma truncada de 37 kDa de la RNasa L y por tanto no se puede asignar correlación alguna con la FM.

El hecho de que nuestra cohorte de pacientes no muestre evidencia alguna de ninguna de las dos infecciones retrovirales previamente asociadas a fatiga crónica no descarta la posibilidad de que otras infecciones virales constituyan por sí mismas o contribuyan al desarrollo o evolución de la FM y/o fatiga crónica.

Palabras clave:

Fibromialgia, fatiga crónica, virus de la leucemia murina (MLV), virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia murina (XMRV), virus linfotrópico de células T humanas tipo 2 (HTLV-2), enzima ribonucleasa L (RNasa L).

SUMMARY

The etiology of fibromyalgia and chronic fatigue syndrome (FM/CFS) is currently unknown. A recurrent viral infection is an attractive hypothesis repeatedly found in the literature since it would explain the persistent pain and tiredness these patients suffer from. The initial striking link of two distinct orphan retroviruses: the gamma retrovirus murine leukemia virus (MLV)-related virus and the delta retrovirus T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) to chronic fatigue have not been confirmed to date; neither has been the proposal of a 37 kDa truncated form of the RNaseL enzyme as a biomarker of chronic fatigue.

In the present study, genomic DNA (gDNA) from 75 fibromyalgia patients suffering from chronic fatigue and 79 age-matched local healthy controls were screened for the presence of MLV-related and HTLV-2 related proviral sequences. The XMRV *env* gene was amplified in 20% of samples tested (24% patients and 15% healthy controls). Unexpectedly, no PCR amplifications from independent gDNA preparations of the same individuals were obtained. Additionally, no specific HTLV-2 sequences were obtained at any time from any of the 154 quality-controlled gDNA preparations screened, allowing us to conclude that previous associations between MLV-related or HTLV-2 retrovirus infection with chronic fatigue must be discarded.

On the other hand, Western Blot analysis of protein extracts from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 62 FM patients and 41 healthy controls showed no significant differences in the relative abundance of the 37 kDa truncated form of the RNase L and therefore no co-relation with FM can be stated.

The fact that our cohort of patients did not present evidence of any of the two types of retroviral infection formerly associated to chronic fatigue does not rule out the possibility that other viruses are involved in inciting or maintaining fibromyalgia and/or chronic fatigue conditions.

Keywords:

Fibromyalgia, Chronic fatigue, Murine leukemia virus (MLV), Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV), T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2), ribonuclease L enzyme (RNase L).

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En la segunda mitad del siglo XX hemos asistido al incremento de enfermedades de etiología poco conocida y con importante repercusión psicosocial así como un enorme coste personal y económico. Entre ellas destacan la Fibromialgia (FM) y el Síndrome de Fatiga Crónica (SCF), enfermedades con marcada prevalencia entre la población femenina que comparten características clínicas y demográficas (1).

Históricamente la FM o “reumatismo tisular” como la denominaban los autores alemanes se conoce desde hace más de 150 años (2). Desde entonces se han acuñado distintos términos para hacer referencia a este cuadro sintomatológico, hasta que en los años 70 se acuña el concepto “fibromialgia” describiendo un cuadro de dolor crónico de más de tres meses de evolución de origen musculo-esquelético, diseminado y generalizado a ambos hemicuerpos, tanto en miembros superiores como en inferiores, y en la musculatura paravertebral del raquis. Presenta áreas anatómicas reducidas en las que el umbral del dolor es más bajo (≥ 4 kg) que en individuos sanos, a estas áreas concretas se les designa como “puntos dolorosos” (3). A menudo estos pacientes, suelen tener sensibilidad aumentada o incluso dolor al tacto normal en cualquier sitio de su cuerpo (alodinia) (4).

En 1992, en la Declaración de Copenhague, la FM es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) tipificándola con el código M79.7 en el manual de Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD-10), siendo reconocida en 1994 por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), clasificándola con el código X33.X8a (5-6).

En 1994 Yunus englobó la FM dentro del síndrome disfuncional junto a otras enfermedades como síndrome de intestino irritable, SFC, síndrome de piernas inquietas, cefalea tensional, dolor de la articulación témporo-maxilar y bruxismo. Todos ellos presentaban características clínicas comunes y respuesta a agentes serotoninérgicos o noradrenérgicos, proponiendo como hipótesis la existencia de una

disfunción neuroendocrina-inmune (alteraciones de neurotransmisores y hormonas) que establecía un nexo entre todas ellas (7).

Actualmente la FM queda definida siguiendo los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR), como un síndrome de dolor generalizado, acompañado de mialgias de localización imprecisa, de duración prolongada y con dificultad para definir con precisión el inicio de los mismos. El dolor suele ser difuso, profundo, intenso y en muchas ocasiones difícil de describir, aparece como quemazón, punzadas, pesadez, palpitación o molestia y en general empeora con el ejercicio físico intenso, el frío y el estrés emocional (3, 8). Se le ha relacionado frecuentemente con el SFC, pues el 70% de las personas que padecen FM cumplen también criterios para este síndrome(9).

El Síndrome de fatiga crónica (SFC) también llamado en el pasado encefalomielitis miálgica, y para el que ahora se recomienda el nombre combinado EM/SFC (Encefalopatía Miálgica/Síndrome de Fatiga Crónica) es una enfermedad clasificada por la OMS con el número G 93.3.en el CIE-10

1.2 Prevalencia

Estudios epidemiológicos estiman que la incidencia de la FM gira entre 2-3% de la población mundial (1), lo que supone más de 1.000.000 de afectados en España y alrededor de 110.000 afectados en la Comunidad Valenciana. Dichas enfermedades generan un importante consumo de recursos asistenciales y suponen un importante coste personal, social y laboral en aquellos pacientes que la padecen(2).

FM es un término escuchado frecuentemente en las consultas de los médicos de familia, de los reumatólogos, de los rehabilitadores y de los fisioterapeutas, pero también en las de los traumatólogos, psiquiatras, psicólogos, terapeutas ocupacionales, internistas, anestesistas etc, ya que es una enfermedad cuyo tratamiento comprende el abordaje desde distintas disciplinas del área de la salud (10)

Afecta desproporcionadamente a las mujeres, que resultan mayormente afectadas, en concreto entre un 80 a un 90% y usualmente en la madurez (desde 30 a los 60 años),

aunque puede presentarse a cualquier edad incluyendo la niñez (1, 11-13)

Es importante señalar que es el segundo o tercer diagnóstico más común en las consultas de reumatología y medicina general, asignado al 4-20% de los pacientes visitados en reumatología, al 2-4% de los visitados en atención primaria y al 7,5% de los pacientes visitados en los hospitales (12, 14)

Probablemente por ello, la FM es un término que ha irrumpido con vigor en las últimas décadas, tanto en la literatura científica médica como en los medios de comunicación de masas y puede considerarse ya un término globalizado, presente y estudiado en múltiples países y comunidades alrededor del planeta.

1.3 Aspectos clínicos

En los pacientes de FM aun siendo el principal síntoma el del dolor, aparecen otros síntomas o trastornos que lo acompañan, como una alteración de la fase 4 del sueño con mal descanso nocturno o sueño no reparador, el sueño es tan liviano que nunca llega a dormirse lo suficientemente profundo como para descansar y restaurar su cuerpo (9, 15), adicional a otras percepciones mal definidas, astenia, fatiga continua, debilidad y pérdida de fuerza muscular y rigidez articular, sobre todo matutina (véase tabla 1). Al levantarse, por la mañana, necesitan una o dos horas de “calentamiento” para activarse y ponerse en marcha, y tienen la sensación de inflamación de las articulaciones (11).

Es también frecuente la concurrencia de dolores de cabeza, parestesias en las extremidades, fenómeno de Raynaud, el cual perjudica el flujo sanguíneo de las manos y los pies, síndrome de colon irritable, síndrome premenstrual y síndrome uretral femenino. Habitualmente el síndrome se acompaña de síntomas de depresión, estrés y ansiedad y de dificultades en las funciones cognitivas como la memoria y la atención (15-16).

Tabla 1: Prevalencia de los síntomas nucleares y asociados a la FM expresado en porcentaje (8)

SINTOMAS	PREVALENCIA (%)
Dolor extenso	97
Fatiga	78
Rigidez articular matutina	76
Parestesias	67
Dolor de cabeza	54
Ansiedad	44
Colon irritable	35

Los pacientes con FM desarrollan dolor ante cualquier esfuerzo que anteriormente realizaban sin dificultad de forma habitual y viven la evolución y curso del trastorno como algo limitante e invalidante. En muchos casos, su calidad de vida está significativamente disminuida (17).

El SFC es una enfermedad orgánica, multisistémica y crónica que presenta aspectos comunes con la FM incluidos algunos de los síntomas que presentan los pacientes. Puede afectar de manera progresiva el sistema inmunológico (18-19), el neurológico, el cardiovascular y el endocrino, y se caracteriza por causar una fatiga severa, perdida sustancial de concentración y memoria, desorientación espacial, sueño no reparador, intolerancia a la luz, al sonido y a los cambios de temperatura, intolerancia al estrés emocional y a la actividad física, dolor muscular y en las articulaciones, sensibilidades químicas múltiples y una sensación de estado gripal permanente, entre otras manifestaciones (20).

La OMS, Organización Mundial de la Salud, ha clasificado esta enfermedad en el Manual de Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades dentro del capítulo de enfermedades del sistema nervioso central con el código de G93.3.

Al mismo tiempo, la apariencia externa del enfermo no refleja la enfermedad, lo que puede dar lugar a sentimientos de incredulidad en las personas del entorno social del paciente que al dudar de la veracidad de sus quejas, puede aumentar el sentimiento de aislamiento, culpabilidad y frustración del paciente, así como dificultades para recibir la baja laboral. Por tanto ambas enfermedades, FM y SFC, presentan una clínica bastante común (9, 15, 21).

1.4 Diagnóstico

La FM se caracteriza por la ausencia de causas orgánicas claras. No hay pruebas de laboratorio que permitan el diagnóstico específico de este trastorno, sino que su clasificación se realiza por eliminación. Las radiografías, los análisis y biopsias musculares, si bien se han de realizar, sólo sirven para descartar la presencia de otras patologías, pero no son determinantes para su diagnóstico, ya que los resultados de radiografías, análisis de sangre y biopsias musculares son normales, por lo tanto, el diagnóstico se basa en un examen clínico de los síntomas (1-2, 7). Es decir se carece de datos objetivos, analíticos, de imagen o anatomo-patológicos, por lo que su diagnóstico se realiza exclusivamente a partir de datos subjetivos, como son el dolor que cuenta la paciente y el dolor desencadenado mediante la presión de los puntos sensibles de la FM (3) y cuestionarios validados sobre el dolor, fatiga y calidad de vida (22-40). Lo mismo pasa con los métodos más modernos, como el TAC (Tomografía Axial Computarizada) o la resonancia magnética, los cuales no permiten mediante su uso habitual detectar ninguna alteración física determinante para el diagnóstico de esta enfermedad (41-42).

Aunque es cierto que la guía de la Sociedad Americana de Dolor (APS) recomienda obtener un recuento completo de células sanguíneas y valorar el ratio de sedimentación de eritrocitos, enzimas musculares, función hepática y tiroidea, pudiéndose así mismo obtener otras pruebas optativas como el factor reumatoide en pacientes nuevos con menos de 11 puntos gatillo que pudieran estar afectados de FM (2, 41, 43).

En 1990 se publicó el estudio multicéntrico liderado por Wolfe, Smythe, Yunus *et al.* (8, 44-45), a partir del cual se fijó un método objetivo que discriminara la FM de otros síndromes de dolor crónico regional o generalizado de tipo reumático. Este método se basa, siguiendo los criterios de clasificación para la FM publicados por American College of Rheumatology (8), en la aparición de dolor en 11 ó más de los 18 puntos localizados diferentes partes del cuerpo que coinciden con puntos de inserción del músculo, prominencias óseas, otras zonas de tejido blando y nódulos de algunos cuerpos musculares, cuando se aplica una fuerza mayor de 4 Kg en dicho punto.

- **Occipital:** bilateral, en las inserciones de los músculos suboccipitales
- **Cervical bajo:** bilateral, en la cara anterior de los espacios intertransversos C5-C7
- **Trapezoidal:** bilateral, en el punto medio del borde superior del trapecio
- **Supraespinoso:** bilateral, en su origen, por encima de la línea escapular, cerca de su borde medial
- **Segunda costilla:** bilateral, en la segunda unión intercostal, a 3 cm del borde del esternón
- **Epicondíleo:** bilateral, distal en 2 cm a los epicóndilos
- **Glúteo:** bilateral, en el cuadrante superoexterno de las nalgas
- **Trocantéreo:** bilateral, por detrás de la prominencia del trocánter mayor
- **Rodilla:** bilateral, en la almohadilla grasa medial, proximal a la línea articular (8)

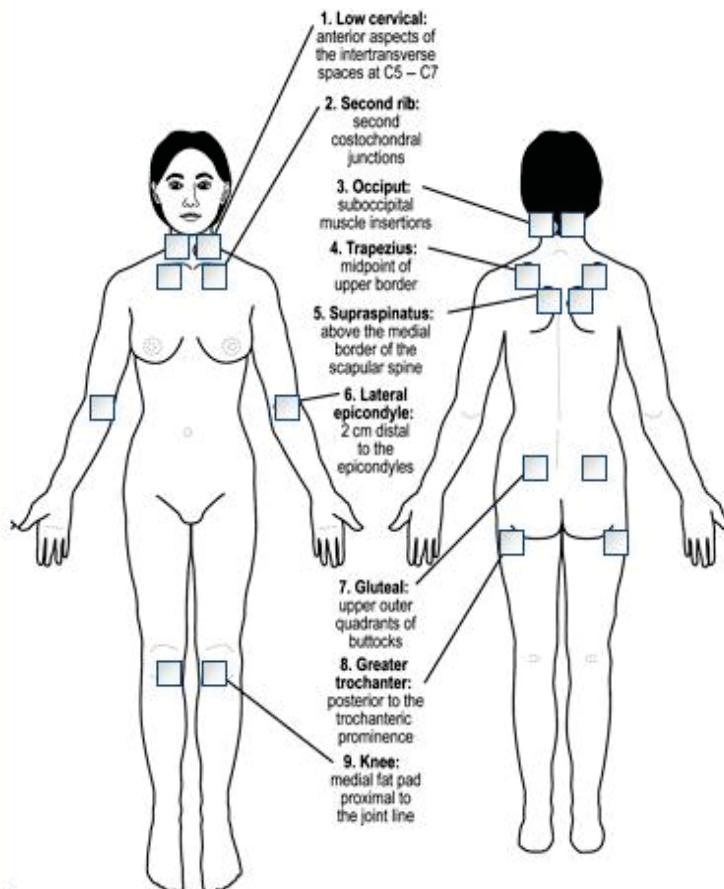


Figura 1. Representación de la localización de los puntos sensibles al dolor de la FM (8)

Se han identificado 18 puntos sensibles o 9 pares de puntos simétricos bilaterales a lo largo de todo el cuerpo y tanto en la cara ventral como en la posterior. Estos puntos deben resultar dolorosos cuando el evaluador concentra una presión digital sobre ellos de alrededor de cuatro kilos de fuerza. La reacción debe ser de dolor y no simplemente de una mayor sensibilidad. Se han establecido también dos pares de puntos de control que sirven para detectar los falsos positivos (46-47). Así se considera afectado de FM a todo paciente que muestre presencia de respuesta de dolor en 11 de los 18 puntos descritos como puntos de dolor fibromiálgico (8).

La clasificación de los múltiples síntomas descritos como una o más enfermedades es tema controversial y de arduo debate entre la comunidad científica. Aunque en la literatura científica los términos FM y SFC siguen caminos separados, existe una tendencia actual a integrar estos síndromes relacionados con el estrés (9, 41, 48-49).

Los criterios diagnósticos fueron estandarizados en 1994 por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades Americano (20) y más recientemente, en el año 2003, por un Subcomité experto de Sanidad de Canadá. En el 2006 la Liga Europea de Reumatología “EULAR” también desarrolló una guía basada en la evidencia (50), que pudiera servir de referencia a los clínicos en lo que respecta manejo de pacientes de FM (51).

Es muy importante que el médico que trata al paciente con FM realice un seguimiento adecuado que permita evaluar la efectividad de los tratamientos para cada paciente en concreto. Ya que los pacientes suelen tener múltiples síntomas, hay que tratarlos de manera holística en su totalidad y no cada síntoma por separado. Muchos enfermos tienen problemas de sensibilidad a medicamentos u otros productos químicos, en muchas ocasiones múltiple, problemas atribuidos en parte a alteraciones en el metabolismo o eliminación de los mismos (52).

Las actuales diferencias inter-individuo que se observan entre los pacientes de FM podrían llevar al desarrollo de nuevos criterios diagnósticos validados y a específicas herramientas para valorar esta enfermedad. De hecho, la clasificación por subgrupos ha sido ya propuesta por algunos autores (53-55). Futuros estudios orientados a la identificación de los mecanismos pato-fisiológicos a nivel individual resultarán clave en el desarrollo de tratamientos curativos específicos y por tanto debieran ser prioritarios.

El diagnóstico de FM reduce la angustia del paciente, evita pruebas complementarias costosas e innecesarias y permite al paciente compartir sus temores, dolencias y expectativas con otras personas que padecen su mismo problema (56).

La mayoría de las guías de práctica clínica destacan que informar correctamente debe ser el primer paso en todo paciente con FM. Una guía alemana publicada en 2008 (7) de carácter multiprofesional y en la que también participaron asociaciones de pacientes subraya que informar a los pacientes sobre el diagnóstico y las posibilidades terapéuticas debe tener el grado máximo de recomendación por varias razones:

- a) Desde la perspectiva del paciente el diagnóstico de FM a menudo sirve para dar fin a un largo periodo de incertidumbre, desinformación y una frustrante odisea a través del sistema sanitario. La información sobre el diagnóstico se considera desde hace mucho tiempo un derecho esencial del paciente.
- b) Desde la perspectiva del médico existe la obligación ética de informar a los pacientes sobre el diagnóstico y las posibilidades terapéuticas (7).

Algunos autores, aun admitiendo que existen pacientes con las manifestaciones clínicas de la FM, consideran que es preferible no efectuar diagnóstico (57). Sus argumentos giran en torno del supuesto efecto nocivo que tiene para el propio paciente el hecho de que hacer un diagnóstico significa medicar al paciente y crear un enfermo donde antes no lo había. Añaden que la medicalización consigue elevar al rango de enfermedad una serie de quejas y frustraciones que aflige a la mayoría de la población, y que en algunos pacientes mal adaptados alcanzan mayor intensidad aunque no por ello se pueda considerar como una enfermedad.

Otros autores opinan que la FM es simplemente un producto de la medicalización de los procesos de somatización tan frecuentes en nuestra sociedad actual, especialmente afecta de estrés en la vida cotidiana (57).

1.5 Clasificaciones

Se han venido proponiendo una serie de procesos, adaptaciones de la definición y divisiones o agrupamientos clínicos estratégicos que se describen a continuación (8-9, 55, 58-59).

6.1 Clasificación según Giesecke et al (60):

Está basada en variables obtenidas de 3 dominios diferentes:

- a) El ánimo: mide la depresión mediante la “Center for Epidemiologic Studies Depression Scale” y la ansiedad evaluada mediante el “State-Trait Personality Inventory.”
- b) Los aspectos cognitivos: evalúa el catastrofismo y el control del dolor mediante las sub-escalas del mismo nombre del “Coping Strategies Questionnaire.”
- c) Las variables biológicas: incluye hiperalgesia/sensibilidad al dolor, valorada mediante el dolorímetro y la presión dolorosa aplicada de forma aleatoria a niveles supra-umbral.

Con estas variables se obtienen 3 grupos en los que se pueden dividir los pacientes de FM (véase tabla 2).

Esta clasificación se adapta bien a la realidad clínica, al incluir no sólo aspectos psicológicos como otras clasificaciones, sino también biológicos y cognitivos.

Tabla 2: Clasificación de subgrupos de FM según Giesecke (60)

SUBGRUPOS DE FM	CARACTERISTICAS
Grupo1	<p>Valores moderados de depresión y ansiedad.</p> <p>Valores moderados de catastrofismo y control del dolor.</p> <p>Baja hiperalgesia y sensibilidad al dolor.</p>
Grupo 2	<p>Valores elevados en depresión y ansiedad.</p> <p>Valores más elevados de catastrofismo y más bajos de control percibido sobre el dolor.</p> <p>Valores más altos de hiperalgesia.</p>
Grupo 3	<p>Niveles normales de depresión y ansiedad.</p> <p>Niveles muy bajos de catastrofismo y el más elevado control percibido sobre el dolor.</p> <p>Elevada hiperalgesia y sensibilidad al dolor.</p>

6.2.- Clasificación según Müller *et al.* (61):

Se basa en signos clínicos y síntomas asociados. Divide a los pacientes con FM en 4 subtipos:

Tabla 3: Clasificación de subgrupos de FM según Müller *et al.* (61)

SUBGRUPOS DE FM	CARACTERISTICAS
Subtipo 1	Extrema sensibilidad al dolor. No se asocia a trastornos psiquiátricos.
Subtipo 2	Presenta depresión relacionada con el dolor comórbido.
Subtipo 3	Presenta depresión con síndrome fibromiálgico concomitante.
Subtipo 4	La causa es la somatización.

Se trata de una clasificación descriptiva, propuesta en función de la experiencia clínica del autor, pero no obtenida mediante análisis estadísticos. Por otra parte, el último grupo (subtipo 4) es discutible porque la somatización es un concepto cuestionado actualmente en psiquiatría y posiblemente se desestimarán en futuras clasificaciones. Ambos argumentos constituyen importantes limitaciones en la elección de esta clasificación.

6.3.- Clasificación según Thieme *et al.* (62)

Se basa en los resultados del cuestionario “West Haven-Yale Multidimensional Pain Inventory” (MPI) identificando 3 subgrupos:

Tabla 4: Clasificación de subgrupos de FM según Thieme *et al.* (62)

SUBGRUPOS DE FM	CARACTERISTICAS
Disfuncionales	Elevada su sensibilidad ante el dolor. El dolor interfiere mucho en sus vidas. Elevado malestar psicológico. Escasa actividad debido al dolor.
Estresados en el aspecto interpersonal	Consideran que las personas significativas en sus vidas (pareja, padres, hijos, cuidadores en general) no les apoyan demasiado en sus problemas con el dolor. Presentan trastornos psiquiátricos asociados.
Pacientes que realizan un afrontamiento adaptativo.	Sienten que reciben un buen apoyo social. Niveles relativamente bajos de dolor. Alta actividad.

Aunque esta clasificación se ha empleado en clínica, no solamente en el diagnóstico de FM sino también en el diagnóstico de otras enfermedades que cursan con dolor, su principal limitación es que basa la identificación de los grupos en aspectos exclusivamente psicológicos sin incluir variables biológicas.

6.4.- Clasificación según Hasset *et al.* (63)

Está basada en el estilo del balance afectivo utilizando el cuestionario Positive and Negative Affect Schedule (PANAS). Estos autores consideran, basándose en valores normativos de la población, que un afecto positivo (AP) en el PANAS implica una puntuación superior a 35 y un afecto negativo (AN) elevado consiste en obtener una puntuación superior a 18,1. De esta forma obtienen 4 grupos en los que proponen clasificar a los pacientes de FM:

Tabla 5: Clasificación de subgrupos de FM según Hasset *et al.* (63)

SUBGRUPOS DE FM	CARACTERISTICAS
Sanos	Elevado AP y bajo AN
Bajos	Bajo AP y bajo AN
Reactivos	Elevado AP y elevado AN
Depresivos	Bajo AP y elevado AN

De nuevo, que la clasificación se limite al uso de un único cuestionario psicológico supone una importante limitación para su uso.

Tras analizar las propuestas de clasificación existentes, se decidió en el consenso interdisciplinar para el tratamiento de la FM, que a efectos prácticos, se tendría en cuenta la clasificación de Giesecke por tener en cuenta tanto aspectos psicológicos como biológicos y cognitivos (60).

1.6 Manejo terapéutico de la FM

Por las características ya comentadas y por su curso crónico, no existe en la actualidad un criterio unánime para el tratamiento de la FM. Pocos son los fármacos específicos para la FM, en general se utilizan fármacos de tratamiento neuropático para reducir el dolor (pregabalina), acompañados de relajantes musculares, antiinflamatorios no

esteroideos (AINES) y antidepresivos (64). Hoy día, las mejores recomendaciones disponibles provienen de las opiniones de comités de expertos (65).

Por todo ello, se propone un tipo de tratamiento que no es curativo sino que pretende ser preventivo de unos síntomas y paliativo de otros. Dado que se trata de un trastorno con tan variada sintomatología y con una considerable comorbilidad con otros trastornos psiquiátricos y físicos se han aplicado tratamientos de muy diversa naturaleza.

El objetivo que se persigue en el tratamiento de la FM es aliviar las diversas manifestaciones clínicas, mejorar la capacidad funcional y la calidad de vida de los pacientes. Para ello, se han ensayado diversos fármacos y varias modalidades terapéuticas con resultados variados, no obteniendo en algunos casos mejoría de los síntomas (57, 66).

A los tratamientos farmacológicos para atenuar el dolor y mejorar la calidad del sueño, se suman los tratamientos físicos fisioterápicos con la aplicación de diversas técnicas (67-70)

Tabla 6: Tratamientos y técnicas de fisioterapia para FM

TRATAMIENTO DE FISIOTERAPIA	TECNICAS
Masoterapia	Masajes relajantes y descontracturantes tanto profundos como superficiales.
Crioterapia	Hielo local (ice up) o cold pack, baños,...etc
Hidroterapia	Baños calientes o de contraste.
Termoterapia	Infrarrojos, almohadas o mantas eléctricas y compresas calientes...
Electroterapia	Ultrasonidos, radar, magnetoterapia...
Cinesiterapia	Activa como pasiva para la tonificación, estiramiento muscular y la flexibilidad articular.

Adicionalmente cabe incluir tratamientos psicológicos y psiquiátricos complementarios, tanto para el propio paciente como para las personas que conviven con el paciente con el fin de que conozcan la enfermedad, la comprendan y colaboren, facilitando el mantenimiento del ritmo de vida, de la actividad social, la realización de ejercicio físico, técnicas de relajación para aliviar la tensión muscular y la ansiedad y el control de la dieta alimenticia (15, 51, 71-72).

Se han publicado varias revisiones sistemáticas que analizan la eficacia de los programas de ejercicios, bien de forma aislada, combinados con otras formas de intervención o en el contexto de una revisión del conjunto de intervenciones no farmacológicas (10).

Hay que resaltar que la mejoría que se obtiene con la práctica del ejercicio aeróbico se mantiene mientras el paciente conserva la rutina del ejercicio, y desaparece cuando cesa la actividad (65).

Tabla 7: Propuesta de tratamientos según nivel de afectación de Iglesias et al. (73)

NIVEL SOMÁTICO	TRATAMIENTO
Nivel Bajo	Plan de cuidados de enfermería (Educación, estrategias de autoayuda, ejercicio físico no supervisado, higiene del sueño e intervención familiar). Tratamiento farmacológico.
Nivel Medio	Plan de cuidados de enfermería (Educación, estrategias de autoayuda, ejercicio físico supervisado, higiene del sueño e intervención familiar). Tratamiento farmacológico.
Nivel Alto	Plan de cuidados de enfermería (Educación, estrategias de autoayuda, ejercicio físico supervisado, higiene del sueño e intervención familiar). Tratamiento farmacológico. Tratamiento especializado (internista, reumatólogo, rehabilitador, fisioterapeuta, psicólogo y terapeuta ocupacional).

1.7 Etiología

A pesar de que numerosos estudios han intentado encontrar el factor etiológico de esta enfermedad en factores genéticos, neurológicos y metabólicos, en la actualidad seguimos sin conocer las causas, los mecanismos patogénicos o factores determinantes del desarrollo de la enfermedad (52, 74-76).

Entre los familiares de pacientes con FM se ha podido comprobar que existe una agregación familiar, pues el riesgo de padecer la enfermedad entre los familiares de pacientes con FM es 8,5 veces mayor que en otras poblaciones. En el seno de estas familias, tanto los factores psicológicos como el estado de salud son similares en los sujetos con y sin FM, lo que indica que puede haber una predisposición genética que contribuya a la aparición de la enfermedad (74). Los polimorfismos genéticos en los sistemas serotoninérgicos, dopaminérgicos y catecolaminérgicos pueden jugar un papel en la etiopatogénesis de la FM (77-79).

En este sentido, hay indicios de que algunos genotipos son más frecuentes en los enfermos con FM, como es el caso de las variantes del gen que regula la expresión de la enzima catecol-o-metil-transferasa (COMT) (74, 78, 80). Los hallazgos sugieren que este polimorfismo en la variación del gen, mediante sus efectos en la vía adrenérgica, puede conferir predisposición genética en la patogénesis de la FM.

Los genes promotores del transporte de la serotonina también muestran anomalías genéticas en personas con FM, presentando una disminución en esta sustancia que regula la sensación del dolor dando lugar a un trastorno en la percepción, transmisión y modulación del dolor. Esta hipersensibilidad pudiera explicar por qué estos pacientes son más susceptibles a los efectos adversos del estrés crónico y de eventos depresivos (81-82).

Algunos grupos de pacientes presentan una serie de factores comunes que podrían actuar como predisponentes o desencadenantes de la FM. Tal es el caso de los antecedentes de situaciones traumáticas en la infancia (violencia física o psicológica,

abuso sexual, etc). Además los trastornos del estado de ánimo o el trastorno de ansiedad con una base genética claramente demostrada (80, 83).

En muchos pacientes, el cuadro clínico de la FM suele estar precedido por una fuerte infección, una lesión o un problema que genere fuertes dolores (por ej. colon o vejiga irritable, sensibilidad química múltiple y cefaleas tensionales crónicas, cirugía), lo cual implica cambios neurofisiológicos, que a su vez causan amplificación de la transmisión y del procesamiento del dolor del sistema nervioso central, hiperalgesia (aumento de la sensibilidad al dolor), alodinia (percepción de dolor de situaciones normales) e incremento del dolor del sistema nervioso central, llamado sensitización central . Se considera que estos factores desencadenan el cuadro clínico en personas predispuestas (84-85).

Recientes publicaciones cuestionan si la causa de la FM pudiese tener un origen viral debido a alteraciones en el sistema inmunológico de los pacientes impidiendo que tengan una respuesta defensiva correcta ante la infección viral (86-88).

1.8 Infección viral en enfermos de FM

Vamos a tratar este apartado de forma aislada con la finalidad de poder profundizar más, ya que va a formar parte de nuestros objetivos e hipótesis de este estudio.

Quizás el mayor consenso en cuanto a agentes desencadenantes de la FM/SFC corresponda como hemos señalado antes, a la propuesta por numerosos autores de una infección viral recurrente (18-19, 86, 89). Sin embargo, el diagnóstico de enfermedades complejas como la FM/SFC no asociada a un determinado agente etiológico concreto hasta la fecha y relacionada con un sistema inmunológico deficiente, puede verse complicada por la complejidad de la propia flora viral.

Entre los agentes virales analizados, se han encontrado porcentajes significativos de infección viral asociados a pacientes de FM y SFC de: Epstein-Barr virus (EBV), Parvovirus B19, human HHV-6 y HHV-7, human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I), HTLV-2, hepatitis C virus (HCV), Enterovirus, human Citomegalovirus (HCMV), etc. lo

que ha llevado a proponer la definición de subgrupos (“subsets”) afectados por uno u otro agente viral.

Es posible, por tanto, que los términos de FM y SFC engloben varias enfermedades, todas ellas con una sintomatología compleja común pero con diferentes etiologías. Esto explicaría la heterogeneidad de respuestas a diferentes terapias también observadas en enfermos de FM/SFC (9, 49).

A finales del mes de Octubre del año 2009 el grupo del Dr. Robert Silverman del Instituto Lerner de la Clínica Cleveland en Cleveland, OH comunicó a través de su publicación en la revista “Science” la presencia de secuencias de ADN correspondientes al nuevo gammaretrovirus XMRV (xenotropic murine leukaemia virus-related virus) en el 67% de pacientes de SFC frente a tan solo un 3,7% de afectados en el grupo de individuos sanos (93). También demostraron la infección de células en cultivo por PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) o plasma de pacientes positivos para secuencias de XMRV indicativa de la presencia de una infección activa y transmisible por el virus XMRV en estos enfermos (93).

Este hallazgo conmocionó a la comunidad científica preocupada por encontrar un método de diagnóstico apropiado y un tratamiento eficaz para pacientes de FM/CFS, especialmente por la capacidad que esta hipótesis tiene para explicar la naturaleza multisintomática de la enfermedad.

Desde la elaboración de esta propuesta varios grupos de científicos han intentado replicar los hallazgos iniciales del grupo del Dr. Silverman (93) mediante la búsqueda de secuencias del virus XMRV en pacientes de FM/SFC fuera de EEUU. Poco tiempo después aparecieron varios trabajos, entre ellos 2 en Reino Unido y uno en Holanda (94-96), con resultados contradictorios a los obtenidos por el grupo del Dr. Silverman. Los autores no hallaron una correlación entre la infección viral XMRV y la enfermedad FM/SFC. Planteando como explicación a la discrepancia la posibilidad de que la distribución del virus XMRV esté restringida al área de EEUU en la que se realizó el estudio inicial, o que las variantes europeas del mismo virus no hubieran podido ser detectadas con las sondas específicas utilizadas para la secuencia XMRV americana.

Esta imposibilidad de reproducir los resultados del Dr. Silverman, condujo a varios grupos de investigadores a cuestionar si el resultado de esos experimentos iniciales pudiera haber derivado de contaminaciones, en concreto por secuencias genómicas murinas que naturalmente contienen secuencias endógenas provirales de virus MLV, llegando incluso a cuestionar la existencia del virus XMRV.

Cabe destacar que estudios adicionales han demostrado la presencia de secuencias contaminantes de ratón en algunos kits de amplificación por PCR y la de otras secuencias de ratón únicamente en muestras positivas a XMRV (93).

Sin embargo, de ser así, una contaminación no podría justificar ciertos hallazgos como: la presencia de secuencias genómicas humanas adyacentes a las del provirus XMRV ni la presencia de anticuerpos a proteínas del virus en pacientes infectados, o la demostrada infectividad de PBMCs derivados de estos pacientes.

Para añadir complejidad al conflicto, un reciente estudio (86) muestra la presencia de secuencias de al menos 4 virus MLV (virus de la leucemia murina) endógenos politrópicos en una cohorte fuera de EEUU, pero no de XMRV, indicando la posible correlación de secuencias virales genéticamente distintas del grupo de los virus relacionados con MLV (86, 97-98), concretamente un 86,5% en pacientes frente a tan solo un 6,8% en donantes sanos. No encontrando evidencia de contaminación de ADN murino en ninguna de las muestras analizadas.

Posteriormente numerosos estudios reportaron ausencia de evidencia de infección en otras cohortes de pacientes de SFC, sin embargo en lo que se refiere a cohortes de FM la investigación ha sido más escasa. De hecho solo existen unos pocos informes en los que la posibilidad de esta infección se haya estudiado en enfermos de FM (99-101) y en la mayoría de ellos el número de pacientes evaluados es pequeño, resultando por tanto pertinente evaluar la posibilidad de infección por el virus XMRV y variantes del MLV en nuestra cohorte de pacientes.

Los virus MLV fueron descritos por primera vez en la década de los cincuenta, y desde entonces su estudio ha facilitado la compresión de las patologías asociadas a su

infección, especialmente en lo que se refiere al desarrollo de procesos de carcinogénesis, permitiendo la comprensión de la virología en sí.

Habiendo resultado útiles en el desarrollo de vectores retrovirales, el genoma de estos virus consiste en dos moléculas de ARN de cadena positiva que contienen las secuencias de los genes *gag*, *pol* y *env*, codificantes de proteínas estructurales, enzimas y proteínas de envoltura, respectivamente.

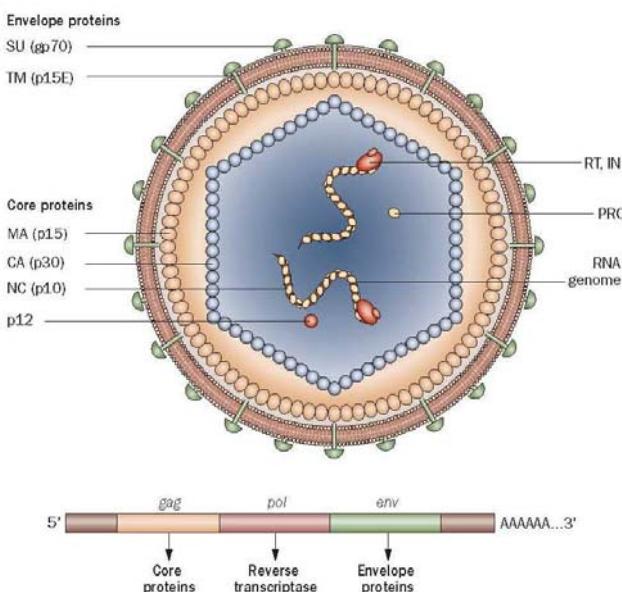


Figura 2: Estructura del virus XMRV. La figura muestra las distintas proteínas del núcleo viral, matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC), p12 proteasa (PRO), la transcriptasa inversa (RT) y la integrasa (IN) y las proteínas de la envoltura (subunidad de superficie (SU) y la subunidad transmembrana (TM), codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*. Cada partícula viral contiene una bicapa lipídica y dos moléculas de ARN genómico. [Monografía en internet]. [Acceso 22 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.research1st.com/2012/05/16/xmrsv-today/>.

Los retrovirus están divididos en siete géneros : Alpha, Beta, Gamma, Delta, Epsilonretrovirus, Lenti y Spumavirus (102). La clasificación se basa aparte de en la similitud de sus secuencias, en la presencia de genes adicionales a los genes canónicos *gag*, *pol* y *env*, separando los retrovirus, en dos grandes grupos: los virus simples y los complejos.

Este último criterio de clasificar a los virus en simples y complejos, distingue como virus simples a los gammaretrovirus MLV, y por lo tanto al XMRV, de los virus complejos, conocidos causantes de enfermedades en los seres humanos. Los virus complejos son por ejemplo los lentivirus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de tipo 1 y 2, que causan la inmunodeficiencia severa, y los Deltaretrovirus T - linfotrópicos humanos de células T (HTLV) como el HTLV-1 que se sabe desencadena leucemia y linfoma o trastornos del sistema nervioso como mielopatía y paraparesis.

Los retrovirus infectan normalmente células somáticas e integran su genoma en el ADN de la célula huésped (Figura 3). Los provirus se mantendrán y perpetuarán en las células descendientes de éstas hasta que mueran. Estos provirus integrados pueden permanecer en estado latente, pero lo más habitual es que se transcriban activamente liberando partículas activas. Las partículas producidas durante la vida de esta célula pueden infectar a otras células del huésped así como inducir infección exógena de células de individuos cercanos. De vez en cuando, un retrovirus infecta una célula germinal. Si esta célula sobrevive, y produce descendencia, todas las células nucleadas en el organismo que derive de ella contendrán una copia del retrovirus. De esta forma los retrovirus que se convierten en parte del genoma del huésped se denominan retrovirus endógenos y son pasados a las generaciones futuras a través de la herencia mendeliana clásica (103). Como resultado de este proceso, aproximadamente el 37% del genoma murino está constituido de retroelementos los cuales incluyen un 40-60% de MLVs endógenos (104-106).

Los MLVs endógenos murinos se subcategorizan en cuatro grupos basado en el huésped de alcance (107): virus ecotrópicos (del griego *oikos* que significa hogar), con capacidad de infección limitada a roedores; xenotrópicos (del término griego *xenos* que significa extraño) capaces de infectar una amplia variedad de especies a excepción del ratón de laboratorio común que expresa una variante de receptor que le dota de resistencia a infección; politrópicos (del griego *poly* que significa varios) competentes de infectar células murinas y algunas otras; el cuarto subgrupo constituye una variante de los politrópicos.

De entre estos grupos, solo los xenotrópicos y los ecotrópicos incluyen miembros con potencial infeccioso aunque algunos politrópicos pueden llegar a convertirse en infecciosos mediante procesos de recombinación. Algunos ratones son también portadores de virus amphotrópicos infecciosos (del griego *amphos*, que significa ambos) los cuales utilizan un receptor de entrada alternativo al que utilizan los virus xenotrópicos y politrópicos en la célula huésped, sin embargo no se han detectado virus amphotrópicos endógenos hasta la fecha.

El mecanismo por el que los virus MLV inducen leucemia y linfoma es vía mutagénesis insercional, por ello la inoculación de ratones con virus MLV puede desencadenar una amplia variedad de síntomas patológicos (108-109). Aunque los MLVs son generalmente no patógenos en ratones, ocasionalmente pueden llegar a causar problemas oncogénicos y neurodegenerativos en el ratón.

Entonces, ¿cuál es el proceso por el que los retrovirus infectan a una célula huésped? Inicialmente la partícula vírica, se une a la superficie externa de una célula susceptible, fusionando su envoltura lipoproteíca con la membrana celular e introduciendo con ello su nucleocápside junto con el ARN que constituye su dotación genética en la célula huésped. En cada partícula viral se encuentran dos cadenas de ARN vírico, a partir de cada una de las cuales la enzima transcriptasa inversa, que es una ADN polimerasa, primero produce una copia de ADN de simple cadena que a continuación se copia a si misma obteniéndose ADN de doble cadena. El ADN de doble cadena (provirus), migra hacia el núcleo y se integra en el propio ADN celular. La integración de este ADN doble cadena en el material genético del huésped es necesaria para la síntesis de nuevas moléculas de ARN, por la ARN polimerasa celular, ya que el virus carece completamente de la maquinaria metabólica necesaria para realizar la transcripción y la síntesis de proteínas necesarias para la reconstitución de su cápside.

Las células humanas disponen del receptor Xpr1 cuya expresión celular es general en el organismo y que pudiera permitir la entrada de virus del tipo MLV (110). De hecho la infección de células humanas en cultivo por el virus XMRV pertenecientes a varias estirpes celulares ha sido ampliamente demostrada (111-114). Aun así es no es tan

sencillo que el XMRV consiga infectar y replicarse en un organismo humano, ya que existen mecanismos de defensa entre los que se encuentran por ejemplo algunos factores de restricción que inhiben la replicación de los virus MLV presentes en los PBMCs.

Sorprendentemente el virus XMRV fue aislado a partir de sangre en el artículo publicado por Lombardi *et al.* (2009), suscitando la pregunta de si este virus posee mecanismos que le permiten vencer los mencionados factores de restricción (112, 114-116). Entre estos factores de restricción se encuentra el mecanismo generador de diversidad de proteínas APOBEC3G o apolipoproteína B editora del ARN mensajero que está formado por una familia de enzimas que editan el ARN utilizando mecanismos de desaminación de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos virales, las cuales desencadenan hipermutación de su genoma interfiriendo con su capacidad de replicación y por tanto limitando su capacidad infecciosa. De ahí que desempeñen un papel fundamental en la inmunidad innata antiviral.

Otros de los sistemas de defensa a la infección viral incluyen la participación de la familia de proteínas TRIM (Tripartite Motif) que interfiere en el proceso de desencapsulado viral en el citoplasma y la proteína transmembrana Teterina que inhibe la liberación de viriones. A pesar de que uno de los sistemas de defensa, el sistema TRIM5 α , no parecía inhibir la infección viral por el virus XMRV, los sistemas APOBEC3G y teterina sí mostraron eficiente restricción de su infección por lo que parecía poco probable que la infección humana por parte del virus XMRV pudiera llegar a establecerse con éxito bajo condiciones normales (117-118).

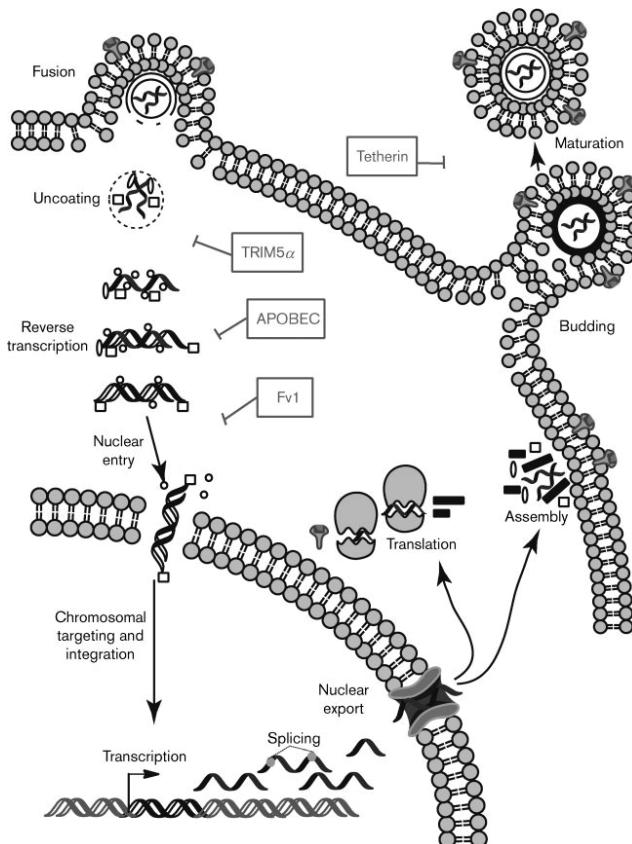


Figura 3: Ciclo de vida de los retrovirus. Esquema simplificado del ciclo de vida de un retrovirus exógeno sencillo. Se muestran las principales etapas de la replicación. APOBEC3G inhibe la síntesis de ADNc e induce la mutación del genoma del virus. TRIM5 α dirige el virus en una etapa después de la entrada, pero antes de la transcripción inversa, mientras que Fv1 inhibe la replicación después de la transcripción inversa pero antes de la integración. Tetherin impide la liberación de partículas virales maduras por parte de la célula huésped (103).

El hallazgo de un segundo trabajo en la literatura describiendo una impactante asociación entre el virus linfotrópico de células T humanas de tipo 2 (HTLV-2) con enfermos de fatiga crónica (123) hizo considerar su inclusión como parte del programa de “ cribado” de secuencias provirales en el genoma de nuestros pacientes de FM. En concreto DeFreitas *et al.* encontraron que el 83% (10/12) de los pacientes con fatiga crónica presentaban una amplificación positiva de la secuencia de HTLV-2 en el gen

gag en comparación con el 0% (0/20) en sujetos sanos. Este retrovirus (HTLV-2), está estrechamente relacionado con el virus HTLV-1. El HTLV-1 fue el primer retrovirus oncogénico humano conocido. Provoca una hemopatía maligna denominada leucemia o linfoma de células T del adulto y puede desarrollar también una mielopatía subaguda denominada paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada al HTLV-1.

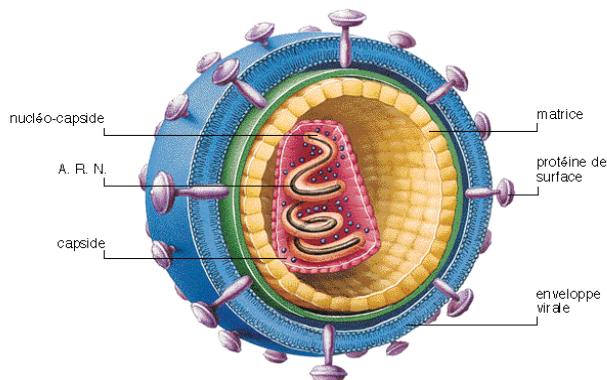


Figura 4: Estructura del virus HTLV-1. Ilustración gráfica de las partes que lo integran. Se compone de dos moléculas de ARN donde contiene su material genético, una cubierta proteica que protege a estos genes, la cápside y una bicapa lipídica que lo rodea cuando se encuentra fuera de la célula, llamada envoltura vírica con proteínas de superficie. [Monografía en internet]. [Acceso 24 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.virology.ws/2010/09/09/pmrsv-joins-xmrsv-as-possible-etiologic-agent-of-chronic-fatigue-syndrom/>

El virus linfotrópico de células T humano tipo 2 (HTLV-2) es un retrovirus estrechamente relacionado con el HTLV-1, con el que comparte mecanismos similares de transmisión, sobre todo sexual, de madre a hijo y por la sangre contaminada (120). Su material genético también está formado por 2 moléculas de ARN de cadena simple y polaridad positiva. El modo de infección utilizado por este virus puede explicar en parte por qué compartir agujas entre los usuarios de fármacos intravenosos parece haber sido la principal vía de difusión de HTLV- 2 en Europa y América del Norte en los últimos años (121). Además, el HTLV-2 es endémico en poblaciones indígenas americanas aisladas y tribus pigmeas de África. Fuera de estos focos endémicos, la infección por el virus HTLV-2 ha sido cada vez más generalizada entre los consumidores de drogas intravenosas y sus parejas sexuales principalmente en América del Norte y muchos países europeos, entre ellos Italia, España, Francia, Noruega, Suecia, Irlanda y el Reino Unido.

No es de extrañar, teniendo en cuenta las vías de transmisión de HTLV-2 y VIH-1 que los consumidores de drogas intravenosas sean frecuentemente coinfectados con el HTLV-2 y VIH-1 (122). Aunque el HTLV-2 aún no se ha asociado claramente con alguna enfermedad, acuñándolo por tanto hasta la fecha de virus huérfano, son varios los casos de trastornos neurológicos y linfoproliferativos los que se han reportado en portadores del HTLV-2 coinfectados con VIH-1. Es por ello que algunos estudios han sugerido que el HTLV-2 podría influir en el resultado de la enfermedad establecida por el virus VIH-1 en pacientes coinfectados (122).

Al contrario que en el caso del XMRV pocas han sido las iniciativas que evalúen una asociación entre infección por el virus HTLV-2 y la fatiga crónica, y de nuevo, todos ellos incluyeron un número muy reducido de pacientes no superando en ningún caso la participación de 30 pacientes (171-172, 184).

Adicionalmente, los tratamientos de terapia antirretroviral habían demostrado tener un valor limitado en el control de expresión del virus HTLV-2 en pacientes coinfectados con un segundo retrovirus, al menos para las coinfeciones con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (124-125). Por lo tanto, averiguar si alguno de los

pacientes participantes había resultado co-infectado con un segundo retrovirus podría ser importante para la atención del paciente.

Por todo ello nuestro estudio planteó evaluar la presencia de ambos retrovirus: el gammaretrovirus XMRV y el deltaretrovirus HTLV-2 que habían estado vinculados a fatiga crónica y sus posibles variantes, en una cohorte mayor que en los estudios anteriormente publicados, de 75 pacientes con FM españoles afectados de fatiga crónica y una muestra de 79 participantes sanos.

Se debe tener en cuenta sin embargo que la presencia de una infección en un grupo de pacientes no indica una relación causal del virus con la patogénesis de la enfermedad. Este sería un capítulo a tratar en estudios posteriores.

1.9 Sistema inmunológico

Los estudios más consistentes en términos de reproducibilidad y significancia en referencia a aspectos clínicos comunes entre los afectados de FM/SFC comprenden los que muestran una desregulación del sistema inmunológico en pacientes de SFC (89), en concreto aquellos que observan alteración del perfil de secreción de citoquinas, disminución en número de células natural killer (NK), presencia de formas truncadas del enzima RNasa L y disminución de las respuestas de células T a mitógenos u otros antígenos (18, 90-92).

Teniendo en cuenta que el éxito de una infección viral depende de la capacidad del virus para superar la barrera del sistema inmunológico innato (90), resultó de interés conocer si en la población analizada, existían alteraciones en la expresión de la enzima endoribonucleasa L o RNasa L previamente asociadas con fatiga crónica y que participa en el sistema 2-5 A de defensa innata.

La RNasa L es el componente terminal de una cascada molecular conocida como sistema 2'-5' interferón o sistema 2-5A, la cual media acciones antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. La inactivación o desregulación de esta

cascada se asocia con un sistema inmunológico comprometido y un riesgo incrementado de cáncer.

La Ribonucleasa L o RNasa L, conocida también como ribonucleasa 4 o ribonucleasa dependiente del 2'-5' oligoisoadenilato (2-5A), es una enzima encargada de degradar ARN solamente cuando se halla en su estado activo. Generalmente la enzima se encuentra en estado latente, de ahí su clasificación como ribonucleasa "L" (Latente) , y es solamente tras su inducción por la unión con el regulador alostérico 2-5A cuando se encarga de destruir todo el ARN de simple cadena en la célula, es decir degrada tanto el ARN celular endógeno como el ARN viral, llevando a la muerte de la célula infectada (ver Figura 5).

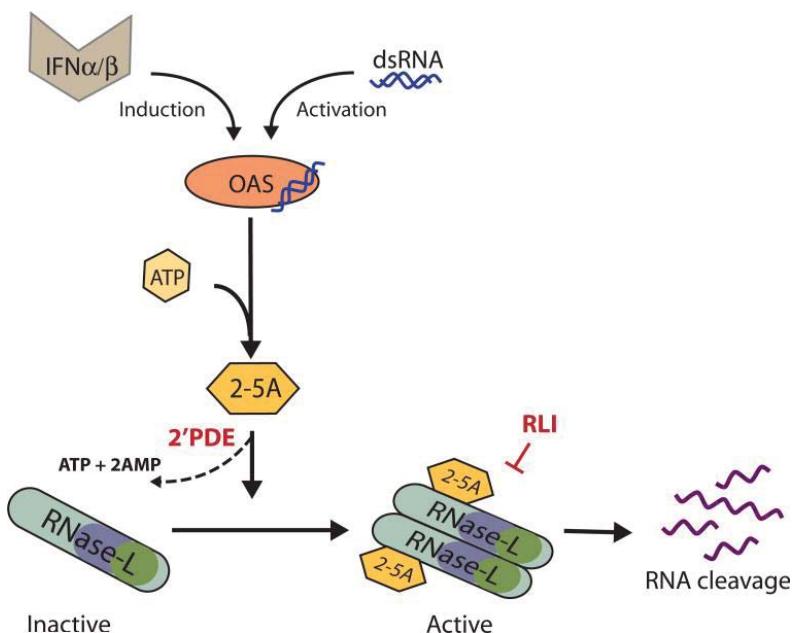


Figura 5: El Sistema 2-5A. El tratamiento con interferón o infección inducen la transcripción de los genes OAS. En presencia de ARN de doble cadena las proteínas OAS producen 2-5A; 2-5A se une y activa la RNAsa L latente mediante su dimerización lo que se traduce en degradación indiscriminada de todo el ARN de simple cadena (126).

La activación de la RNasa L se produce cuando el interferón en presencia de ARN de doble cadena en el citoplasma induce la transcripción de los genes OAS correspondientes a la familia de enzimas oligoadenilato sintetasas que producen los 2'-5'oligoadenilatos (2-5A) que dan nombre a la cascada y que finalmente inducen la activación de la RNasa L o endoribonucleasa de ARN de cadena simple mediante un proceso de dimerización de monómeros de RNasa L. La actividad endonucleasa de la RNasa L en estado activo es la que finalmente se encarga de degradar el ARN celular y vírico indiscriminadamente conduciendo a la autodestrucción de la célula infectada y por tanto actuando como mecanismo de defensa de la infección viral (90, 127-128).

La RNasa L fue descrita por primera vez como un complejo de 185 kDa por medio de experimentos de filtración en gel (129) y a continuación, como una proteína de 78-80 kDa en gel, en condiciones de desnaturación (130-131). La RNasa L humana es una proteína de 741 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 83 kDa (132). Estas dos formas coexisten en las células, su proporción varía en función del tipo de célula y los procedimientos experimentales que se utilizan para su detección. Las dos formas de RNasa L unen 2 - 5A y tienen actividad nucleasa 2 - 5A dependiente (133-134).

A nivel de monómero, la RNasaL está compuesta por tres dominios; un dominio N-terminal de repetición de anquirina, un dominio con actividad de proteína quinasa y un dominio C-terminal con actividad ribonucleasa. Se considera que el dominio N-terminal es el dominio regulador de la actividad RNasaL. La RNasa L se encuentra en su estado inactivo o latente, como se ha explicado anteriormente, hasta que el regulador alostérico 2-5A se une a su dominio regulador, induciendo un cambio en el dominio de anquirina y provocando en consecuencia la dimerización de dos moléculas de RNasa L que lleva a la activación de su actividad ribonucleasa residente en el dominio C-terminal (ver Figura 6) (127).

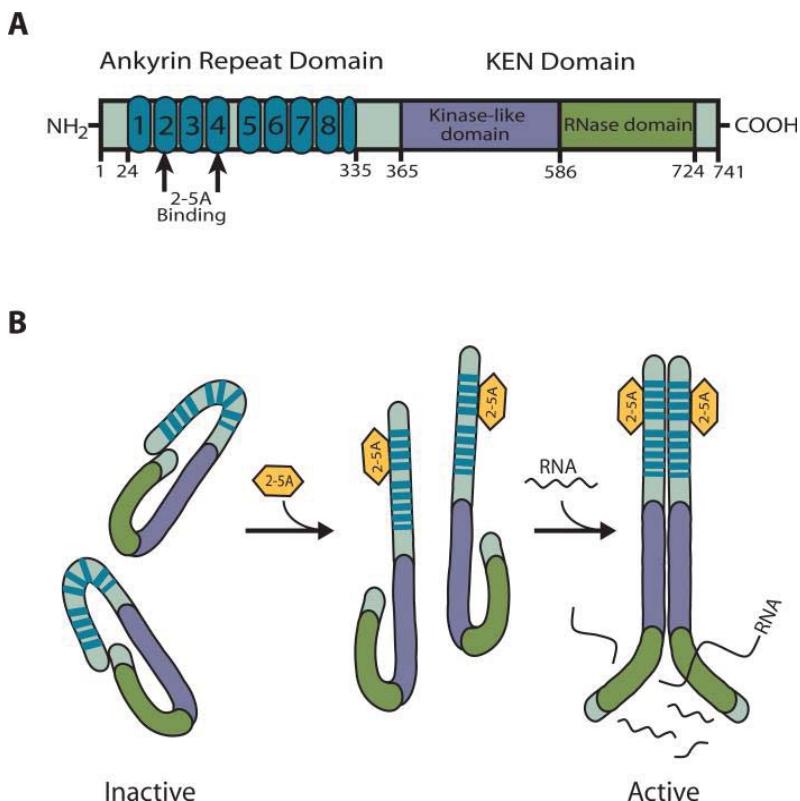


Figura 6: Estructura de la RNasa L por dominios y modelo de activación. A. Muestra los dominios funcionales de la RNasa L y sus correspondientes aminoácidos. B. Modelo de los cambios conformativos inducidos por el regulador alostérico 2-5A que resultan en la dimerización de la RNasa L y correspondiente activación enzimática (126).

A pesar de que la actividad endonucleolítica de la RNasa L es claramente la acción fundamental por la cual la enzima ejerce su acción, ha de mencionarse la existencia de proteínas adicionales que interaccionan con ella y que proporcionan modos de acción alternativa del enzima. Entre ellas la proteína moduladora de la actividad de la RNasa L que forma parte del complejo RNasa L-RLI-eRF3 y que mejor caracterizada ha sido hasta la fecha: el inhibidor de RNasa L (RLI) (135), también conocido como ABCE1 (ver Figura 5). Ya que el RLI no posee capacidad de unión del oligoadenilato 2-5A, y por tanto no compite con la RNasa L por él, se pensó que el mecanismo por el que el RLI inhibía la actividad RNasa L implicaba interacción directa proteína-proteína. Sin

embargo, a pesar de que el RLI co-sedimenta con la RNasa L en ensayos de fraccionamiento y forma complejos de alto peso molecular que sugieren la formación de heterodímeros RLI-RNasa L, no ha sido posible evidenciar la unión de RLI con RNasa L en ausencia de eRF3 (136). Sea su unión directa o indirecta, lo que es claro es que el RLI es un potente inhibidor de la actividad RNasa L. Aspecto que queda claramente ilustrado por el hecho de que la sobreexpresión de RLI potencia la inhibición de la actividad RNasa L mientras que el bloqueo de la expresión de RLI mediante técnicas de silenciamiento con oligonucleotidos antisentido potencia la capacidad de la RNasa L de unir 2'-5A, su capacidad de degradación de RNA ribosomal, la desestabilización del RNA mensajero mitocondrial y, en general su capacidad antiviral (135, 137-138).

Al contrario de lo que ocurre con la RNasa L que solamente se halla en vertebrados, el RLI se halla altamente conservado evolutivamente por lo que, a pesar de su nombre pudiera estar implicado en otra serie de procesos. Estructuralmente contiene dos dominios de unión de nucleótidos (NMD) del tipo casete ATP (ABC), un motivo amino-terminal de unión hierro-azufre y dos motivos tipo bucle P (P-loop) (139).

La transcripción de RLI es inducida por la presencia de ARN de doble cadena o por infección viral, sin embargo no está regulada por el interferón alfa (135, 140). El gen RLI codifica 2 transcritos uno de 2,8 kilobases (kb) y otro de 3,5. La diferencia de sus tamaños se debe a uso de señales de poliadenilación alternativas y por tanto se restringen a su zona no traducida 3' (3'UTR). El transcripto de mayor tamaño, 3,5 kb es más abundante, sugiriendo que la secuencia 3'UTR adicional le confiere estabilidad. A pesar de que ambos transcritos se expresan de forma ubicua, los niveles y la abundancia relativa de cada forma varía de tejido a tejido (135, 141-142). La expresión de RLI se halla reprimida en pacientes de SFC lo que se piensa contribuye a la desregulación de la actividad RNasa L que estos pacientes presentan (143-145).

Como atenuador natural de la actividad RNasa L, el RLI puede contribuir a la desregulación de la actividad RNasa L en enfermedades. Ya que la expresión de RLI puede resultar inducida por la infección de algunos virus pudiera servir como mecanismo de defensa del virus, evadiendo la actividad RNasa L (140, 146). RLI

funciona también en el reciclado de ribosomas junto con la terminación de traducción mediada por eRF1/eRF3, proceso que parece ser también influenciado por la actividad RNasa L (147-148) posiblemente mediante la actividad endonucleolítica de ARN. Sin embargo, los detalles mecanísticos de esta función adicional y de cómo esta actividad puede condicionar la proliferación celular y la infección viral está por determinar.

A la vista de una posible relación entre SFC e infección viral, los investigadores empezaron a examinar las proteínas de acción antiviral en el huésped que pudieran estar alteradas, y cuya alteración estuviera asociada al proceso patogénico de esta enfermedad. Los primeros estudios rindieron datos sobre la desregulación de la cascada 2-5A, hallando una actividad incrementada OAS, niveles elevados de RNasa L e inhibición de la expresión de RLI, lo que colectivamente sugería una actividad antiviral RNasa L mayor en estos pacientes (140, 149). Los niveles de desregulación OAS/RNasa L/RLI observados parecían correlacionarse negativamente con la actividad de las células natural killer (NK) sanguíneas y la desregulación de los procesos de apoptosis (150-151).

Adicionalmente e interesantemente, se encontró una variante de la RNasa L de bajo peso molecular en enfermos de SFC que no se hallaba presente en los sujetos control analizados. Esta variante de bajo peso molecular fue identificada como fragmento RNasa L de 37 kDa (152). Corresponde a una versión truncada del enzima que contiene el extremo amino-terminal correspondiente al dominio de repetición de anquirina o dominio regulador, responsable de la unión del oligoadenilato 2-5A, y su abundancia relativa con respecto a la RNasa L monomérica de 83 kDa parecía correlacionarse con el grado de discapacidad del paciente (145).

El fragmento de 37 kDa es generado por el procesamiento proteolítico de la RNasa L por las proteasas elastasa leucocitaria humana, la calpaína u otras proteasas presentes en los PBMCs de pacientes con SFC (92, 153). Una hipótesis sugiere que la infección puede inducir la producción de proteasas en monocitos, neutrófilos y células T que finalmente procesen la RNasa L produciendo el fragmento de 37 kDa. En realidad este procesamiento conduce simultáneamente a la producción de otro fragmento de 30

kDa correspondiente al extremo carboxi-terminal del enzima o dominio catalítico. Basándonos en el modelo actual de activación de la función endoribonucleasa de la enzima RNasa L (Figura 6) el fragmento de 37 kDa podría competir por la unión del oligoadenilato 2-5A con la forma monomérica completa de 83 kDa y por tanto inhibir su función. Sin embargo la unión de 2-5A de este fragmento que pudiera a la vez estar bloqueando el fragmento de 30 kDa induciría su disociación liberando esta forma truncada de actividad aparentemente 3 veces mayor que la de la forma completa (154). Adicional a este incremento en la degradación de ARN, la endonucleasa truncada puede no estar regulada de igual forma que la proteína completa exhibiendo posiblemente una especificidad alterada que podría conducir a la sintomatología presente en enfermos de SFC.

En relación con el procesamiento de la RNasa L resulta importante mencionar el informe de Freemont y colaboradores demostrando que la unión de trímeros o tetrámeros 2-5A protege a la RNasa L frente a la proteólisis mientras que la RNasa L unida a dímeros de 2-5A es susceptible frente a las proteasas (155). Los dímeros de 2-5A son preferentemente sintetizados por la isoforma p100 de las OAS (156), adicionalmente la distribución de las especies 2-5A pueden ser consecuencia de las características del ARN activador de doble cadena presente en la célula (157-158). Tanto el estudio de las diversas isoformas de los enzimas OAS como la de sus activadores en el contexto de la enfermedad de SFC podrían conducir a una comprensión más profunda del mecanismo generador del fragmento de 37 kDa y por tanto identificar posibles dianas terapéuticas en este sentido (159). Esta información completaría el modelo actual de los mecanismos de acción de la RNasa L en la defensa celular frente a la infección y en el control antiproliferativo (Figura 7).

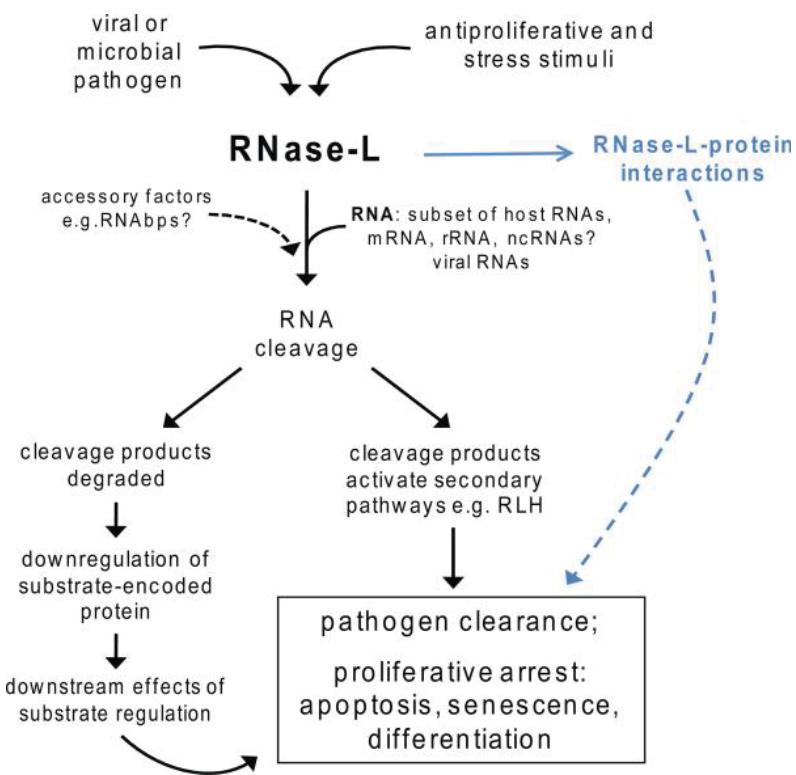


Figura 7: Modelo de los mecanismos de acción de la RNasa L en la defensa celular frente a la infección y en el control antiproliferativo. Se destacan acciones directas e indirectas (líneas quebradas) de la enzima RNasa L, estas últimas mediadas por interacción con otras proteínas. La alteración de su expresión o de su actividad en general se asocia con susceptibilidad a patógenos, respuestas inmunitarias desreguladas y un fenotipo de proliferación anormal. El diagrama no incluye las etapas de producción de 2-5A. La RNasa L se muestra en forma activa (126).

En este sentido Tiev *et al.*, habiendo encontrado una asociación entre la fatiga crónica y una mayor abundancia relativa de una forma truncada de peso molecular estimado en 37 kDa con respecto a la forma íntegra de peso molecular aproximado de 83KDa de la enzima RNasaL (160), llegó a proponer esta relación entre formas moleculares de la enzima como un biomarcador de la enfermedad de SFC (161).

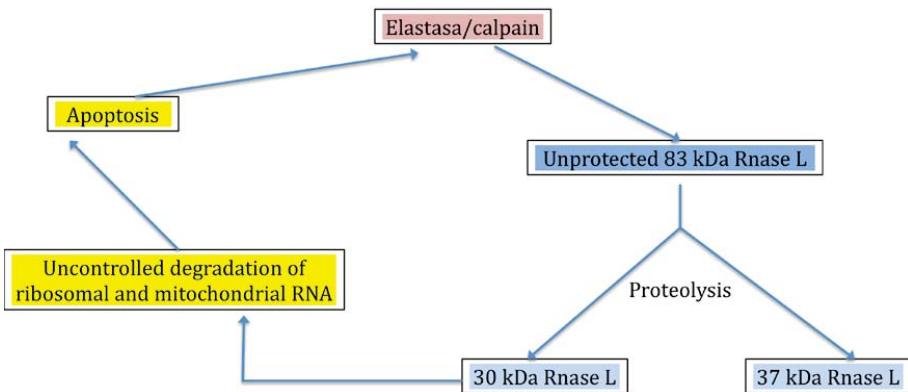


Figura 8: Diagrama cílico de la desregulación de la vía 2'-5'oligoadenilato sintetasa de la RNasa L. Posible explicación de la disfunción inmunológica en células sanguíneas mononucleares (PBMCs) de pacientes de FM/SFC (162).

Según el modelo descrito en la Figura 8, la proteólisis de la RNasa L conduce a una desregulación de la respuesta antiviral, provocando la apoptosis de células inmunológicas y causando una disfunción general del sistema inmunológico, dando lugar a que infecciones oportunistas (virus herpes, micoplasma, clamidia,...etc) o reincidentes se desarrollen más fácilmente en pacientes con SFC perpetuando la enfermedad en su estado crónico, al no encontrar resistencia por parte del organismo huésped (160). Esta proposición se basaría en el hecho de que en aquellas enfermedades que cursan con inflamación, como la FM/SFC, la RNasa L se pudiera activar de manera alternativa por acción de la elastasa leucocitaria humana, una proteasa inflamatoria, llevando a la producción de una RNasa L más corta o truncada, de 37 kDa (159-160) y otra de 30 kDa (162) a partir de la proteína nativa de 83 kDa.

Teniendo en cuenta que la diferencia en la expresión de la enzima en los pacientes de FM/SFC respecto a los controles podría explicar predisposición a las infecciones virales de forma recurrente y por tanto la sintomatología de dolor y cansancio en enfermos de

FM/SFC, resultaba de interés determinar si efectivamente esta forma truncada era así mismo prevalente en nuestra cohorte de pacientes (160-161, 163-164).

El conocimiento de los factores etiológicos de una enfermedad es fundamental tanto para establecer un correcto diagnóstico como para el desarrollo de terapias adecuadas como tratamiento tanto médico como fisioterapéutico y programas de prevención de salud efectivos.

Con todo lo expuesto se considera necesario el estudio más profundo de esta enfermedad con el fin de poder aplicar tratamientos más efectivos desde otras disciplinas del mundo de la salud como es la fisioterapia.

2 HIPÓTESIS

La infección viral, en concreto por virus relacionados con el MLV y con el HTLV-2, presentará una mayor prevalencia entre los enfermos de FM/SFC que en la población sana y su presencia podrá ser detectada por amplificación de secuencias provirales presentes en el ADN genómico de los participantes afectados mediante técnicas de PCR anidada.

Tal como previamente propuesto por Tieb *et al.* (164), la abundancia relativa de la forma truncada de la enzima RNasa L con peso molecular aproximado de 37 kDa será mayor en los PBMCs de pacientes de FM/SFC que en los de los controles sanos.

La sintomatología de dolor y cansancio en enfermos de FM/SFC podría explicarse por una infección viral recurrente facilitada por la desregulación de la actividad RNasa L consecuencia de la proteólisis de la forma íntegra de la enzima de 83 kDa.

3 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que nuestra población de pacientes de FM/SFC presentan con frecuencia alteraciones en el sistema inmunológico que puede hacerles más susceptibles a infecciones, y que la presencia de co-infecciones puede ser determinante a la hora de seleccionar un tratamiento antiviral efectivo, este estudio planteó evaluar las posibles infecciones por retrovirus previamente asociados a FM/SFC. De hecho este es el único estudio hasta la fecha que incluye la detección de ambos retrovirus (el gammaretrovirus como el XMRV o los virus relacionados con el MLV y el deltaretrovirus HTLV-2) en una misma cohorte de pacientes, y que además incluye la determinación de una posible correlación entre infecciones virales y alteraciones de las formas moleculares de la enzima RNasa L.

Los objetivos específicos del estudio fueron:

1. Determinar la sensibilidad del ensayo de PCR anidada para cada una de las parejas de primers bajo las condiciones óptimas de amplificación con el fin de asegurar adecuación de la técnica.
2. Evaluar la infección de XMRV por medio de detección de la forma proviral en el genoma de los pacientes y sujetos control aplicando técnicas de amplificación por PCR anidada.
3. Evaluar la infección de HTLV-2 por medio de detección de la forma proviral en el genoma de los pacientes y sujetos control aplicando técnicas de amplificación por PCR anidada.
4. Determinar la posible desregulación del sistema inmunológico innato de los pacientes asociada a la presencia en proporción mayoritaria de formas truncadas de la enzima RNasa L de 37 kDa.

4 MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital La Plana de Vila-real (Castellón) (Anexo I).

4.1 Participantes en el estudio

Los 75 pacientes participantes en el estudio se reclutaron entre Enero y Abril de 2011 de forma transversal a través de un evento de difusión del estudio en AVAFI (Asociación Valenciana de Afectados de FM), en el que se informó detalladamente de los objetivos del estudio y de los análisis necesarios para la ejecución del mismo. Los enfermos de FM/CSF previamente diagnosticados por sus facultativos especialistas de departamento (FED) interesados en participar lo hicieron acudiendo a las Clínicas Universitarias de la Universidad Católica de Valencia “San Vicente Mártir” en las fechas anunciadas.

Se les facilitó una hoja informativa del estudio (Anexo II) y a todos aquellos que tras ser informados aceptaron participar en el estudio se les pidió firmar el correspondiente consentimiento informado (Anexo III), existiendo en todo momento a su disposición la revocación del mismo si lo deseara (Anexo IV) así como la firma del consentimiento informado para la donación de sangre para el biobanco de investigación de la Universidad Católica de Valencia (Anexo V).

Los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes fueron los siguientes:

4.1.1 Criterios de inclusión

Sujeto mayor de 18 años, con diagnóstico previo de FM/SFC según los criterios descritos por el Colegio Americano de Reumatología (8), con una historia de dolor generalizado y dolor en determinados puntos anatómicos a la palpación digital.

El dolor es considerado generalizado cuando hay dolor en el lado derecho e izquierdo del cuerpo y dolor por encima y por debajo de la cintura. Además debe haber dolor en esqueleto axial (columna cervical, o región anterior del tórax, o columna dorsal, o parte inferior de la espalda). En esta definición el dolor de hombro y nalga se considera

dentro de dolor del lado derecho o izquierdo del cuerpo. Dolor en parte baja de la espalda se considera como dolor del segmento inferior.

Existe dolor a la palpación digital, debe estar presente en al menos 11 de los 18 puntos sensibles siguientes:

- Occipital: Bilateral. En las inserciones del músculo suboccipital.
- Cervical inferior: Bilateral. En las porciones anteriores de los espacios interapofisarios transversos de C5- C7.
- Trapecio: Bilateral. En la mitad del borde superior.
- Supraespinoso: Bilateral. En su origen, encima de la espina de la escápula cercano al borde medial.
- 2^a costilla: Bilateral. En la 2 unión costo-condral justamente lateral en relación a las uniones de las superficies localizadas por encima.
- Epicóndilo lateral: Bilateral, 2 cm distal a los epicóndilos.
- Glúteo: Bilateral. En el cuadrante supero-externo de nalga, en el pliegue anterior del músculo.
- Trocánter mayor: Bilateral, posterior a la prominencia trocantérea.
- Rodilla: Bilateral. En la bolsa adiposa medial próxima a la línea articular.

La palpación digital debería llevarse a cabo con una fuerza aproximada de 4 Kg. Para que el punto sensible pueda ser considerado positivo, el paciente tiene que indicar si aquella palpación que es dolorosa. Sensible no debe ser considerada dolorosa.

El paciente con FM debe cumplir ambos criterios de dolor generalizado y puntual a la palpación. El dolor generalizado debe estar presente por lo menos 3 meses. La presencia de una segunda enfermedad clínica no excluye el diagnóstico de FM.

Se requirió que el diagnóstico de los pacientes de FM/SFC participantes en el estudio hubiera incluido una analítica completa de descarte de origen alternativo de sus dolencias: hemograma completo con recuento diferencial de leucocitos, proteína C reactiva, factor reumatoide, alanina aminotransferasa, albúmina, fosfatasa alcalina, aspartatoaminotransferasa, bilirrubina total, calcio, dióxido de carbono, cloro, M. García Escudero

creatinina, glucosa, potasio, proteínas totales, sodio, nitrógeno ureico, TSH, T3 libre, T4 libre, tiroglobulina, CMV ac. IgG, HBcAc, HBsAc, Hepatitis C.

4.1.2 Criterios de exclusión

Sujeto menor de 18 años con existencia de Síndrome de dolor asociado, existencia de otras enfermedades reumatólogicas o de otra enfermedad grave y no asociada a FM/SFC.

Los participantes sanos fueron sujetos donantes del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana mayores de 18 años, apareados por edad con un margen de 5 años a los enfermos, sometidos a selección por los procedimientos habituales de despistaje de los Centros de Transfusión en sus campañas de hemodonación, empleando como muestra biológica los buffy-coats procedentes de las bolsas de donación. El número de participantes sanos fue de 79.

La confidencialidad de los participantes se ha mantenido en todo momento de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal. Para ello se les asignó a cada uno de los pacientes un código numérico que correlativamente se asignaron a todas las fracciones que derivaran de esa muestra.

4.2 Confirmación de diagnóstico y pruebas adicionales a las que fueron sometidos los pacientes participantes

El diagnóstico de FM de los participantes de este estudio fue confirmado mediante la entrevista, toma de datos que se incluyeron en una base Access con historia clínica y exploración médica física consistente en la palpación digital y confirmación del dolor en al menos 11 de los 18 puntos sensibles, de acuerdo a las exigencias del Colegio Americano de Reumatología (8) ya detalladas en párrafos anteriores.

Adicionalmente la confirmación de diagnóstico de FM tras la valoración clínica de su médico de los centros de salud de procedencia incluyó las puntuaciones obtenidas de la evaluación de los participantes mediante cuestionarios psicométricos validados.

Concretamente los cuestionarios psicométricos que se utilizaron fueron:

- a) Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) o Cuestionario Impacto FM (26, 36) (Anexo VI).
- b) Cuestionario Multidimensional de Fatiga (MFI) para la evaluación de fatiga según la Escala de Intensidad de Fatiga (EIF) diseñada por Krupp y cols (165) (Anexo VII).
- c) Cuestionario de salud y bienestar (SF36) (166) (Anexo VIII).

4.3 Toma de muestra, procesamiento y almacenaje

4.3.1 Toma de muestra

La toma de sangre única de los enfermos de FM/SFC participantes consistente en un volumen final de aproximadamente 10 cc/paciente, se realizó mediante punción intravenosa en 2 tubos Vacutainer conteniendo, cada uno de ellos, 170 IU de heparina de litio como anticoagulante (BectonDickinson BD 365725).

Como mencionado, todas las muestras se extrajeron previo consentimiento informado y fueron procesadas en tiempos inferiores a 2 h tras su extracción, manteniendo las muestras a temperatura ambiente (TA) durante el periodo previo a su procesamiento.

En el caso de muestras control el volumen de buffy-coats fue superior a 20cc/donante. Igualmente las muestras fueron procesadas dentro de las 2 h siguientes a su recolección en el Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, manteniendo las muestras a TA hasta el momento de su procesamiento.

4.3.2 Fracciones obtenidas a partir de las muestras

4.3.2.1 Aislamiento de ADN genómico

Tras invertir el tubo de cada una de las muestras de pacientes un par de veces, se tomaron cuatro alícuotas de 600 µl cada una. Dos de ellas se congelaron a -80 °C y las 2 restantes se procesaron de inmediato utilizando el Wizard Genomic ADN Purification kit (cat#A1125; Promega) siguiendo a las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron volúmenes equivalentes de buffy-coats para la preparación de ADN genómico de sujetos control. Así mismo se dispuso de alícuotas idénticas para ser mantenidas también a -80°C.

Se lisaron las células en 3 volúmenes de Cell Lysis Solution mezclando por inversión e incubando a TA durante 10 minutos. Los núcleos fueron aislados mediante centrifugación a 14000 rpm durante 20 segundos a TA en una microcentrífuga de mesa. Tras decantar el sobrenadante los pellets blancos de núcleos se lisaron en 1 volumen de Nucleic Acid Solution pipeteando hasta aumentar la viscosidad del medio, indicativo de lisis nuclear. El RNA contaminante fue eliminado por tratamiento con RNase A Solution e incubación 15 minutos a 37°C. Las proteínas contaminantes fueron eliminadas por precipitación utilizando 1/3 del volumen de partida del reactivo Protein Precipitation Solution y vigorosa agitación mediante uso de vortex, seguida de una centrifugación a 14000 rpm durante 3 minutos a TA. El ADN genómico fue obtenido por precipitación añadiendo 1 volumen de isopropanol al sobrenadante de la etapa anterior, mezclando por inversión y centrifugando de nuevo a 14000 rpm durante 1 minuto a TA. En esta etapa es posible observar las hebras de ADN precipitando.

El pellet fue lavado con 1 volumen de etanol al 70% y centrifugando a 14000 rpm durante 1 minuto a TA. El ADN fue deshidratado por incubación a TA durante 10-15 min, seguido de su rehidratación en 100 µl de ADN rehydratation solution con ayuda de aumento de temperatura, mediante incubación a 65°C durante 1 hora.

El rendimiento ADN genómico obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND 2000c de la casa comercial Thermo Scientific, midiendo su absorbancia a longitud de onda 260 nm y tras ajustar la su concentración a una concentración final de 200 ng/µl fue almacenado a 4°C hasta su uso para evitar rotura de las hebras de ADN por ciclos de congelación-descongelación. Para prevenir la deshidratación de la muestra se utilizaron tubos eppendorf de cierre hermético.

Las alícuotas de sangre cruda y las alícuotas de buffy-coats congelados se procesaron según necesidad del proyecto siguiendo el protocolo descrito.

4.3.2.2 Obtención de Plasma y aislamiento de PBMCs o células mononucleares de sangre periférica.

Para el aislamiento de los PBMCs se utilizó hasta un máximo de 17,5 cc/paciente o buffy-coat fue diluido en relación 1:1 en volumen, en solución tampón PBS (phosphate buffered saline) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4) y colocado con cuidado sobre un colchón de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare) (densidad 1.078 g/ml) para permitir el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica al centrifugar la mezcla a 500g durante 30 minutos en un rotor basculante (Eppendorf REF ROTOR HL052 06947) a TA, teniendo cuidado de eliminar el freno para conseguir una separación de fases bien definidas, como previamente descrito por Demettre *et al.*, en su artículo, Ribonuclease L proteolysis in peripheral blood mononuclear cells of chronic fatigue syndrome patients (92).

Durante la centrifugación los hematíes y neutrófilos atraviesan el Ficoll separándose de los linfocitos, monocitos y el plasma que queda flotando sobre la capa de células mononucleares o PBMCs.

Se alicuotó el plasma en criotubos y tras su etiquetado se conservaron a -80°C. El anillo o capa de mononucleares se aspiró con cuidado con una pipeta de calibre amplio y se colocó en un tubo limpio de 15 ml para proceder a la lisis de posibles eritrocitos contaminantes. Para ello se incubaron sobre hielo con 1 volumen de tampón de lisis de eritrocitos buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, pH 7.4, 0.1 mM EDTA) durante 5 minutos, y se centrifugaron de nuevo a 500g durante 10 minutos a TA, esta vez ya con frenado del rotor, para eliminar en el sobrenadante los deshechos de rotura, como descrito previamente.

Finalmente los PBMCs se sometieron a dos lavados en solución tampón PBS (1 volumen) mediante resuspensión seguida de centrifugación a 300g 15 minutos a TA.

Los pellets se resuspendieron en medio de congelación consistente en una mezcla de suero fetal bovino (FBS) al 90% y dimetil-sulfóxido (DMSO) al 10% como agente crioprotector. Para el conteo de células viables, se tomó una muestra de 10 µl en Trypan Blue al 50% y se procedió al contaje en una cámara de Neubauer. Se ajustó la concentración de PBMCs a 10^7 células/ml tras su alicuotado en crioviales de 0,5 ml se almacenaron a -150°C hasta su uso.

Estos procedimientos fueron realizados en condiciones de esterilidad utilizando una campana de cultivos AV-100 Telstar Ref: 23812 con lámpara ultravioleta.

4.3.2.3.- Obtención de proteínas totales de PBMCs

Para la extracción de proteínas totales se utilizó el reactivo Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER cat# 78501, Thermo Fisher) su combinación de detergentes en un tampón de bicina 25 mM a pH 7,6 permite la extracción efectiva de proteínas citoplásmicas y nucleares de células en cultivo o en suspensión. Adicionalmente su sencilla composición permite que los extractos de proteínas sean compatibles con otras aplicaciones posteriores tal como la cuantificación por reactivo de Bradford.

Se utilizaron 5×10^6 PBMCs por cada 0,5 ml de reactivo M-PER, bien PBMCs en fresco bien el pellet obtenido tras descongelar una de las alícuotas conservadas a -150 °C de forma rápida en un baño a 37 °C y lavar en 2-5 vol de 1X PBS centrifugando a 300g durante 15 minutos. Siguiendo las instrucciones del fabricante y tras suplementar el reactivo M-PER con el cocktail inhibidor de proteasas Halt Protease Inhibitor cocktail a concentración 1X (AEBSF•HCl 1 mM; Aprotinin 80 nM; Bestatin 5 µM; E-64 1,5 µM; EDTA 5 mM; Leupeptin 2 µM y Pepstatin A 1 µM) se procedió a la lisis celular mediante incubación a TA en una plataforma de agitación durante 10 minutos. En caso de observar alta viscosidad en los extractos se les sometió a 3 pulsos de 3 segundos cada uno en un sonicador 250CE Digital Branson Ref: BBR10113056A, teniendo la precaución de enfriar el extracto entre pulsos.

Los extractos se separaron del material de debris mediante centrifugación a 14000 rpm en una centrífuga de mesa Eppendorf, Sorvall Legend Micro 21R Fisher Scientific Ref: 75002445 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a ependorfs sobre

hielo y se cuantificaron siguiendo las indicaciones del fabricante del reactivo ThermoScientific™ Pierce™ Coomassie Plus™ (Bradford) Protein Assay (cat# PI-23236, ThermoScientific) sobre la curva patrón preparada con el standard de sero-albúmina bovina (BSA) incluida en el kit, todo ello midiendo absorbancia a longitud de onda 595 nm de la mezcla indicada de extracto con reactivo Bradford en un Nanodrop ND 2000c de la casa comercial ThermoScientific. Tras su cuantificación la concentración de proteínas fue ajustada a 10 µg/µl en M-PER. Los extractos se alicuotaron en volúmenes de 20-50µl/vial y se conservaron a -80°C hasta su uso.

4.4 Obtención de ADN genómico de ratón

Se utilizó el kit de preparación de ADN genómico a partir de sangre cruda Wizard Genomic ADN Purification kit (cat#A1125; Promega) según descrito en el apartado 3.3.2.1, utilizando 600 µl de sangre de cola de ratón cepa C57BL7. Su cuantificación y conservación fue idéntica a lo descrito para las fracciones de ADN genómico humano en secciones anteriores.

4.5 Amplificaciones de secuencias provirales mediante PCR anidada

4.5.1 Diseño de primers para la amplificación de secuencias XMRV

Se diseñaron los primers necesarios para detectar la presencia de secuencias provirales del novedoso virus XMRV mediante la técnica de amplificación de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) en la región génica viral *env* del mencionado virus.

A fin de permitir la detección de variantes del XMRV en nuestros pacientes, tales como las descritas por Lo et al. para el virus MLV (86), altamente relacionado con el XMRV, se pasó a alinear las secuencias de ambos virus, en concreto las secuencias de Genbank Accession numbers:DQ399707 y U13766 codificantes del aislado vp62 del XMRV y de la cepa MCF1233; Mink cellfocus-forming 1233 del MuMLV virus respectivamente; y se seleccionaron las regiones más conservadas dentro del gen de la proteína env (correspondiente a las secuencias comprendidas entre posiciones 5754 y 7691 del genoma del virus XMRV y posiciones 5788 y 7713 del MLV), ver el

alineamiento genético del XMRW y MLV (Anexo IX).

Para el alineamiento de secuencias nucleotídicas se utilizó el programa “Align” (megablast) (168) desarrollado por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) (169) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. [Monografía en internet]. Nucleic Acids Res. 2014 Jan 1;42(1):D7-D17. [Acceso 22 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Para el diseño de primers en esta región del gen *env* se utilizaron los programas informáticos: Primer designing Tool Primer Blast NCBI. [Monografía en internet]. [Acceso 26 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3060828/> y la herramienta gratuita de confección de primers Oligo Analyzer 3.1 de nuestro proveedor, la empresa Integrated ADN Technología (IDT). [Monografía en internet]. [Acceso 26 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://eu.idtADN.com/analyizer/Applications/OligoAnalyzer/>, teniendo en cuenta las recomendaciones para su diseño que se recogen en el anexo de información complementaria al diseño de primers (Anexo X).

Como indica la Tabla 8 el set de primers utilizado para la primera amplificación por PCR fueron XMRV-*env*-outer-F y XMRV-*env*-outer-R y el set utilizado en la segunda amplificación o PCR anidada del gen *env* incluyó los primers XMRV-*env*-inner-F y XMRV-*env*-inner-R.

En las amplificaciones de otras regiones del virus, como la región *gag* se utilizaron primers previamente descritos por otros autores. Esto incluye el set de primers compuesto por: 419F y 1154R como outer primers y los 2 inner sets correspondientes a los primers GAG-I-F y GAG-I-R por un lado y los primers NP116 y NP117 por otro, tal como indica la Tabla 8.

Tabla 8: Relación de primers utilizados

Primer	Secuencia	Tm (°C)	Virus/gen amplificado	Referencia	Tamaño I Fragmento
XMRV-env-outer-6156-F	5'-TGTGAGACCACTGGACAGGC-3'	59.3	XMRV/ <i>env</i> [Genbank: accession DQ399707]	(170)	973 bp
XMRV-env-outer-7129-R	5'-GTAAGTCCTCCAACAGCAG-3'	55.3			602 bp
XMRV-env-inner-6334-F	5'- ACGCGGGTAAAGGGCCAGC-3'	63.3			
XMRV-env-inner-6936-R	5'-AAGCCCAAATGGTCCCAGCG-3'	63.5			
419F	5'ATCAGTTAACCTACCGAGTCGGAC-3'	59.6	XMRV/ <i>gag</i> [Genbank: accession DQ399707]	(93)	730 bp
1154R	5'-GCCGCCTCTTCATTGTTCTC-3'	58.2			410 bp
GAG-I-F	5'-TCTCGAGATCATGGACAGA-3'	54.7			
GAG-I-R	5'-AGAGGGTAAGGGCAGGGTAA-3'	57.7			
NP116	5'-CATGGGACAGACCGTAACTACC-3'	56.9	(86)	380 bp	
NP117	5'-GCAGATCGGACGGAGGTG-3'	60.4			
HTLV II outer-F	5'-CTAGCCTCCAAGCCAGCCACC-3'	64.5	HTLV-2 subtype b4/LTR region [Genbank: accession AF412314]	(119)	868 bp
HTLV II outer-R	5'-CCAGTGGTGGGTGATAGCCC-3'	60.2			802 bp
HTLV II inner-F	5'-CGAGTCATCGACCCAAAAGGTC-3'	57.8			
HTLV II inner-R	5'-GGAGTTGGGAAAGCCCGTGG-3'	63.1			
IAP-F	5'-ATAATCTGCGCATGAGCCAAGG-3'	57.9	Murine intracisternal A particle (IAP) long terminal repeat ADN [Genbank: accession FJ854357]	(94)	Genomic ADN. Sizes ranging between 236-312 bp
IAP-R	5'-AGGAAGAACACACAGACCAGA-3'	57.8			
h-β-actin F	5'-ATATGCCCGCGCTCGTCGTC-3'	62.3	Human β-actin gene [Genbank: accession NG_007992]	(170)	Genomic ADN 416 bp
h-β-actin R	5'-GAGCCACACGCACTCATTG-3'	59.3			mRNA 281 bp
hGAPDH-F	5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	57.3	-Human genomic X chromosome GRCh37.p10 contig sequence between positions 2499130 and 2498903 -Human GAPDH transcript variant 1, mRNA [Genbank: accession NM_002046]	(93)	Genomic ADN 227 bp
hGAPDH-R	5-GGAAGATGGTATGGGATTTC-3'	53.3			mRNA 228 bp

4.5.2 Diseño de primers para la amplificación de secuencias HTLV-2

Los primers utilizados para la detección de secuencias genómicas provirales HTLV-2 fueron los previamente descritos por Toro *et al.* (119) que, mediante PCR anidada amplifican secuencias de la región LTR (long terminal repeats) y gen gag del virus de tamaños 868 y 802 bp respectivamente en primera PCR y PCR anidada respectivamente, conteniendo las secuencias detalladas en la Tabla 8.

4.5.3 Amplificación por PCR anidada del virus XMRV

Las reacciones de PCR anidada se realizaron de acuerdo a los protocolos previamente descritos (86, 93, 170) con algunas modificaciones. En la primera reacción de amplificación por PCR el volumen final fue de 50 µl, conteniendo 1 µg de ADN genómico con el fin de incrementar la sensibilidad de detección de la región específica buscada, y los siguientes componentes: tampón Green Go Taq Flexi del proveedor Promega a una concentración final 1X, MgCl₂ a una concentración de 2,5 mM, dNTPs a la concentración de 0,2 mM/cada uno, los primers correspondientes forward y reverse a una concentración de 1 pmol/µl cada primer y 2,5 unidades de la enzima Go Taq Flexi ADN polymerase (Promega). La mezcla también incluyó DMSO al 5 % para facilitar la apertura de la doble hebra de genómico.

Los ciclos de amplificación a los que fueron sometidas las muestras consistieron en un único ciclo inicial de apertura del ADN genómico calentando a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación cada uno de ellos consistiendo en una fase de apertura del ADN amplificado calentando a 94°C durante un minuto, seguido de la fase de apareamiento de los primers a 55°C durante 30 segundos y un ciclo de amplificación o polimerización a la temperatura óptima de la enzima *Taq* a 72°C durante 1 minuto. Todo ello seguido de un único ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos que permita la completa amplificación de los productos de PCR.

La segunda PCR o PCR anidada propiamente dicha contenía de 1/10 del volumen de amplificación de PCR producto de la primera amplificación como ADN diana y los mismos componentes mencionados para la primera amplificación a excepción del DMSO. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron también similares a las descritas para la primera PCR incluyendo los siguientes ajustes: el número de ciclos fue de 45 y la temperatura de apareamiento de primers (temperatura de annealing) fue de 55 a 60 °C según la Tm del set de primers utilizado (ver Tabla 8).

Como control de amplificación positivo del virus XMRV se utilizó el constructo del aislado vp62 del virus XMRV en el plásmido pcADN3.1 obtenido del repositorio gratuito AIDS Research and Reference Reagent Program (Cat# 11881) amablemente cedido por el Dr. Silverman el Instituto de Investigación Lerner, Cleveland, OH (USA) (93).

Como control negativo se utilizaron todos los componentes de una reacción excepto del ADN diana, es decir el ADN genómico.

Las muestras fueron ensayadas en formato de mezclas master mix en sets de 20 a fines de minimizar los sesgos por pipeteo entre tubos.

4.5.4 Amplificación por PCR anidada del virus HTLV-2

Las condiciones de amplificación para las secuencias del virus HTLV-2 fueron las mismas que previamente describió el equipo de Toro et al. (119) con la excepción de que las temperaturas de apareamiento de primers fueron reducidas a 55 °C a fines de permitir amplificación de variantes del virus (condiciones permisivas de amplificación). Como control `positivo de amplificación del virus HTLV-2 se utilizó ADN genómico de un paciente previamente diagnosticado con la infección del virus pero que no padecía FM, material amablemente cedido por los Doctores Soriano y Treviño del Hospital Carlos III de Madrid y, en el caso de las PCR anidadas se utilizó un constructo del producto de amplificación de esta ADN genómico con los primers HTLV-II inner

Forward y Reverse en el plásmido pGEM-T-Easy (Promega) obtenido por subclonación en este proyecto y depositado en el NIH AIDS Reagent Program para que pueda servir de referencia a futuras investigaciones del virus huérfano HTLV-2 (ver Anexo XIII).

Igualmente el material de partida de estas amplificaciones consistió en ADN genómico de pacientes o sujetos control en la cantidad de 1 µg/reacción inicial.

Como control negativo se utilizaron todos los componentes de una reacción excepto del ADN diana, es decir el ADN genómico.

Las muestras fueron ensayadas en formato de mezclas master mix en sets de 20 a fines de minimizar los sesgos por pipeteo entre tubos.

4.6 Amplificaciones de secuencias genómicas mediante PCR

4.6.1 Diseño de primers para la amplificación de secuencias presentes en el genoma humano

Los primers utilizados para amplificar la secuencia del gen de expresión constitutiva (housekeeping) β-actina, fueron diseñados en el presente estudio en la región de su segundo exón. La amplificación con este set de primers a partir de ADN genómico debe rendir un producto de 416 bp mientras que la retrotranscripción y posterior amplificación a partir de ARN debe producir un fragmento carente de la secuencia intrónica en esta región y por tanto de menor tamaño (281 bp)(ver Tabla 8).

Los primers utilizados para amplificar la secuencia del gen de expresión constitutiva (housekeeping) GAPDH fueron adaptados del trabajo de Silverman (93) estos primers amplifican este gen por retrotranscripción sin embargo también amplifican una región del ADN genómico humano correspondiente a la región del cromosoma X entre posiciones 2499130 y 2498903 rindiendo un producto de tamaño similar (ver Tabla 8) no permitiendo distinguir por tanto si el producto de amplificación deriva de ADN genómico o ARN en el caso de incluir transcriptasa reversa en la reacción.

4.6.2 Diseño de primers para la detección de IAPs contaminación murina

En la evaluación de contaminación de ADN genómico murino se utilizaron los primers descritos por el grupo de Robinson *et al.* (94) para buscar la presencia de IAPs (Intracisternal A Particle) en nuestras muestras de ADN genómico humano, ver Tabla 8. El tamaño esperado de los fragmentos de ADN amplificados por PCR es de aproximadamente entre 200 y 300 bp para los primers propuestos.

Todos los primers fueron sintetizados por el proveedor IDT (Integrated ADN Technologies) en calidad de primers desalados.

4.6.3 Amplificación por PCR de secuencias genómicas

Las condiciones utilizadas para la amplificación de secuencias genómicas de ADN humano consistieron en condiciones estándar de PCR. En concreto se utilizaron 50–100 ng de ADN genómico de pacientes o de sujetos control en tampón Green GoTaqFlexi del proveedor Promega a una concentración final 1X, MgCl₂ a una concentración de 2,5 mM, dNTPs a la concentración de 0,2 mM/cada uno, los primers correspondientes forward y reverse a una concentración de 1 pmol/μl cada primer y 2,5 unidades de la enzima Go Taq Flexi ADN polymerase (Promega). La mezcla también incluyó DMSO al 5 % para facilitar la apertura de la doble hebra de genómico. Las condiciones fueron un ciclo inicial de desnaturación a 95°C durante 3 minutos seguido de 30 ciclos de los 3 segmentos siguientes: desnaturación a 95°C durante 30 segundos, apareamiento a 55°C durante 30 segundos y amplificación a 72°C durante 30 segundos, y un ciclo final de amplificación a 72°C durante 2 minutos.

Como control negativo se utilizó una reacción carente de ADN genómico.

4.6.4 Amplificación por PCR de secuencias IAP

Las condiciones de amplificación utilizadas para la detección de secuencias IAP contaminantes fueron idénticas a las previamente descritas por Robinson *et al.* (94) consistentes en un ciclo inicial a 94°C, 8 minutos, seguido de 35 ciclos de las siguientes

3 etapas: 94°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 20 segundos y un ciclo final de 7 M. García Escudero

minutos a 72°C. Las mezclas de amplificación consistieron en 1 µg de ADN genómico de pacientes o de sujetos control en tampón Green Go Taq Flexi del proveedor Promega a una concentración final 1X, MgCl₂ a una concentración de 2,5 mM, dNTPs a la concentración de 0,2 mM/cada uno, los primers correspondientes forward y reverse a una concentración de 1 pmol/µl cada primer y 2,5 unidades de la enzima Go Taq Flexi ADN polymerase (Promega). La mezcla también incluyó DMSO al 5 % para facilitar la apertura de la doble hebra de genómico.

Como control positivo se utilizó 0,1-1 ng de ADN genómico de ratón junto con 1 µg de ADN genómico humano de un sujeto control. Como control negativo se utilizó una reacción carente de ADN.

Todas las amplificaciones por PCR fueron optimizadas previo inicio de cribado en concreto se evaluaron diferentes concentraciones de cloruro de magnesio (0-5 mM) y de DMSO (0-10%). Adicionalmente la sensibilidad de los ensayos para la detección de secuencias provirales y de ADN contaminante de ratón fue titulada mediante diluciones seriadas de las secuencias diana utilizadas como control positivo en cada caso particular.

4.7 Visualización de ADN

4.7.1 Visualización de ADN genómico

La integridad del ADN genómico aislado fue corroborada mediante visualización de la banda mayoritaria tras su separación a 90-100 V 1-2 horas en gel de agarosa MS (cat# 11816586001, Roche) 0.8-1% en tampón 1x TAE (40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA pH 8,0) (cat# TA0010, Scharlau) contenido el intercalante real safe Ref: RBMSAFE y comparación al marcador de peso molecular lambda phageHindIII ADNmarker (Biotoools).

4.7.2 Visualización de los productos de PCR

El tamaño de los productos de amplificación de ADN por PCR y PCR anidada fue determinado mediante su resolución en gel de agarosa al 1-2% sometidos a un voltaje M. García Escudero

constante de 90-100 V durante 1-2 horas en tampón 1x TAE (40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA pH 8,0) (cat# TA0010, Scharlau) contenido el intercalante real safe Ref: RBMSAFE y comparación al marcador de peso molecular 100 bp laddermarker, PCR markers (cat# G210A, G316A, Promega) y/o marker XIII (cat# 11721925001, Roche).

4.8 Purificación, subclonación y secuenciación de fragmentos de ADN

Aquellas muestras cuyas bandas al correr el gel de agarosa al 2%, presentaron un peso molecular semejante al de la secuencia del virus XMRV o HTLV-2, se corrieron de nuevo en un gel de agarosa al 1% con el fin de obtener una buena recuperación de ADN. Siguiendo las indicaciones del fabricante del Kit GEN ELUTE agarose Spin Column con referencia 56500-70EA de la casa comercial SIGMA, se aisló el ADN contenido en las bandas de interés, se subclonaron en el vector pGEM-T-Easy de la casa comercial Promega y se secuenciaron en los servicios externos de la Unidad de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia y de la Unidad de Genómica del CIPF (Centro de Investigaciones Príncipe Felipe) de Valencia utilizando los primers T7 forward y SP6 reverse. Las secuencias obtenidas fueron alineadas a las secuencias nucleotídicas no repetitivas de la base de datos Genbank utilizando el programa BLAST (Basic local alignment search tool) at the NCBI (174) para su identificación.

La subclonación se efectuó utilizando el sistema de ligación rápida desarrollado por la casa Promega (pGEM-T Easy vector system II cat# A3610) basado en el principio de extremos complementarios TA del vector con extremos T y el producto de PCR. La reacción de ligación fue utilizada para la transformación de bacterias *Escherichia coli* cepa JM190 termo-competentes por choque de calor a 42 °C durante 45 segundos y posterior recuperación en medio SOC a 37°C durante 1 hora.

Los transformantes fueron seleccionados en placas LB suplementadas con el isómero de la lactosa IPTG (isopropil-β-D-1-thiogalactopyranoside) 0.1 mM y el substrato de la

enzima beta-galactosidasa X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-galactopyranoside) 40 μ g/ml y ampicilina a una concentración final de 75 μ g/ml.

Se preparó plásmido a partir de las colonias de color blanco (con inserto) inoculando cada colonia en 3 ml de LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 75 μ g/ml y creciendo el cultivo a saturación durante 12-16 h a 37°C. El ADN plásmido fue aislado utilizando el kit PureYield™ PlasmidMiniprepSystem (cat# 1222, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El rendimiento y pureza del ADN recombinante obtenido se midió en un NanoDrop 2000c spectrophotometer de ThermoScientific registrando las absorbancias a longitud 260 y 280 nm.

Se comprobó que efectivamente el tamaño del inserto correspondía al tamaño del fragmento purificado mediante restricción de enzimas y resolución de fragmentos en agarosa, en concreto se utilizó la enzima *EcoRI-HF* (High Fidelity) cuyo sitio de restricción se halla presente en ambos lados del punto de sublonación del vector, según las indicaciones del fabricante (R3101S, New England Biolabs), antes de que el clon fuera seleccionado para su secuenciación.

4.9 Análisis de expresión de la RNasa L mediante análisis por Western Blot

Se utilizaron 50 μ g de extractos de proteínas totales preparadas a partir de PBMCs de pacientes participantes o de sujetos control y se separaron mediante electroforesis en base a su peso molecular en geles desnaturalizantes discontinuos de poliacrilamida al 10-12% (SDS-PAGE) en solución tampón Tris bajo condiciones reductoras según previamente descrito por Laemmli (175) utilizando el sistema de minigeles Mini-PROTEAN Electrophoresis System de Bio-Rad Laboratories Inc. sometido a un voltaje de 150 V durante aproximadamente 120 minutos.

Tras su separación las proteínas fueron electrotransferidas a membranas PVDF (PolyvolidineFluoride) con tamaño de poro de 40 μ m Amersham Hybond-P PVDF Transfer Membrane General Electric Ref: RPN303F previamente activadas en 100% metanol, en tampón Tris 25 mM Glicina 192 mM 0,1% SDS 20% metanol pH 8,0 a 100

V durante 1 hora a 4°C. Las membranas fueron bloqueadas en tampón PBST (1X Phosphate buffer saline 0,1 % Tween) conteniendo leche desnatada al 5% durante 2-16 h. A continuación se añadió el anticuerpo primario específico de RNaseL, en concreto se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón producido con la proteína humana completa RNase L Antibody (2E9.2G5) (cat# sc-23955, Santa Cruz Technologies) a una concentración de 1 µg/ml (dilución 1:200) y se incubó por al menos 1 hora a TA en agitación suave.

Tras varios lavados(3-4) (20 ml) con PBST 1X para eliminar el exceso de anticuerpo primario la membrana se sometió a incubación con el anticuerpo secundario, en concreto el anticuerpo anti-IgG de ratón producidos en cabra conjugado a la enzima horse radish peroxidase (HRP) (goat anti-mouse IgG-HRP, cat # sc-2005, Santa Cruz Technologies) a una concentración de 0,4 µg/ml (dilución 1:5000)en PBST con 5 % de leche desnatada durante al menos 1 hora a TA en el mismo sistema de agitación. Tras repetir los lavados para eliminar el exceso de anticuerpo secundario la membrana se incubó con el substrato quimioluminiscente (0,1 ml/cm²) a TA durante 2 minutos y se registró la luminiscencia obtenida en un sistema Image Quant modelo LAS4000 (General Electric) para su posterior cuantificación. La cuantificación de la señal se obtuvo mediante registro densitométrico del área correspondiente al pico de luminiscencia obtenido.

La abundancia relativa de la banda proteolizada o de pequeño tamaño (37 kDa) de RNaseL frente a la forma intacta o de gran tamaño (83 kDa) se obtuvo determinando el cociente de las señales de luminiscencia generadas en cada una de las posiciones de las membranas correspondientes a los mencionados pesos moleculares, en el área de idénticas dimensiones correspondiente a la señal obtenida y fue expresada en porcentajes.

La posición de las bandas se determinó de acuerdo a su posición relativa con respecto al marcador de peso molecular de proteínas ColorPlus™ Prestained Protein Marker, BroadRange (7-175 kDa) (cat # P7709V, New England Biolabs).

4.10 Análisis estadístico

La abundancia relativa de la forma truncada de la RNasa L de 37 kDa con respecto a la forma íntegra de 83 kDa en extractos de PBMCs de pacientes de FM/SFC fue comparada a la abundancia relativa de esas mismas formas en extractos similares de participantes sanos mediante la prueba estadística no paramétrica Mann-Whitney U Test, utilizando el software SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp). Este mismo software se utilizó para el resto de las determinaciones estadísticas incluidas en este estudio.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmación del diagnóstico de FM y fatiga crónica de los participantes

5.1.1 Exploración médica física: Se confirmó que el 100% de los pacientes previamente diagnosticados de FM en su correspondiente centro médico, presentaban activos como mínimo 11 de los 18 puntos sensibles al dolor del mapa corporal (Figura 1), con una mediana de 14 puntos (rango 11-18), condición esencial de diagnóstico según definición del Colegio de Reumatólogos Americano (ACR) (8).

5.1.2 Historia clínica: Se elaboró una base de datos Access (disponible como material suplementario en la versión digital del actual manuscrito) en la que se recogieron datos clínicos del paciente que guardaban relación con la clínica, sintomatología y curso de la enfermedad. Este tipo de archivos permite organizar los datos recogidos, facilitar su análisis y servir de referencia para posteriores estudios.

La confirmación de diagnóstico se complementó con los datos psicométricos obtenidos de tres cuestionarios:

1. El Cuestionario de Impacto de FM (FIQ) (26, 36) cuya media (70.01 ± 10.85) (rango 26-98) (ver tabla 8), muestra una afectación moderada-alta en el impacto de la FM de la muestra estudiada.
2. El Cuestionario Multidimensional de Fatiga (MFI) (165) cuya media 18.36 ± 2.35 (rango 7-20) indica fatiga general acentuada de los participantes con un mayor predominio de fatiga física: media 17.29 ± 2.81 (rango 8-20) que mental: media 14.74 ± 4.32 (rango 4-20) (ver tabla 8); y puntuaciones más moderadas en Reducción de la actividad, Reducción de Motivación y Fatiga Mental. En general los resultados muestran que hay una mayor afectación en la percepción del componente físico de fatiga respecto al componente psicológico.

3. Cuestionario de Salud SF-36 (166) cuyos resultados (ver tabla 9); reflejan que de las 8 dimensiones que recoge el SF-36, el área más afectada es la de Vitalidad, seguida de la de Dolor Corporal. El área menos afectada sería la dimensión de Salud Mental y Rol emocional, lo que coincide con las puntuaciones obtenidas en el MFI.

Tabla 9: Descriptivos de los cuestionarios. Puntuaciones máximas y mínimas, medias y desviaciones típicas de las variables recogidas en el MFI, FIQ y SF36

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
FIQ.TOTAL	76	26,2	97,9	70	16,8
MFI.Fatiga.General	76	7	20	18,3	2,3
MFI.Fatiga.Física	76	8	20	17,2	2,8
MFI.Reducción.Actividad	76	4	20	14,8	4,4
MFI.Reducción.Motivación	76	4	20	13,2	4,1
MFI.Fatiga.Mental	76	4	20	14,7	4,3
SF36.Función.Física	76	0	80	37	19,8
SF36.Rol.Físico	76	0	100	26,3	25
SF36.Dolor.Corp	76	0	70	22,1	19,2
SF36.Salud.General	76	5	80	28,4	15,9
SF36.Vitalidad	76	0	87,5	16,8	17,6
SF36.Función.Social	76	0	100	40,1	31,1
SF36.Rol.Emocional	76	0	100	50,4	33,6
SF36.Salud.Mental	76	0	85	45,6	22,5

El promedio de sufrimiento de FM entre los pacientes participantes fue de 17 años (rango 0-40 años) y el 52% de ellos participaban en programas de ayuda por discapacidad en el momento de participación en el estudio.

5.2 Determinación de la presencia de secuencias del provirales XMRV en el ADN genómico de pacientes de FM y participantes sanos

Los ADN genómicos de pacientes y controles obtenidos según descrito en materiales y métodos, fueron sometidos a análisis por PCR anidada para determinar la posible presencia de secuencias virales XMRV integradas en su genoma. Como paso previo al inicio de amplificación del ADN por PCR se comprobó que el ADN genómico obtenido de pacientes y controles sanos a utilizar como molde en las amplificaciones no se hallaba degradado ni contenía impurezas que pudieran inhibir las reacciones de amplificación, según se describe a continuación.

5.2.1 Calidad del ADN genómico

La calidad del ADN genómico de pacientes voluntarios diagnosticados de FM y de los controles sanos anónimos fue evaluada según los siguientes criterios:

5.2.1.1 Pureza del ADN genómico preparado: basándonos en una relación de la absorbancia entre 260 y 280 nm >1.7 para descartar aquellas muestras con contaminantes proteicos. El 97% de las muestras cumplió el requisito. Aquellas muestras cuya relación de absorbancias no superó el valor de 1.7 fueron descartadas y preparadas de nuevo, de modo que la totalidad de las muestras utilizadas en el análisis por PCR mostraron una relación de absorbancias 260/280 nm >1.7 , como puede observarse en las tablas 10 y 11.

5.2.1.2 Integridad del ADN genómico: para confirmar que el ADN genómico no se encontraba degradado se tomaron alícuotas correspondientes a 0.5 µg de cada muestra y se resolvieron en geles de agarosa al 0,8-1% teñidos en real-safe. La Figura 9 muestra los resultados obtenidos para de 18 muestras seleccionadas aleatoriamente 9 del grupo de pacientes de FM y 9 del grupo control. La imagen claramente ilustra que el ADN genómico extraído tanto de pacientes como de controles es de alto peso molecular, concretamente mayor de 23 kilobases, y por tanto de calidad adecuada para la amplificación de secuencias por PCR.

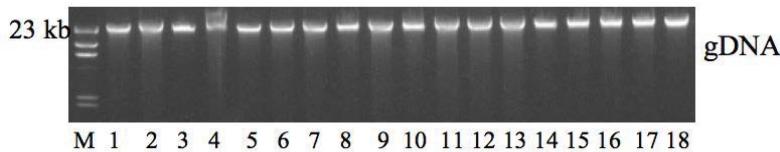


Figura 9: Integridad del ADN genómico obtenido. Electroforesis de ADN genómico (0.5 µg/pocillo) en gel de agarosa 1%. Las carreras de la 1 a la 9 corresponden a ADN genómico aislado de 9 pacientes y las carreras 10 a la 18 a 9 muestras preparadas de controles sanos. M señala el marcador de Peso molecular lambda ADN/*Hind*III marker (Biotoools).

5.2.1.3 Confirmación de que las muestras de ADN genómico se hallan libres de impurezas que pudieran inhibir la amplificación de secuencias por PCR: para ello se amplificaron secuencias genómicas correspondientes al gen house-keeping o de expresión constitutiva beta actina (peso molecular esperado de 416 bp) y una región del cromosoma X correspondiente a las posiciones 2499130 y 2498903 (peso molecular esperado de 227 bp) mediante PCR, según descrito en materiales y métodos.

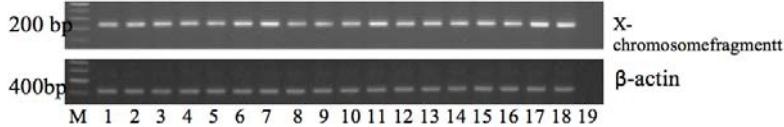


Figura 10: Amplificación por PCR de secuencias genómicas. Las carreras de 1 a la 9 incluyen muestras de pacientes y las carreras del gel 10 a la 18 muestran los resultados de 9 muestras de participantes sanos. La carrera 19 corresponde al control negativo de la PCR (master mix carente de ADN genómico). El panel superior corresponde a la amplificación del ADN genómico con los primers hGAPDH-F y hGAPDH-R previamente descritos (93) (ver Tabla 8) y el panel inferior de la Figura muestra la amplificación con los primers de diseño propio h-β-actin F y h-β-actin R (ver Tabla 8) visualizado en gel de agarosa 1% contenido realsafe. La M señala el marcador de peso molecular 100 bp ladder marker (Promega).

5.2.2 Hallazgo de resultados positivos para el virus XMRV

Del total de muestras analizadas de pacientes diagnosticados de FM (n=75), 18 muestras que corresponden al 24% de muestras de FM y 12 muestras de controles que corresponden al 15% del total de los controles analizados (n=79) (ver tabla 9) presentaron una banda del esperado peso molecular (602 bp) para la amplificación de las secuencias de XMRV por PCR anidada en la región *env*, según el diseño de primers específicos descrito en materiales y métodos, primero con el set de primers externo (XMRV-env-outer-6156-F y XMRV-env-outer-7129-R) y seguidamente con el set de primers interno (XMRV-env-inner-6334-F y XMRV-env-inner-6936-R).

Tabla 10: Resultados análisis por PCR de las muestras analizadas de pacientes de FM. Las muestras de pacientes de FM 9, 20 y 63, catalogadas como “No existe”, corresponden a pacientes que no se les pudo extraer sangre por diversos motivos. Se realizaron PCR1 y PCR2 con el ADN genómico de pacientes de FM que corresponde a (la 1^a preparación) prep1, mientras que PCR3 fue realizada con el ADN genómico de pacientes de FM de prep2.

Nº muestra FM	gADN (ng/ul)		A260/A280		XMRV env			XMRV gag	
	prep1	prep2	prep1	prep2	PCR 1	PCR 2	PCR 3	GAG-I-F/R	NP116-117
1	384,9	-	1,89	-	N	-	-	N	N
2	204,3	-	1,87	-	N	-	-	N	N
3	348,5	321,7	1,87	1,87	P	N	N	N	N
4	396,3	-	1,88	-	N	-	-	N	N
5	274,8	-	1,87	-	N	-	-	N	N
6	223,2	-	1,9	-	N	-	-	N	N
7	334,3	-	1,87	-	N	-	-	N	N
8	342,5	-	1,87	-	N	-	-	N	N
9	No existe	-	--	-	--	-	-	--	--
10	524,9	-	1,86	-	N	-	-	N	N
11	305,2	-	1,88	-	N	-	-	N	N
12	250,5	297,4	1,88	1,86	P	P	N	N	N
13	281,7	-	1,88	-	N	-	-	N	N
14	466,9	-	1,86	-	N	-	-	N	N
15	373,2	-	1,87	-	N	-	-	N	N
16	293	-	1,88	-	N	-	-	N	N
17	291,1	-	1,87	-	N	-	-	N	N
18	357,7	-	1,86	-	N	-	-	N	N
19	497,4	-	1,81	-	N	-	-	N	N
20	No existe	-	--	-	--	-	-	--	--
21	192,4	-	1,9	-	N	-	-	N	N
22	477,3	-	1,86	-	N	-	-	N	N
23	461,5	-	1,89	-	N	-	-	N	N
24	1190,6	-	1,86	-	N	-	-	N	N
25	537,6	-	1,86	-	N	-	-	N	N
26	531,6	-	1,89	-	N	-	-	N	N
27	398,3	-	1,88	-	N	-	-	N	N
28	601,3	-	1,86	-	N	-	-	N	N
29	447,3	-	1,88	-	N	-	-	N	N
30	197,6	-	1,9	-	N	-	-	N	N
31	519	-	1,88	-	N	-	-	N	N
32	325	-	1,85	-	N	-	-	N	N
33	566,3	437,8	1,87	1,86	P	N	N	N	N
34	233,2	-	1,9	-	N	-	-	N	N
35	334	-	1,84	-	N	-	-	N	N
36	506,5	-	1,85	-	N	-	-	N	N
37	457,5	432,4	1,85	1,86	P	P	N	N	N
38	450,7	399,7	1,84	1,88	P	P	N	N	N
39	571,2	487,6	1,79	1,88	P	N	N	N	N
40	398,7	-	1,82	-	N	-	-	N	N
41	563	458,2	1,82	1,87	P	N	N	N	N
42	301,5	299,4	1,85	1,84	P	P	N	N	N
43	294,2	302,2	1,77	1,87	P	P	N	N	N
44	927,3	912,3	1,75	1,88	P	P	N	N	N

Nº muestra FM	gADN (ng/ul)		A260/A280		XMRV env			XMRV gag	
	prep1	prep2	prep1	prep2	PCR 1	PCR 2	PCR 3	GAG-I-F/R	NP116-117
45	690,8	598,8	1,9	1,86	P	N	N	N	N
46	571,2	-	1,77	-	N	-	-	N	N
47	273,2	-	1,88	-	N	-	-	N	N
48	229,8	-	1,86	-	N	-	-	N	N
49	214,1	-	1,87	-	N	-	-	N	N
50	294,1	-	1,9	-	N	-	-	N	N
51	689,6	-	1,83	-	N	-	-	N	N
52	787,4	-	1,84	-	N	-	-	N	N
53	680,2	-	1,85	-	N	-	-	N	N
54	992,9	895,8	1,79	1,86	P	N	N	N	N
55	763,3	-	1,85	-	N	-	-	N	N
56	271,7	-	1,9	-	N	-	-	N	N
57	587,7	-	1,87	-	N	-	-	N	N
58	114,7	154,3	2	1,86	P	N	N	N	N
59	1082,6	983,6	1,84	1,82	P	P	N	N	N
60	2194,3	1897,5	1,78	1,79	P	P	N	N	N
61	118,6	154,6	2	1,98	P	N	N	N	N
62	388,7	378,5	1,79	1,82	P	N	N	N	N
63	No existe	-	--	-	--	-	-	--	--
64	343	-	1,85	-	N	-	-	N	N
65	953,4	-	1,83	-	N	-	-	N	N
66	544	-	1,85	-	N	-	-	N	N
67	951,1	-	1,84	-	N	-	-	N	N
68	672,4	-	1,85	-	N	-	-	N	N
69	617,9	-	1,82	-	N	-	-	N	N
70	479,1	-	1,82	-	N	-	-	N	N
71	292,4	-	1,86	-	N	-	-	N	N
72	571,6	-	1,84	-	N	-	-	N	N
73	380,4	-	1,83	-	N	-	-	N	N
74	662,5	-	1,85	-	N	-	-	N	N
75	349,7	-	1,9	-	N	-	-	N	N
76	850,1	-	1,82	-	N	-	-	N	N
77	834,5	-	1,81	-	N	-	-	N	N
78	549,6	537,9	1,82	1,88	P	N	N	N	N

Tabla 11: Resultados análisis por PCR de las muestras analizadas de pacientes de controles. El control 13 se desestimó por no estar dentro del rango de edad. Los controles catalogados como “No determinado (ND)”, corresponden a muestras con baja concentración de genómico (inferior a 200 ng/μl). No se procedió a extraer nuevo genómico ya que el número de muestras control aptas para el ensayo, un total de 79 muestras, era suficiente para el estudio. Se realizaron PCR1 y PCR2 con el ADN genómico de controles sanos que corresponden a (la 1^a preparación) prep1, mientras que PCR3 fue realizada con el ADN genómico de controles sanos de prep2.

Nº muestra control	gADN (ng/ul)		A260/A280		XMRV env			XMRV gag	
	prep1	prep2	prep1	prep2	PCR 1	PCR 2	PCR 3	GAG-I-F/R	NP116-117
1	567,8	-	1,87	-	N	-	-	N	N
2	715,8	-	1,82	-	N	-	-	N	N
3	513,1	511,7	1,86	1,84	P	P	N	N	N
4	450,4	465,3	1,87	1,73	P	P	N	N	N
5	35,1	-	2,02	-	ND	-	-	N	N
6	352,3	-	1,85	-	N	-	-	N	N
7	587	-	1,87	-	N	-	-	N	N
8	643	-	1,83	-	N	-	-	N	N
9	571,4	-	1,84	-	N	-	-	N	N
10	469	476,6	1,84	1,87	P	N	N	N	N
11	602,9	-	1,87	-	N	-	-	N	N
12	1013,7	989,5	1,8	1,88	P	N	N	N	N
13	90,6	-	1,9	-	ND	-	-	N	N
14	444,3	432,7	1,86	1,87	P	N	N	N	N
15	459,7	-	1,89	-	N	-	-	N	N
16	1188,2	-	1,81	-	N	-	-	N	N
17	516	-	1,82	-	N	-	-	N	N
18	668,2	-	1,8	-	N	-	-	N	N
19	545,3	-	1,89	-	N	-	-	N	N
20	424	415	1,85	1,87	P	N	N	N	N
21	576	-	1,77	-	N	-	-	N	N
22	565,5	-	1,8	-	N	-	-	N	N
23	173	-	1,88	-	N	-	-	N	N
24	1235,6	989,6	1,83	1,80	P	N	N	N	N
25	1121,8	-	1,84	-	N	-	-	N	N
26	2341,1	-	1,72	-	N	-	-	N	N
27	1968,9	-	1,83	-	N	-	-	N	N
28	588	-	1,84	-	N	-	-	N	N
29	388,1	-	1,84	-	N	-	-	N	N
30	681,5	675,7	1,88	1,80	P	N	N	N	N
31	934,5	-	1,85	-	N	-	-	N	N
32	1092,9	-	1,84	-	N	-	-	N	N
33	1542,6	-	1,73	-	ND	-	-	ND	ND
34	2347,5	-	1,90	-	ND	-	-	ND	N
35	832	-	1,80	-	N	-	-	N	N
36	546,2	-	1,80	-	N	-	-	N	N
37	556,5	-	1,85	-	N	-	-	N	N
38	370,4	-	1,84	-	N	-	-	N	ND
39	202,3	-	1,86	-	ND	-	-	ND	ND
40	240,5	-	1,76	-	ND	-	-	ND	N
41	605,5	-	1,82	-	N	-	-	N	N
42	371,8	-	1,84	-	N	-	-	N	ND
43	220,7	-	1,84	-	ND	-	-	ND	ND

Nº muestra control	gADN (ng/ul)		A260/A280		XMRV env			XMRV gag	
	prep1	prep2	prep1	prep2	PCR 1	PCR 2	PCR 3	GAG-I-F/R	NP116-117
44	287,8	-	1,8	-	N	-	-	N	N
45	88	-	1,92	-	ND	-	-	ND	ND
46	51,8	-	1,89	-	ND	-	-	ND	ND
47	71,8	-	1,94	-	ND	-	-	ND	ND
48	210	-	1,9	-	N	-	-	N	N
49	115,5	-	1,87	-	ND	-	-	ND	ND
50	612,9	-	1,83	-	N	-	-	N	N
51	128,5	-	1,95	-	ND	-	-	ND	ND
52	535,7	-	1,7	-	N	-	-	N	N
53	119,7	-	1,87	-	ND	-	-	ND	ND
54	38,5	-	2,03	-	ND	-	-	ND	ND
55	131,7	-	1,87	-	ND	-	-	ND	ND
56	322	-	1,86	-	N	-	-	N	N
57	139	-	1,91	-	ND	-	-	ND	ND
58	846,3	-	1,84	-	N	-	-	N	N
59	144	-	1,9	-	ND	-	-	ND	ND
60	1383,6	-	1,82	-	N	-	-	N	N
61	1428,7	-	1,83	-	N	-	-	N	N
62	1268,7	-	1,83	-	N	-	-	N	N
63	833,6	-	1,85	-	N	-	-	N	N
64	135,7	-	1,96	-	ND	-	-	ND	ND
65	130,8	-	1,91	-	ND	-	-	ND	ND
66	438,5	-	1,87	-	N	-	-	N	N
67	123,7	-	1,83	-	ND	-	-	ND	ND
68	151,1	-	1,93	-	ND	-	-	ND	ND
69	153,6	-	1,95	-	ND	-	-	ND	ND
70	230,1	-	1,94	-	N	-	-	N	N
71	263,4	-	1,93	-	N	-	-	N	N
72	1576,4	-	1,82	-	N	-	-	N	N
73	110,9	-	1,81	-	ND	-	-	ND	ND
74	170,5	-	1,94	-	ND	-	-	ND	ND
75	156,5	-	1,93	-	ND	-	-	ND	ND
76	371,2	-	1,87	-	N	-	-	N	N
77	104,6	-	1,97	-	ND	-	-	ND	ND
78	923,5	-	1,83	-	N	-	-	N	N
79	116,3	-	1,97	-	ND	-	-	ND	ND
80	2153,2	-	1,81	-	N	-	-	N	N
81	561,6	-	1,82	-	N	-	-	N	N
82	291,6	-	1,74	-	N	-	-	N	N
83	320,4	-	1,85	-	N	-	-	N	N
84	333,1	-	1,82	-	N	-	-	N	N
85	302,2	298,5	1,85	1,83	P	N	N	N	N
86	345,2	376,4	1,85	1,84	P	P	N	N	N
87	166,9	-	1,86	-	N	-	-	N	N
88	395,7	387,5	1,84	1,88	P	P	N	N	N
89	637,7	658,3	1,72	1,87	P	P	N	N	N
90	188,1	-	1,78	-	N	-	-	N	N
91	220,7	-	1,73	-	N	-	-	N	N
92	19,3	-	1,98	-	ND	-	-	N	N
93	122,3	-	1,79	-	ND	-	-	N	N
94	665,1	-	1,76	-	N	-	-	N	N
95	317,7	-	1,85	-	N	-	-	N	N
96	1085,1	-	1,79	-	N	-	-	N	N

Nº muestra control	gADN (ng/uL)		A260/A280		XMRV env			XMRV gag	
	prep1	prep2	prep1	prep2	PCR 1	PCR 2	PCR 3	GAG-I-F/R	NP116-117
97	1495,4	-	1,75	-	N	-	-	N	N
98	629,3	-	1,72	-	N	-	-	N	N
99	893,8	-	1,83	-	N	-	-	N	N
100	146,5	-	1,81	-	ND	-	-	ND	ND
101	466	-	1,73	-	N	-	-	N	N
102	No existe	--	--	--	--	-	-	--	--
103	1859,3	-	1,84	-	N	-	-	N	N
104	1891	-	1,83	-	N	-	-	N	N
105	1120	-	1,82	-	N	-	-	N	N
106	2023	-	1,82	-	N	-	-	N	N
107	1156,7	-	1,85	-	N	-	-	N	N
108	871,4	-	1,82	-	N	-	-	N	N
109	1154,6	-	1,83	-	N	-	-	N	N
110	338,9	-	1,84	-	N	-	-	N	N

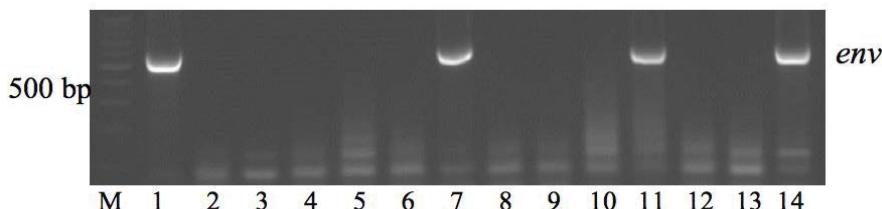


Figura 11: Amplificación positiva de secuencias env XMRV en muestras de FM y participantes sanos. Las carreras 1 a la 7 corresponden a amplificación de ADN genómico de pacientes de FM, las carreras 8 a la 12 corresponden a la amplificación de 5 muestras de ADN genómico de participantes sanos. La carrera 13 corresponde al control negativo carente de ADN genómico y la carrera 14 a la amplificación a partir del plásmido pcADN3.1 vp62 XMRV (control positivo). Los productos se visualizaron en un gel 2% de agarosa contenido real safe. M indica la presencia del marcador de peso molecular 100 bp ladder marker (Promega).

Sin embargo y teniendo en cuenta que los primers fueron diseñados en las regiones más conservadas dentro de la secuencia de la proteína env de forma que pudieran localizar la presencia de las cuatro variantes relacionadas con el virus MLV altamente homólogas al XMRV (86), resultaba imprescindible la secuenciación de estas bandas para determinar de forma inequívoca si las secuencias amplificadas correspondían al XMRV o a otras secuencias relacionadas con él.

5.2.3 Comprobación de la secuencia del virus XMRV en los positivos obtenidos

Cuando se encontraron positivos, es decir se evidenciaron bandas que coincidían exactamente con el tamaño de la secuencia del virus, el ADN amplificado se sometió a un ciclo adicional de PCR con el objetivo de producir suficiente ADN para su secuenciación. Las bandas del material amplificado fueron purificadas por electroforesis y eluidas según descrito en material y métodos. El ADN así preparado de las muestras de pacientes de FM y de las muestras de controles fueron enviadas a la Unidad de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia para su secuenciación.

```
>gb|EF185282.1| XenotropicMuLV-related virus VP62, complete genome
Length=8165
Score = 802 bits (434), Expect = 0.0
Identities = 451/459 (98%), Gaps = 2/459 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 16      GGACT-AGACTGTATCGATCCACTGGGCCGACCCGGTGAACCTGTTCTCTGACCCGC 74
                ||||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6370    GGACTAAAGACTGTATCGATCCACTGGGCCGACCCGGTGAACCTGTTCTCTGACCCGC 6429
Query 75      CAGG-CCACAAATGTAGGGCCCCCGTCCCCATTGGCCTAATCCCGTGACTGAACAG 133
                ||||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6430    CAGGTCTCAATGTAGGGCCCCCGTCCCCATTGGCCTAATCCCGTGACTGAACAG 6489
Query 134    CTACCCCCCTCCAACCCGTGAGATCATGCTCCCCAGGCCTCTCGTCCCTCCCTTC 193
                ||||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6490    CTACCCCCCTCCAACCCGTGAGATCATGCTCCCCAGGCCTCTCGTCCCTCCCTTC 6549
Query 194    GGCGCGGCCCTATGGTGCCTGGGCTCCCCCGCTTCACAACCTGGGACGGGAGAC 253
                ||||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6550    GGCGCGGCCCTATGGTGCCTGGGCTCCCCCGCTTCACAACCTGGGACGGGAGAC 6609
Query 254    AGGCTGCTAACCTGGTAGAGGAGGCTACCAAGCCCTCAACCTCACCAAGTCCCAGAAA 313
                ||||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6610    AGGCTGCTAACCTGGTAGAGGAGGCTACCAAGCCCTCAACCTCACCAAGTCCCAGAAA 6669
Query 314    ACCCAAGAGTCTGGCTGTGCTAGTATCGGGACCCCTACTACAAAGGGTGGCCGTC 373
                ||||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6670    ACCCAAGAGTCTGGCTGTGCTAGTATCGGGACCCCTACTACAAAGGGTGGCCGTC 6729
Query 374    CTAGGTACTTACTCCAACCATACTCTGCCCGGCTAAC TGCTCCGTGACCTCCCAACAC 433
                ||||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6730    CTAGGTACTTACTCCAACCATACTCTGCCCGGCTAAC TGCTCCGTGACCTCCCAACAC 6789
Query 434    AAGCTTACCCCTGTCCGAAGTGACCTGTCTGGGACTCTGC 472
                ||||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 6790    AAGCTGACCCCTGTCCGAAGTGACCGGGCAGGGACTCTGC 682
```

Figura 12: Alineación BLASTN de la secuencia amplificada a partir del ADN genómico del paciente de FM 62 secuenciado con el primer XMRV-env-inner-6334-F. “Query” indica la secuencia obtenida en la experimentación y “Sbjct” o “Subject” la secuencia coincidente hallada por el programa BLASTN en la base de datos Genbank de secuencias nucleotídicas no repetitivas.

Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias nucleotídicas no repetitivas de la base de datos Genbank, utilizando el programa informático BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotide sequences) desarrollado por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) según descrito en métodos, encontrando que la mejor coincidencia correspondía al genoma del virus XMRV en su región *env* en todos los casos.

En concreto los resultados de la secuenciación de la banda amplificada a partir del ADN genómico del paciente de FM 62 muestran un 98% de identidad con el virus XMRV vp62 (ver Figura anterior). El 2% de discrepancia corresponde a bases en regiones de baja calidad de secuencia (primeros pares de bases y últimos donde empieza a caer la señal).

El recuadro rojo de la Figura 12, sin embargo, destaca una posible mutación G a A en una región en la que se estima la secuencia obtenida es fiable.

La diferencia que aparece en el nucleótido 359, que debiera ser una guanina, se podría pensar corresponde a una mutación del virus y por tanto una variante. Al revisar de cerca esta secuencia se observó que posiblemente correspondía a un error de secuenciación (ver Figura 13).

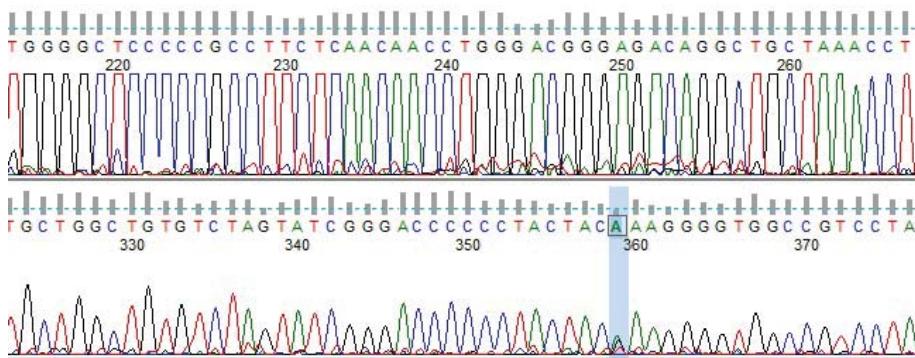


Figura 13: Secuencia amplificada a partir del ADN genómico del paciente de FM 62, secuenciada con el primer XMRV-env-inner-6334-F. El recuadro azul señala el nucleótido discrepante con la secuencia *env* del genoma del virus XMRV variante vp62 [Genbank: accession DQ399707].

Para confirmar, en primera instancia, que el nucleótido 359 no se halla mutado y que por tanto la secuencia obtenida coincide exactamente con la variante vp62 del virus XMRV, el fragmento amplificado a partir de la muestra de genómico del paciente de FM 62 se secuenció de nuevo, esta vez con el primerXMRV-env-inner-6936-R confirmando que el nucleótido 359 era efectivamente una citosina y por tanto la posibilidad de haber aislado una variante del virus XMRV se descarta.

La secuencia del resto de bandas amplificadas también coincidió exactamente con la variante vp62 del virus XMRV que se utilizaba como control positivo del ensayo de cribado en todos los casos.

5.2.4 Evaluación de contaminación con ADN genómico murino

El hecho de que de nuestras bandas fueran absolutamente idénticas al aislado americanovp62 del XMRV utilizado en nuestros ensayos como control positivo resultaba chocante. Aun correspondiendo a regiones altamente conservadas, las secuencias virales pertenecientes a aislados en regiones geográficas distantes debieran presentar alguna diferencia (176-181).

Coincidiendo con nuestros primeros resultados positivos las conclusiones derivadas de la experimentación en el grupo del Dr. Silverman (93) empezaron a cuestionarse. En concreto los resultados de algunos estudios, mostraron que los kits de amplificación por PCR de algunas casas comerciales se encontraban contaminados con ADN murino planteando incluso la no existencia de la migración xenotrópica a humanos descrita para el XMRV (182). En nuestro caso no se habían utilizado Polimerasas hotstart sospechosas de contaminación murina, si bien el proveedor de nuestros reactivos no podía certificar la no contaminación con nucleicos murinos ni podíamos descartar la posibilidad de contaminación por amplicones dentro del laboratorio derivados de nuestro control positivo.

Para descartar que la amplificación de secuencias virales derivaba de la presencia de ADN contaminante murino se realizó un análisis de amplificación de secuencias genómicas murinas por PCR, en concreto se evaluó la presencia de IAPs (Intracisternal A Particle) que corresponden a secuencias repetitivas presentes en el ADN genómico

de los ratones (86) con los mismos reactivos del kit, utilizando como control positivo ADN genómico de ratón y como control negativo el “master mix” carente de ADN. Ya que existe evidencia de que algunas columnas de preparación de ADN contienen trazas de ADN murino (183) se incluyó un control negativo adicional correspondiente a la solución de rehidratación del kit. Los primers y condiciones de amplificación fueron esta vez los descritos por el grupo de Robinson *et al.* (94)

Tal como se muestra en la Figura 7, a modo de ejemplo representativo, ninguna de las muestras analizadas, ni ninguno de los controles negativos mostraron amplificación de secuencias IAP confirmando la ausencia de contaminación en las muestras de ADN genómico y en los reactivos empleados con ADN de ratón.

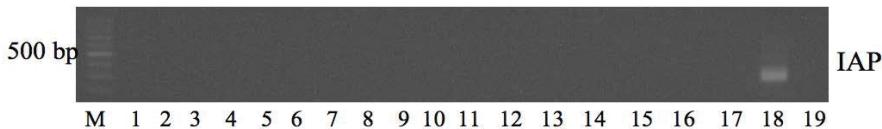


Figura 14: Ausencia de contaminación murina de muestras y reactivos. La Figura muestra la amplificación por PCR de secuencias IAPs (236-312 bp) en 17 muestras de ADN genómico (11 de pacientes y 6 de donantes sanos) (carreras 1-11 y 12-17 respectivamente). La línea 18 corresponde al control positivo que incluyó 10ng de ADN genómico de ratón y la carrera 19 al control negativo del “master mix” contenido la solución de rehidratación del kit Wizard genomic ADN purification kit (Promega). Los productos se visualizaron en un gel 2% de agarosa contenido real safe. M indica la presencia del marcador de peso molecular 100 bp ladder marker (Promega).

Para asegurar que la sensibilidad del ensayo hubiera permitido detectar contaminación por trazas de ADN genómico murino se procedió a realizar una titulación por dilución seriada del ADN genómico murino extraído y a ensayar cada una de las diluciones mediante amplificación por PCR en el contexto de 1 µg de ADN genómico humano extraído de un participante sano según descrito en la sección de Material y Métodos.

Como se observa en la Figura 15 el límite de detección se estableció en 5 femtogramos bajo nuestras condiciones particulares de trabajo.

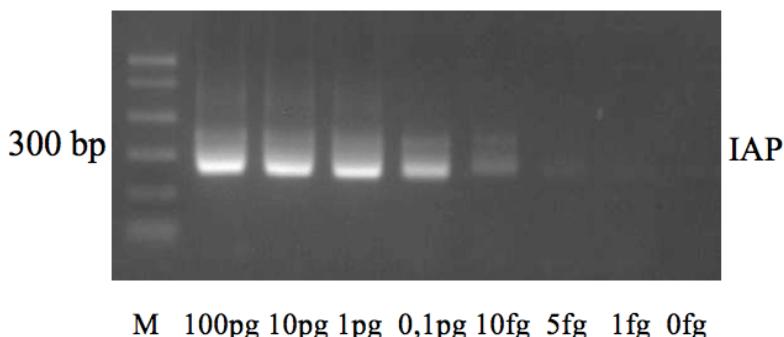


Figura 15: Sensibilidad del ensayo de PCR para la detección de ADN murino. La Figura muestra la amplificación por PCR de secuencias IAP murinas a partir de ADN genómico de ratón junto con 1 µg de ADN genómico humano. Las cantidades de ADN genómico de ratón utilizadas se indican en la parte inferior de la Figura. Los productos se visualizaron en un gel 2% de agarosa contenido real safe. M indica la presencia del marcador de peso molecular PCR markers (Promega).

5.2.5 Amplificación inconsistente de secuencias *env* e imposibilidad de amplificación de secuencias *gag* del virus XMRV

La re-evaluación de las secuencias inicialmente positivas para el gen *env* mostró amplificación en 8 de las 18 muestras de pacientes y 5 de las 12 de participantes control. Sin embargo cuando esos mismos ADN genómicos se sometieron a análisis de amplificación de otra de las secuencias del virus XMRV, la región *gag* ninguna de las 30 muestras previamente positivas para la secuencia *env* resultó en amplificación. En esta ocasión las precauciones para controlar una posible contaminación aérea por amplicones fueron de extremo cuidado, incluyendo el operar dentro de una campana con lámpara ultravioleta para PCR de Euroclone modelo aura ref. PCR PC10000 tal como se describe en materiales y métodos y restringiendo la entrada del control positivo (constructo pcDNA3-vp62 XMRV) al área de trabajo.

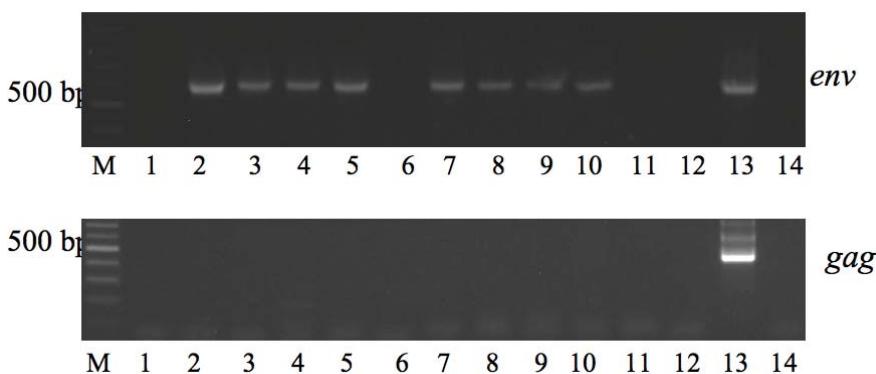


Figura 16: Amplificación inconsistente de secuencias *env* e imposibilidad de amplificación de secuencias *gag* del virus XMRV. Las carreras 1-8 muestran amplificación de ADN genómico de muestras de pacientes de FM positivas en el primer ensayo de amplificación. Las carreras 9-12 muestran amplificación de ADN genómico de muestras de participantes sanos positivas en el primer ensayo de amplificación. La carrera 13 corresponde a la amplificación a partir del plásmido pcADN3.1 vp 62 XMRV (control positivo) mientras que la 14 corresponde al control negativo carente de ADN genómico. El panel superior incluyó amplificación anidada con los primers XMRV-env-outer-6156-F y XMRV-env-outer-7129-R seguida de amplificación con el set de primers interno (XMRV-env-inner-6334-F y XMRV-env-inner-6936-R); mientras que el panel inferior consistió en la amplificación anidada realizada inicialmente con los primers 419F y 1154R, seguida de la amplificación con los primers GAG-I-F y GAG-I-R .Los productos se visualizaron en un gel 2% de agarosa contenido real safe. M indica la presencia del marcador de peso molecular 100 bp ladder marker (Promega).

5.2.6 Ausencia de amplificación de secuencias *env* en preparaciones independientes de pacientes y controles que habían presentado previa positividad

Debido a que la amplificación por PCR anidada es una técnica altamente sensible, resultaba posible que las inconsistencias derivaran de una concentración extremadamente baja de secuencias diana, por tanto resultaba necesario confirmar la presencia de secuencias provirales *env* en una preparación independiente de ADN genómico de los pacientes y sujetos control que inicialmente mostraron amplificación de este gen.

Sin embargo, en ninguna de las nuevas preparaciones de ADN genómico resultó posible amplificar secuencias *env* en esta segunda ocasión, ni siquiera sometiendo las muestras a unos ciclos de amplificación permisivos en los que temperatura de

apareamiento de los primers se redujo 5°C por debajo de su temperatura de “melting” (T_m).

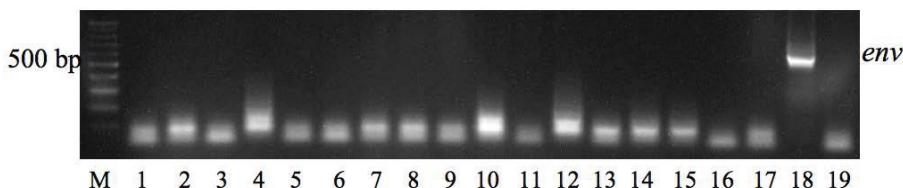


Figura 17: Ausencia de amplificación de secuencias *env* en preparaciones independientes de pacientes y controles que habían presentado previa positividad. La Figura muestra la amplificación por PCR anidada de secuencias *env* XMRV en 17 muestras de ADN genómico (11 de pacientes y 6 de donantes sanos) (carreras 1-11 y 12-17 respectivamente). La carrera 18 corresponde a la amplificación a partir del plásmido pcADN3.1 vp 62 XMRV (control positivo) mientras que la 19 corresponde al control negativo carente de ADN genómico. Los productos se visualizaron en un gel 2% de agarosa contenido real safe. M indica la presencia del marcador de peso molecular 100 bp ladder marker (Promega).

5.2.7 Cribado adicional de las secuencias *gag* del virus XMRV

Las secuencias *gag* codifican la proteína estructural interna del retrovirus y por ello mismo suele presentar un mayor índice de conservación de secuencia que otras proteínas como la *env* que contiene protrusiones externas cuya mutagénesis proporciona al virus una vía de “escape” de los mecanismos de defensa del huésped.

Por ello, para asegurar que la negatividad de secuencias *env* XMRV en nuestras muestras no derivaba de falta de complementariedad de los primers diseñados frente a una posible variante local de la proteína *env*, se procedió a realizar un cribado completo de las muestras ahora con primers dirigidos a detectar las secuencias conservadas *gag* del virus XMRV y de los MLVs relacionados con él. En este cribado se utilizó un set de primers externos comunes 419F y 1154R y 2 sets distintos de primers internos, estando uno de ellos formado por los primers GAG-I-Fy GAG-I-R; y el segundo por los primers NP116 y NP117 como previamente descrito por Lombardi *et al.* (93) y por Lo *et al.* (86).

Ninguna de las 154 muestras evaluadas (75 pacientes y 79 controles) presentó amplificación de secuencias *gag* con ninguno de los 2 sets de primers internos, bajo M. García Escudero

condiciones estándar previamente descritas (93). Tampoco las preparaciones de ADN genómico de las muestras que habían resultado positivas para las secuencias *env* mostraron amplificación de secuencias *gag* con ninguno de los 2 sets de primers, llevándonos a concluir que las bandas originalmente amplificadas derivaron probablemente de una contaminación por amplicones en el área de trabajo. En concreto los amplicones contaminantes contendrían solo secuencias *env* pero no *gag* muy posiblemente derivados o producto de amplificación de la muestra control (pcADN3.1 vp62XRMV) con los primers específicos de la región *env*.

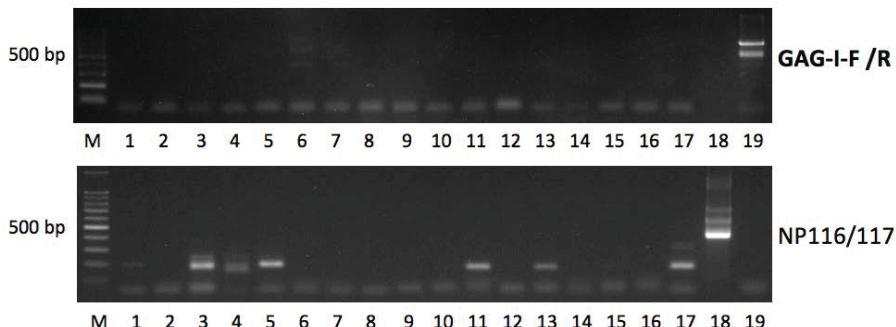


Figura 18: Inespecificidad de los productos amplificados con los primers específicos de la región *gag* del virus XMRV. La Figura muestra la amplificación por PCR anidada de secuencias *gag* XMRV en 17 muestras de ADN genómico (11 de pacientes y 6 de donantes sanos) (muestras 1-11 y 12-17 respectivamente). La muestra 18 corresponde a la amplificación a partir del plásmido pcADN3.1 vp 62 XMRV (control positivo) mientras que la 19 corresponde al control negativo carente de ADN genómico. En el panel superior el análisis incluyó el set de primers internos GAG-I-F y GAG-I-R mientras que en el análisis que muestra el panel inferior los primers internos utilizados fueron los primers NP116 y NP117. Los productos se visualizaron en un gel 2% de agarosa contenido real safe. M indica la presencia del marcador de peso molecular 100 bp ladder marker (Promega).

Sin embargo, si los segundos ciclos de amplificación se realizaban a una temperatura menos restrictiva (hasta 5°C por debajo de la Tm de los primers), condición que permitiría la amplificación de secuencias variantes relacionadas, se obtenían productos de amplificación (ver Figura 17). Algunas de las bandas, de amplificación muy débil, presentaban un peso molecular cercano al esperado para la secuencias *gag* (ver ejemplo de la muestra 6 con los primers GAG-I-F y GAG-I-R y de las muestras

correspondientes a las posiciones del gel 1,3,4,5,11,13 y 17 analizadas con los primers NP16 y NP17 en la Figura 17). Estas bandas fueron purificadas del gel, y reamplificadas. Bien mediante PCR bien mediante subclonación en el vector pGEM-T-Easy como descrito en Materiales y Métodos.

La secuenciación de estos fragmentos, sin embargo, no rindió más que secuencias genómicas humanas y por tanto se clasificaron como productos de amplificación inespecífica.

La amplificación de secuencias *env* bajo similares condiciones no restrictivas no proporcionó ningún producto de amplificación apreciable (ver apartado anterior 5.2.6, Figura 17).

5.2.8 Sensibilidad de los ensayos de amplificación de secuencias XMRV por PCR anidada

Para confirmar que la falta de amplificación de secuencias virales obtenida no era consecuencia de falta de sensibilidad de nuestro ensayo de PCR anidada se procedió a titular el número mínimo de copias necesarias para evidenciar la presencia de secuencias XMRV mediante la técnica aplicada.

Para ello se utilizaron diluciones seriadas del constructo utilizado como control positivo de amplificación, el constructo pcADN3.1 vp62XMRV en el contexto de 1 µg de ADN genómico humano de una de las muestras control que no resultó positiva en ningún momento.

Como puede apreciarse en la Figura 19 el número mínimo de copias para evidenciar de forma clara la presencia del virus resultó de 10 copias en la región *env* y de 1 sola copia en la región *gag* cuando se utilizaron los correspondientes primers “outer” (externos) bajo las condiciones descritas para la primera etapa de amplificación de la PCR anidada, permitiendo descartar la posibilidad de que una infección de este tipo pasara desapercibida en la población evaluada bajo las condiciones de cribado establecidas que incluían, adicionalmente, un segundo ciclo de amplificaciones por PCR.

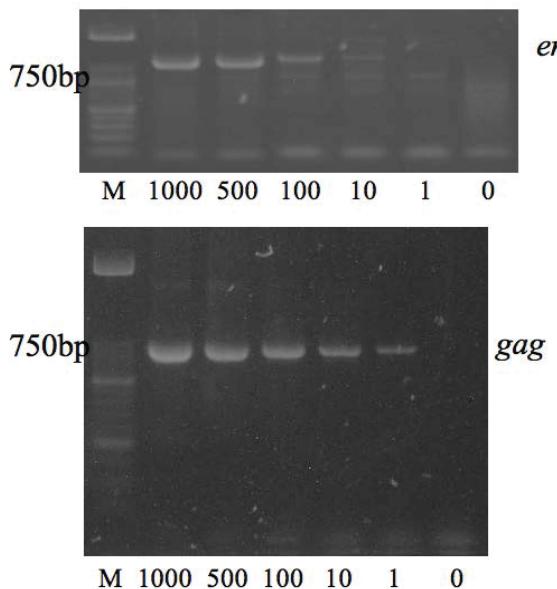


Figura 19: Sensibilidad del ensayo de PCR anidada para la detección de secuencias provirales XMRV. La Figura muestra la amplificación por PCR de secuencias XMRV *env* (panel superior) o *gag* (panel inferior) a partir del constructo pcADN3.1 vp62XMRV junto con 1 µg de ADN genómico humano de una muestra de participante sano del que no se había amplificado secuencias virales en ninguno de los ensayos, utilizando los correspondientes primers “outer” (XMRV-env-outer-6156-F y XMRV-env-outer-7129-R para el gen *env*; y los primers 419F y 1154R para el gen *gag*). El número de copias utilizadas se indica en la parte inferior de la Figura. Los productos se visualizaron en un gel 2% de agarosa contenido real safe. M indica la presencia del marcador de peso molecular XIII (Roche).

5.3 Determinación de la presencia de secuencias del provirales HTLV-2 en el ADN genómico de pacientes de FM y participantes sanos

Un objetivo adicional del presente estudio consistió en determinar si la prevalencia de infección por el virus huérfano HTLV-2 previamente asociado a fatiga crónica era superior a la de la población de no afectados por FM (controles sanos de este estudio).

Para ello se evaluó la presencia de secuencias *gag* del virus HTLV-2 en al ADN genómico obtenido de los 75 pacientes de FM y los 79 participantes sanos de nuevo mediante la técnica de amplificación por PCR anidada utilizando ahora los primers específicos de la región *gag* del virus HTLV-2 HTLV II outer-F y HTLV II outer-R en una

primera etapa de amplificación seguida de amplificación con los primers HTLV II inner-F y HTLV II inner-R según descrito previamente por Toro *et al.* (119).

El ADN genómico utilizado consistió en la colección descrita en el apartado anterior cuyos controles de calidad garantizaban un adecuado material de partida.

5.3.1 Síntesis de secuencias HTLV-2 para ser utilizadas como control positivo en cribados virales

Se obtuvo un constructo recombinante a partir de las secuencias HTLV-2 amplificadas de ADN genómico humano de un paciente positivo de infección viral, gentilmente donado por los Dres. Soriano y Treviño del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III de Madrid (119), utilizando los primers HTLV-II-inner-F y HTLV-II-inner-R (801 bp) bajo las condiciones standard de amplificación descritas en material y métodos. El vector utilizado fue el vector pGEM-T-Easy de la casa comercial Promega entre los sitios de restricción *EcoRI* y *Spel*. Constructo depositado en el NIH AIDS Reagent Program para que pueda servir de referencia a futuras investigaciones del virus huérfano HTLV-2 (ver Anexo XIII).

5.3.2 Ausencia de amplificación de secuencias específicas del virus HTLV-2

Ninguna de las 75 muestras de pacientes ni ninguna de las 79 muestras de participantes sanos proporcionó amplificación de las secuencias virales HTLV-2 incluso bajo condiciones de amplificación permisivas (apareamiento de primers a temperatura 5°C por debajo de la temperatura de “melting” de los primers). Sin embargo 2 muestras de pacientes mostraron amplificación en la primera etapa de amplificación de 2 productos (ver ejemplo de la carrera 17 en el panel superior de la Figura de abajo) de peso molecular aproximado 800 bp, coincidiendo con el peso molecular esperado de la secuencia de HTLV-2 y otra de un tamaño algo menor

(aproximadamente 450 bp), por lo que se procedió a su subclonación en el vector pGEMT-Easy y posterior secuenciación.

Las secuencias obtenidas mostraron correspondencia a secuencias genómicas humanas producto de amplificación del primer HTLV II outer-F exclusivamente permitiendo concluir falta de evidencia de infección por el virus HTLV-2 en estas muestras.

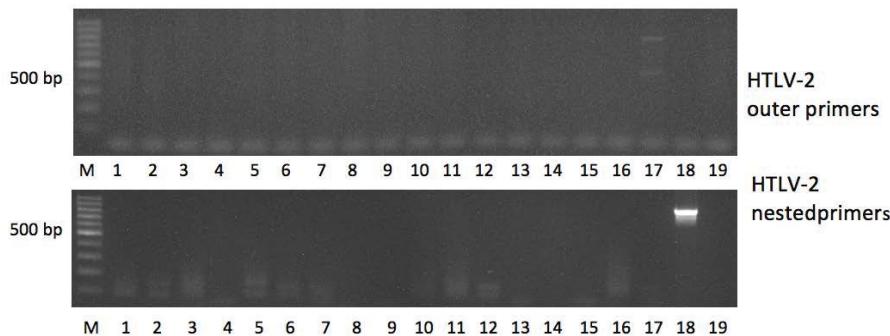


Figura 20: Ausencia de amplificación de secuencias específicas del virus HTLV-2. La Figura muestra la amplificación por PCR anidada de secuencias gag HTLV-2 en 17 muestras de ADN genómico (11 de pacientes y 6 de donantes sanos) (muestras 1-11 y 12-17 respectivamente). El panel superior muestra los resultados de la primera etapa de amplificación mientras que el panel inferior muestra los resultados de amplificación anidada. La muestra 18 corresponde a la amplificación a partir del plásmido pGEM-T-HTLV-2-gag (control positivo) mientras que la 19 corresponde al control negativo carente de ADN genómico. En el panel superior el análisis incluyó el set de primers externos HTLV II outer-F y HTLV II outer-R mientras que en el análisis que muestra el panel inferior los primers internos utilizados fueron los primers HTLV II inner-F y HTLV II inner-R. Los productos se visualizaron en un gel 2% de agarosa contenido real safe. M indica la presencia del marcador de peso molecular 100 bp ladder marker (Promega).

5.3.3 Sensibilidad de los ensayos de amplificación de secuencias HTLV-2 mediante PCR anidada

Una vez más, debido a la imposibilidad de amplificación de secuencias virales resultó necesario confirmar que las condiciones de amplificación garantizaban la sensibilidad suficiente para su detección en caso de haber ocurrido infección de los participantes en el estudio por parte del virus HTLV-2. De ahí que se llevaran a cabo estudios

similares a los presentados en secciones anteriores para la evaluación de la sensibilidad del ensayo de PCR anidada en la detección de secuencias virales XMRV.

Como se aprecia en la Figura inferior el límite de detección mediante amplificación por PCR simple correspondiente a las condiciones de la primera etapa de amplificación en el protocolo de PCR anidada, resultó ser de 1-10 copias garantizando de este modo la posibilidad de detección en caso de haber ocurrido infección y por tanto permitiendo descartar la presencia de infección viral en ninguno de los participantes del estudio.

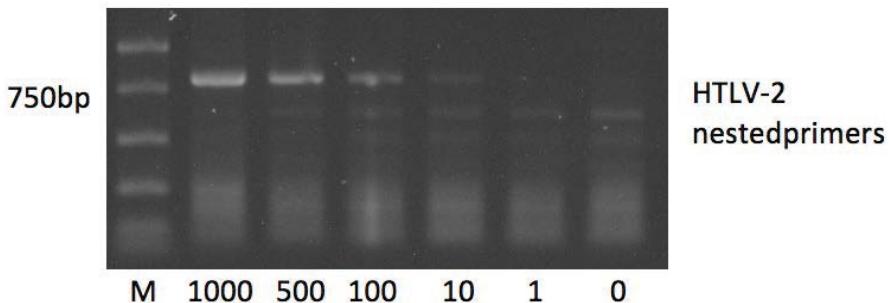


Figura 21: Sensibilidad del ensayo de PCR anidada para la detección de secuencias provirales HTLV-2. La Figura muestra la amplificación por PCR de secuencias gag a partir del constructo pGEMT-HTLV-2 generado en este estudio a partir de amplificación de ADN genómico humano de una persona infectada con el virus gentilmente donada por los Dres. Soriano y Treviño del Hospital Carlos III de Madrid, (ver apartado 4.3.1) junto con 1 µg de ADN genómico humano de un participante sano del que no se había amplificado secuencias virales. El número de copias utilizadas se indica en la parte inferior de la Figura. Los productos se visualizaron en un gel 2% de agarosa contenido real safe. M indica la presencia del marcador de peso molecular PCR markers (Promega).

5.4 Análisis de la expresión de RNasa L

Acorde con los objetivos del estudio en los que se planteaba evaluar una posible correlación entre la presencia de una forma truncada de la enzima RNasa L y la condición de fatiga crónica previamente propuesta (160-161, 163-164), como biomarcador de la enfermedad, se procedió al análisis de muestras por Western Blot y posterior cuantificación y análisis estadístico de los resultados.

5.4.1 Estudio de la abundancia relativa de la forma truncada de la RNasa L respecto a la forma íntegra

Para determinar la presencia de la forma truncada (37 kDa) e íntegra (83 kDa) de RNasa L se prepararon extractos proteicos totales de PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) purificados de 75 pacientes y 79 participantes sanos según el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. De ellos solamente resultaron apropiados para la evaluación de ambas bandas 62 muestras de pacientes de FM y 41 muestras de participantes sanos bien debido a la ausencia de una de las formas, a evidenciar degradación de la muestra o a presentar background elevado que imposibilitara la lectura adecuada de las bandas en estudio.

La abundancia relativa de la forma truncada de peso molecular 37 kDa con respecto a la forma íntegra o intacta del enzima, de peso molecular aproximado 83 kDa se determinó como el cociente de intensidades derivadas de la señal luminosa producto de la transformación del substrato luminata forte (Millipore) por la acción enzimática de la peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada al anticuerpo secundario del ensayo de Western Blot, según descrito en material y Métodos.

Las áreas comparadas se asignaron mediante el solapamiento de imágenes de quimioluminiscencia e imagen en rango visible, permitiendo esta última visualizar los estándares de peso molecular de proteínas correspondientes a proteínas ColorPlus™ Prestained Protein Marker, BroadRange (7-175 kDa) (cat # P7709V, New England Biolabs) y por tanto asignar las áreas a ser cuantificadas correspondientes a los pesos moleculares de 37 y 83 kDa. La intensidad de luminiscencia se cuantificó mediante densitometría de las áreas seleccionadas utilizando el software de análisis de imagen versión 7.0 del sistema ImageQant LAS400 desarrollado por la compañía General Electric Healthcare.

Los resultados muestran la presencia de ambas formas de RNasa L, íntegra y truncada previamente descritas, tanto en las muestras de pacientes de FM como en las de los controles.

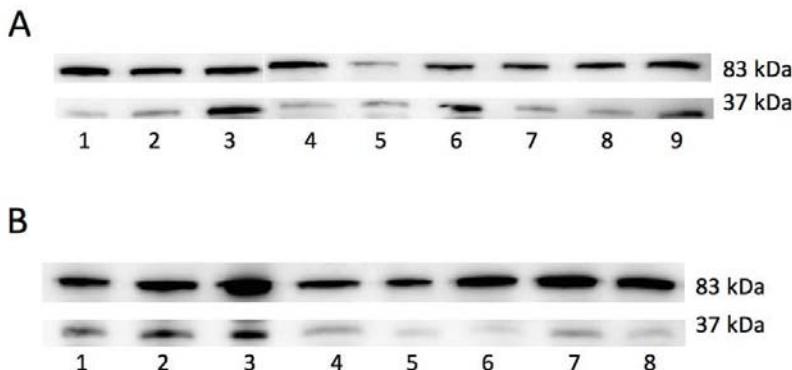


Figura 22: Análisis por Western Blot de la RNasa L en extractos de PBMCs. La Figura muestra una imagen representativa de la membrana correspondiente al análisis por Western Blot de 50 µg de proteínas totales de PBMCs purificados de sangre periférica de 9 enfermos de FM (panel A) o de 8 controles sanos (panel B) utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal anti-RNase L Antibody (2E9.2G5) (cat# sc-23955, Santa Cruz Technologies) a una concentración de 1 µg/ml según descrito en Material y Métodos. M indica el marcador de peso molecular de proteínas ColorPlus™ Prestained Protein Marker, BroadRange (7-175 kDa) (cat # P7709V, New England Biolabs).

La abundancia relativa de la forma truncada frente a la íntegra resultó variable para cada una de los grupos evaluados (ver Figura 22) encontrándose un rango del 2% al 172% en las muestras de FM y del 3% al 165% en las muestras control. Esto tras descartar la muestra del paciente de FM25 y la muestra correspondiente al sujeto control número 42 por considerarse valores no representativos o fuera de rango (“outlier”) ya que superaron el valor del 200% tomado como valor de corte en este ensayo (ver Tablas 14 y 15, disponibles en Anexo XI y Figura 23).

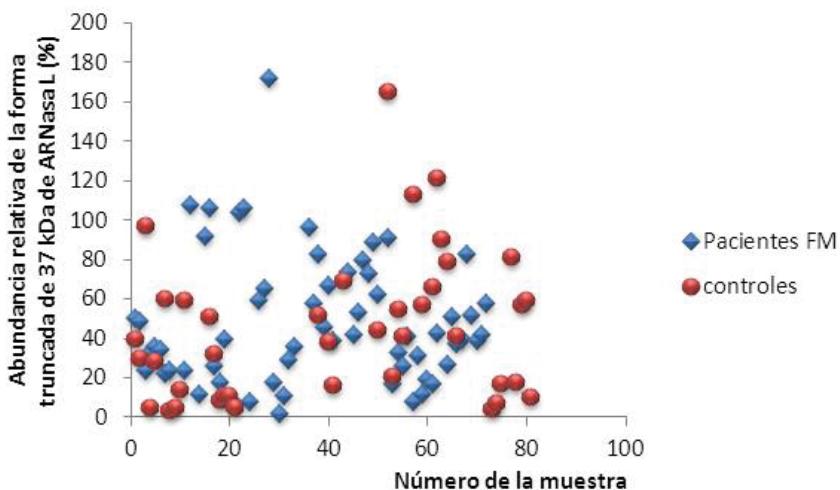


Figura 23: Abundancia relativa de la forma truncada de la enzima RNase L (37 kDa) con respecto a la forma intacta (83kDa) en pacientes de FM y participantes control. El gráfico muestra los valores correspondientes al cociente de las señales de luminiscencia (ordenadas) obtenidas a partir de 50 µg de proteínas totales de PBMCs purificados de sangre periférica de enfermos de FM (azul) o participantes control (rojo)(abscisas) obtenidas mediante análisis por Western Blot, utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal anti-RNaseL Antibody (2E9.2G5) (cat# sc-23955, Santa Cruz Technologies) a una concentración de 1 µg/ml según descrito en Material y Métodos.

Como se observa en las Figuras 22 y 23 los valores resultantes de cuantificar la señal correspondiente a la forma truncada en relación a la intacta o íntegra de la enzima RNase L varía significativamente entre individuos pero no entre grupos, es decir se observa una distribución dispersa y solapante entre los resultados del grupo de enfermos y los del grupo control.

5.4.2 Análisis estadístico de los valores de abundancia relativa de la forma truncada de la RNasa L respecto a la forma íntegra en enfermos de FM frente a participantes sanos

Tabla 12: Resultados descriptivos del análisis estadístico para la abundancia relativa de la enzima RNasa L

Descriptivos	Pacientes FM	Controles
Media	48,26	44,52
Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite Inferior: 39,89 Límite Superior: 56,63	Límite Inferior: 32,70 Límite Superior: 56,34
Mediana	40,00	40,50
Desviación típica	32,68	36,96

La comparación de la media de la abundancia relativa de la forma truncada de la RNasa L de 37 kDa con respecto a la forma intacta de 83 kDa obtenida en enfermos con respecto a la obtenida en controles muestra escasa diferencia con intervalos de confianza solapantes y con valores altos de desviación típica haciendo que haya solapamiento entre sus respectivas medias y por tanto evidenciando la falta de significancia entre un grupo de valores y el otro.

Los descriptivos del análisis estadístico de los valores obtenidos para la abundancia relativa entre formas truncada e intacta de la enzima RNasa L (valores registrados en las Tablas 14 y 15 del Anexo XI) no siguen una distribución normal. El análisis estadístico no paramétrico de los valores mediante la Prueba U-MANN WHITNEY señalan la inexistencia de diferencias significativas entre pacientes y controles por lo que retenemos la hipótesis nula “la distribución para la abundancia relativa de la banda RNAsa L 37 kDa es la misma tanto en pacientes de FM como en controles sanos”

desestimando por tanto la propuesta de los autores Tiev *et al.* que proponían este valor como biomarcador de la enfermedad (160, 163).

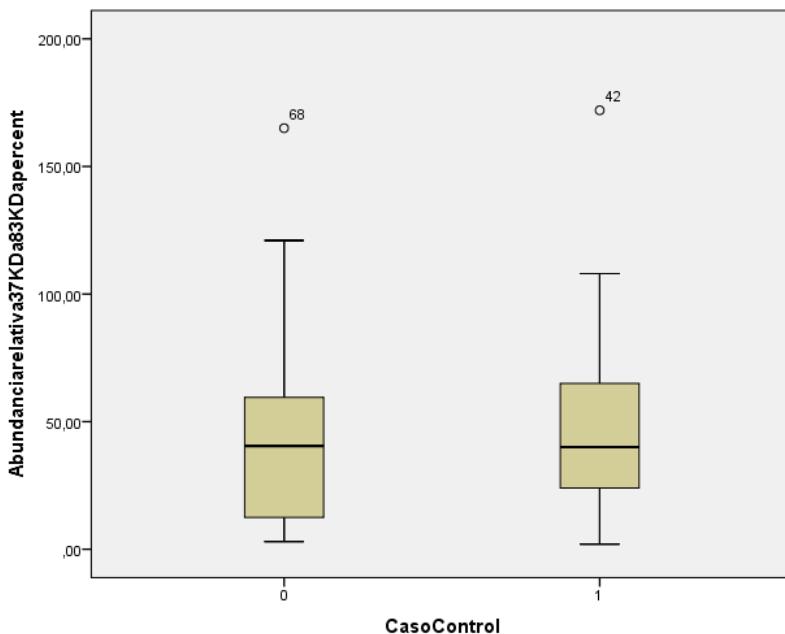


Figura 24: Diagrama de tallo y hojas mostrando las diferencias entre abundancia relativa de la forma truncada de la enzima RNAsa L (37 kDa) con respecto a la forma intacta (83kDa) en enfermos de FM (casos-1) y participantes sanos (controles-0) tras descartar valores “outliers” $p>0.5$.

6 DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye el primer estudio que evalúa la presencia de ambas familias de retrovirus asociadas a fatiga crónica: los retrovirus gamma relacionados con MLV y el delta retrovirus HTLV-2 en una cohorte de pacientes diagnosticados de FM y fatiga crónica.

En la actualidad existe suficiente evidencia para apoyar la inexistencia de una forma natural del virus XMRV en seres humanos (116, 170, 190-191). Sin embargo, dado que el XMRV es competente para infectar y replicarse dentro de células humanas (114) y que algunos virus estrechamente relacionados con él, como los virus xenotrópicos-MLV (X-MLV) pueden infectar primates y otras especies animales causando enfermedad (192-193), la posibilidad de xenoinfección humana por un virus relacionado con el MLV no puede ser totalmente descartada.

Frente a los numerosos estudios que derivaron del hallazgo inicial que relacionaba la infección por el virus XMRV con la fatiga crónica (93), escasos son los que intentaron confirmar o refutar la relación del retrovirus huérfano HTLV-2 con la enfermedad tras su impactante asociación inicial (123). A dicho estudio, pionero, que utilizó la amplificación por PCR de secuencias provirales del HTLV-2 seguida por ensayos de hibridación mostrando una clara asociación de la infección del HTLV-2 con el SFC, siguieron sólo unos pocos estudios con resultados negativos (171-172, 184).

A pesar de que la técnica utilizada en el estudio inicial es altamente específica y sensible, la amplificación por PCR anidada puede ser incluso superior y por tanto ventajosa cuando los niveles de infección son bajos o si existe la posibilidad de variantes virales como causa de la infección. Adicionalmente, ninguno de los tres estudios negativos que siguieron al estudio que mostró correlación entre fatiga crónica e infección por el HTLV-2 incluyó más de 30 muestras de sangre de pacientes (171-172, 184). Por tanto una investigación mediante técnicas de alta sensibilidad y especificidad tal como la amplificación por PCR anidada en cohortes más numerosas de pacientes resultaba altamente necesaria.

Este trabajo constituye el estudio más numeroso de pacientes ($n = 75$) de FM y fatiga crónica en los que se haya evaluado la infección por HTLV-2 hasta la fecha. La falta de amplificación de secuencias HTLV- 2 o secuencias relacionadas en nuestros pacientes nos lleva a descartar la asociación entre la infección retroviral por el HTLV- 2 y el estado de fatiga crónica previamente propuesta por DeFreitas (123).

Como ya fue propuesto anteriormente (182), esta asociación inicial entre infección por el virus HTLV-2 y el SFC pudiera haber derivado de problemas técnicos o por problemas de sustancias contaminantes que hubieran sesgado el estudio, tal como se ha demostrado con los datos que sustentaron una relación entre infección por el virus XMRV y la fatiga crónica, y que en el caso del HTLV-2 hayan pasado desapercibidos.

Resulta interesante observar la coincidencia entre el peso molecular de una de las dos bandas obtenidas en la primera amplificación por PCR con primers específicos para la detección del virus HTLV-2 y la banda *gag* endógena de 440 pb obtenida por Gow *et al.* (184). Sin embargo, a diferencia de estos investigadores, nosotros sólo pudimos observar amplificación en 2/154 muestras analizadas (Figura 11, panel A), no pudiendo por tanto acuñarla de endógena.

Contrariamente a los resultados negativos obtenidos en este estudio para el HTLV-2, en el cribado de la cohorte de pacientes de FM de la Comunidad Valenciana para detectar la xenoinfección por parte del virus XMRV y relacionados con el MLV, rindió inicialmente un porcentaje de positivos 20% (30/154) con un ligero predominio en el subgrupo de pacientes de FM (24%) frente a las muestras control (15%).

Estos resultados se encontraban en la línea de los obtenidos por el grupo de Silverman (93) aunque con menores diferencias entre participantes enfermos y sanos, ya que ellos obtuvieron positividad en el 67% de enfermos y solamente 3,7% en sanos. Era posible que esta diferencia estuviera asociada a que el análisis incluía poblaciones de regiones geográficas distantes.

El hecho de que las secuencias obtenidas fueran idénticas al molde utilizado como control positivo, el aislado americano vp62 sin presentar ningún tipo de variación junto M. García Escudero

con la polémica servida por el largo número de publicaciones que cuestionaban la existencia de una xenoinfección humana por parte del virus en estudio, nos hizo revisar la validez de estos resultados iniciales.

Al igual que ocurrió en el trabajo realizado por Menéndez Arias de la Universidad Autónoma de Madrid (185) las muestras positivas obtenidas en nuestro estudio en primera instancia no resultaron consistentemente amplificables, es decir, no sirvieron para amplificar la secuencia *env* del XMRV de forma reproducible en intentos posteriores cuestionando así la validez de nuestros hallazgos iniciales.

Aunque en nuestro laboratorio no se trabaja directamente con ratones o líneas celulares murinas y las polimerasa de nuestro estudio no se encontraba entre las que se habían reportado como contaminadas con ADN murino, nuestro proveedor de reactivos (Promega) no podía certificar ausencia de contaminación por lo que sometimos a evaluación tanto nuestros reactivos como las preparaciones de ADN genómico humano mediante la sensible técnica de amplificación de secuencias murinas IAP (Intracisternal A Particles) mediante amplificación por PCR según previamente descrito por Robinson *et al.* (94). Estas secuencias IAPs corresponden a secuencias repetitivas de elementos retrotransponibles presentes en el genoma de ratón en elevado número de copias, por lo que su detección no requiere de técnicas de alta sensibilidad y resulta claramente superior a métodos alternativos tal como la detección de ADN mitocondrial de ratón (94, 186).

A diferencia de otros investigadores no pudimos encontrar ninguna evidencia de ADN murino contaminante. Los resultados de la Figura 14 muestran un ejemplo de PCR negativa para presencia de IAPs en algunas de nuestras muestras y en los reactivos utilizados.

Si la amplificación de secuencias del XRMW en nuestras muestras de sangre de los participantes derivaba de infección viral debíamos ser capaces no sólo de reproducir los resultados obtenidos a partir de una muestra preparada de forma independiente del mismo individuo, sino también debiéramos poder detectar otras partes del genoma viral.

El hecho de que la amplificación positiva inicial del XMRV para la región *env* no pudiera ser reproducida a partir de la extracción de ADN genómico de alícuotas congeladas de los mismos participantes, junto con la falta de amplificación de otras regiones del genoma viral, específicamente la secuencia de *gag*, nos hizo concluir que cabía la posibilidad de que nuestras amplificaciones iniciales derivaran de contaminación aérea por amplicones vp62 en el área de trabajo, especialmente dada la identidad del 100% de nuestras amplificaciones con la secuencia utilizado como control positivo en nuestros ensayos. Por ello se tomaron medidas de extrema precaución en la reevaluación del análisis de amplificación de las muestras positivas, las cuales incluyeron: nueva preparación de ADN genómico, utilización de nuevos reactivos operando dentro de una campana con lámpara ultravioleta para PCR (Euroclone modelo aura ref. PCR PC10000), tal como se describe en materiales y métodos, restringiendo además la entrada de las muestras control a la campana de preparación de muestras.

Ninguna de las amplificaciones ensayadas bajo estas estrictas condiciones permitió la obtención de secuencias virales a partir de las nuevas preparaciones de ADN genómico como muestra la Tabla resumen del cribado que se presenta a continuación.

Tabla 13: Cribado de retrovirus por PCR anidada

Samples positive/assayed		XMRV/MLV				HTLV-2
		env		gag		<i>gag</i>
		Assay 1	Assay 2	GAG-I- F/R	NP116/1 17	
F	gADNprep1 (n=75)	18/75	8/18*	0/75	0/75	0/75
	gADNprep2 (n=18)	ND	0/18	0/18	0/18	0/18
Samples positive/assayed		XMRV/MLV				HTLV-2
		env		gag		<i>gag</i>
		Assay 1	Assay 2	GAG-I- F/R	NP116/1 17	
C	gADNprep1 (n=79)	12/79	5/12*	0/79	0/79	0/79
	gADNprep2 (n=12)	ND	0/12	0/12	0/12	0/12

Permitiéndonos definitivamente concluir la ausencia de infección viral por parte del virus XMRV y relacionados con el MLV así como por parte del virus HTLV-2 y variantes cercanas, tanto en individuos sanos como en pacientes participantes.

Además de los dos informes iniciales de Lombardi et al. y Lo et al. que mostraban una llamativa asociación entre la presencia de XMRV o secuencias relacionadas con el MLV y una condición de fatiga crónica, ambos actualmente retractados, otros grupos de investigadores también han informado de la amplificación positiva de secuencias murinas del retrovirus gamma en muestras humanas (93). Tras ser revisadas, la mayoría de estas amplificaciones positivas han podido ser atribuidas a la presencia de ADN contaminante de ratón (94-95). Sin embargo, algunos estudios en los que no se

halló contaminación por ADN murino no encuentran modo alguno de explicar la amplificación inconsistente de secuencias relacionadas con el virus MLV ni la incapacidad de amplificar regiones alternativas del virus (99, 183). Es posible que sus amplificaciones inconsistentes puedan derivar de contaminación aérea por amplicones similares a las que hemos detectado en este estudio.

Alternativamente la inconsistencia de amplificación de que la secuencia viral diana pudiera explicarse si ésta estuviera presente en una proporción extremadamente escasa, es decir en el caso de que una muy baja proporción de células sanguíneas fueran competentes de ser infectadas por el virus XMRV, en cuyo caso la cantidad de ADN genómico utilizado podría ser determinante en la obtención de positivos de manera inconsistente. Sin embargo, siendo que la mayoría de estudios en los que se han hallado amplificaciones inconsistentes de secuencias virales MLV, incluido el nuestro, partían de 0,5-1 µg de ADN genómico (187-188), resulta altamente improbable que esta pueda ser la explicación. Especialmente cuando los ensayos de sensibilidad de detección de secuencias en este y otros estudios señalan que tan solo 1-10 copias del virus resultarían suficientes para su detección mediante la técnica de PCR anidada, y por tanto, siendo que cada célula somática contiene 6.16 pg of ADN, la cantidad de células competentes de ser infectadas debiera ser inferior a una de cada 300,000 para poder encontrarnos en tal escenario.

Sin embargo, nuestra recomendación es que adicional a los rigurosos chequeos de contaminación y el acceso restringido de controles positivos en las zonas de trabajo se requiera confirmación de resultados positivos en más de una región del virus y a partir de preparaciones independientes del mismo individuo a la hora de diagnosticar infección viral mediante la técnica de alta sensibilidad de amplificación por PCR anidada.

Aunque se han dirigido grandes esfuerzos a la búsqueda de infecciones derivadas del virus MLV y sus variantes en pacientes con SFC sólo unos pocos (99-101, 167, 170) han incluido pacientes de FM, y entre ellos sólo uno ha incluido una cohorte con un número mayor de pacientes que nuestro estudio (99).

El diseño inicial de los primers para la detección del virus XMRV cuidó seleccionar regiones conservadas entre el XMRV y los virus MLV para poder detectar infección por éstos últimos tal como describió Lo *et al.* en su trabajo (86). Adicionalmente, con el objeto de asegurar que nuestro ensayo podría identificar variantes de los virus XMRV, MLV o HTLV-2, se realizaron ensayos de amplificación bajo condiciones de amplificación no restrictivas consistentes en reducir la temperatura de hibridación 5°C por debajo de la Tm de los primers. Bajo estas condiciones de amplificación permisivas se obtuvieron productos, algunos de ellos de tamaño cercano al esperado para secuencias *gag*. Sin embargo, ninguna de las bandas secuenciadas mostró secuencias virales sino secuencias de ADN genómico humano producto de amplificación inespecífica en todos los casos. Todo esto junto con el hecho de que el ADN genómico de nuestras preparaciones se hallaba intacto y no contenía impurezas inhibidoras del ensayo (ver resultados), permite descartar así mismo la infección por variantes de virus relacionados con el XMRV, MLV y HTLV-2 en nuestra población.

El hecho de no encontrar evidencia de infección por el virus XMRV, HTLV-2 o relacionados con ellos, no descarta una posible correlación entre la FM e infección viral, ya que cabe la posibilidad de la existencia de otros virus que no han podido ser detectados por nuestros primers en la cohorte de pacientes evaluados.

En este sentido las técnicas de secuenciación masiva de bajo coste pueden llegar a resultar herramientas altamente valiosas en la identificación de nuevas especies virales competentes de infectar células humanas (identificación del viroma humano) así como permitir una comprensión más completa y detallada de la variación y evolución viral dependiente de los eventos de replicación y transmisión (189). El uso de estas técnicas en estudios de metagenómica resulta imprescindible en la comprensión de cómo el viroma humano afecta la salud, inmunidad y respuesta a co-infecciones a largo plazo.

Adicionalmente un posible indicio de predisposición a infecciones recurrentes en enfermos de FM proporcionado por la literatura médica hizo se incluyera como parte de los objetivos de este estudio la caracterización de las formas moleculares de la

enzima RNasa L, ya que la presencia de una forma truncada de 37 kDa había sido propuesta como posible biomarcador de la enfermedad (159-160).

El análisis estadístico de los valores de abundancia relativa de la forma truncada obtenidos mediante análisis por Western Blot de los extractos protéicos de PBMCs de los participantes muestra una alta variación entre individuos con valores que oscilan entre un 2% y 172% en pacientes y de un 3% al 165% en individuos sanos. Las medias de los cocientes obtenidos del $48,26 \pm 32,68$ y $44,52 \pm 36,96$ % en pacientes y controles respectivamente son superponibles, con desviaciones típicas cercanas al valor de su media aritmética. El análisis no paramétrico de los valores de abundancia relativa mediante la prueba U de Mann-Whitney indica que no existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre los valores de abundancia relativa obtenidos con las muestras de pacientes y los obtenidos del análisis de participantes sanos. Resultado que nos permite descartar una asociación entre la sobreexpresión de la versión truncada de 37 kDa de la RNasa L y la condición de fatiga crónica en nuestra cohorte de pacientes, desestimando por tanto la propuesta de Tiev *et al.* (159-160) en lo que respecta a una correlación de la forma truncada de 37 kDa y la fatiga crónica.

La enorme variabilidad de la abundancia relativa del fragmento de 37 kDa inter-individuo observada, tanto en pacientes como en sujetos control, y que abarca valores que van desde un pequeño porcentaje (2%) hasta casi doblar la abundancia de la forma íntegra pudieran limitar la capacidad de detección de alteraciones atribuibles a fatiga crónica. Quizás el análisis de una población más homogénea en lo que se refiere a condiciones ambientales y de infección pudiera acotar el rango de variabilidad interindividuo y por tanto permitir la detección de cambios debidos a la enfermedad de FM/SFC. Sería interesante así mismo evaluar bajo estas mismas condiciones controladas la expresión y regulación de otros factores del sistema de defensa viral 2-5A tales como las isoformas de las enzimas OAS y del inhibidor RLI, con acción conocida en la regulación de la activación de la RNasa L (127-128, 137-141). Estos datos permitirían no solamente conocer en mayor detalle el mecanismo de acción de la enzima RNasa L en sus versiones intacta (83kDa) y truncada (37kDa) sino también

esclarecer de forma detallada las posibles desregulaciones atribuidas a la patología FM/SFC en lo que respecta al sistema de defensa anti-viral 2-5A.

Interesantemente en el curso de este estudio se han observado bandas adicionales en los ensayos de Western Blot no descritas previamente en la literatura que pudieran corresponder a formas novedosas de la enzima RNasa L. El determinar si esta es efectivamente su naturaleza y, en caso afirmativo, evaluar la existencia de correlación con la enfermedad, sin embargo, queda fuera del alcance del presente estudio.

7 CONCLUSIONES

1. El 20% de muestras que inicialmente amplificaron secuencias *env* del virus XMRV, y que incluían el 24% de pacientes (18/75) y el 15% de controles sanos (12/79) no evidenciaron contaminación con ADN murino. Tampoco lo hicieron ninguno de los reactivos utilizados en el cribado bajo las condiciones de sensibilidad de ensayo de 5 fg.
2. La identidad de estas secuencias *env* con el control positivo vp62 XMRV y la imposibilidad de amplificación de otras regiones del virus, o de estas mismas regiones en preparaciones independientes de ADN genómico humano permitió concluir que derivaban de amplicones contaminantes.
3. Finalmente ninguna de las 154 muestras evaluadas (75 pacientes de FM y 79 controles) mostró evidencia de infección por cualquiera de los dos retrovirus (XMRV y HTLV-2) u otros retrovirus relacionados con ellos según los criterios establecidos en este estudio, consistentes en la amplificación reproducible de diversas regiones del virus en muestras independientes de genómico del mismo individuo.
4. La falta de amplificación de secuencias virales no fue debida a falta de integridad del ADN genómico preparado, ni a la presencia de inhibidores de la amplificación por PCR. Tampoco fue debido a la falta de sensibilidad del ensayo determinada en 1-10 copias del virus por microgramo de ADN genómico. Por lo tanto los resultados obtenidos pueden interpretarse como evidencia de inexistencia de infección viral por XMRV y HTLV-2 o virus cercanamente relacionados, tanto enfermos como controles sanos.
5. La abundancia relativa de la forma truncada de la RNasa L de peso molecular aproximado de 37 kDa con respecto a la forma íntegra de 83 kDa no mostró asociación significativa a la condición de fatiga crónica como había sido propuesto previamente. Se desestima por tanto este criterio como biomarcador de la enfermedad.

6. Los resultados negativos reportados en este y otros estudios de cribado no permiten descartar la posibilidad de una infección viral o un conjunto de infecciones virales como el origen de la FM y / o SFC.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Bartels EM, Dreyer L, Jacobsen S, Jespersen A, Bliddal H, Danneskiold-Samsoe B. [Fibromyalgia, diagnosis and prevalence. Are gender differences explainable?]. Ugeskr Laeger. 2009 Nov 30;171(49):3588-92.
2. Goldenberg DL. Diagnosis and differential diagnosis of fibromyalgia. Am J Med. 2009 Dec;122(12 Suppl):S14-21.
3. Andreu SJ. La fibromialgia y su diagnóstico. Rev Clin Esp. 2005;205(7):333.
4. Wolfe F. Fibromyalgia: the clinical syndrome. Rheum Dis Clin North Am. 1989 Feb;15(1):1-18.
5. Klinger R, Denecke H, Glier B, Kroner-Herwig B, Nilges P, Redegeld M, et al. [Quality control in the therapy of chronic pain. Results obtained by a task force of the German Section of the International Association for the Study of Pain on psychological assessment of chronic pain. XI. Assessment and multiaxial classification of pain]. Schmerz. 1997 Dec 12;11(6):378-85.
6. Bramer GR. International statistical classification of diseases and related health problems. Tenth revision. World Health Stat Q. 1988;41(1):32-6.
7. Podolecki T, Podolecki A, Hrycek A. Fibromyalgia: pathogenetic, diagnostic and therapeutic concerns. Pol Arch Med Wewn. 2009 Mar;119(3):157-61.
8. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. Arthritis Rheum. 1990 Feb;33(2):160-72.
9. Buskila D. Fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, and myofascial pain syndrome. Curr Opin Rheumatol. 2001 Mar;13(2):117-27.
10. J. García Campayo ea. Documento de Consenso interdisciplinar para el tratamiento de la fibromialgia Actas Esp Psiquiatr. 2010;38(2):108-20.
11. Ahles TA, Khan SA, Yunus MB, Spiegel DA, Masi AT. Psychiatric status of patients with primary fibromyalgia, patients with rheumatoid arthritis, and subjects without pain: a blind comparison of DSM-III diagnoses. Am J Psychiatry. 1991 Dec;148(12):1721-6.
12. Yunus MB. The prevalence of fibromyalgia in other chronic pain conditions. Pain Res Treat. 2012;2012:584573.
13. Siegel DM, Janeway D, Baum J. Fibromyalgia syndrome in children and adolescents: clinical features at presentation and status at follow-up. Pediatrics. 1998 Mar;101(3 Pt 1):377-82.
14. White P, Murphy M, Moss J, Armstrong G, Spencer P. Chronic fatigue syndrome or myalgic encephalomyelitis. BMJ. 2007 Sep 1;335(7617):411-2.
15. Friedberg F, Jason LA. Chronic fatigue syndrome and fibromyalgia: clinical assessment and treatment. J Clin Psychol. 2001 Apr;57(4):433-55.
16. Casale R, Rainoldi A. Fatigue and fibromyalgia syndrome: clinical and neurophysiologic pattern. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2011 Apr;25(2):241-7.
17. Burckhardt CS, Clark SR, Bennett RM. Fibromyalgia and quality of life: a comparative analysis. J Rheumatol. 1993 Mar;20(3):475-9.
18. Lorusso L, Mikhaylova SV, Capelli E, Ferrari D, Ngonga GK, Ricevuti G. Immunological aspects of chronic fatigue syndrome. Autoimmun Rev. 2009 Feb;8(4):287-91.
19. Matsumoto Y. [Immunological aspects of pathophysiology of chronic fatigue syndrome]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 1999 Jun;22(3):111-22.
20. 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 Dec 15;121(12):953-9.

21. Burns D. Chronic fatigue syndrome or myalgic encephalomyelitis. *Nurs Stand.* 2012 Feb 22-28;26(25):48-56; quiz 8.
22. Zijlstra TR, Taal E, van de Laar MA, Rasker JJ. Validation of a Dutch translation of the fibromyalgia impact questionnaire. *Rheumatology (Oxford).* 2007 Jan;46(1):131-4.
23. Srifi N, Bahiri R, Rostom S, Bendeddouche I, Lazrek N, Hajjaj-Hassouni N. The validity and reliability of the Moroccan version of the Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire. *Rheumatol Int.* 2012 Jan 31.
24. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Fiorini T, Panni B, Randisi G, Turiel M, et al. Validation of an Italian version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ-I). *Clin Exp Rheumatol.* 2003 Jul-Aug;21(4):459-64.
25. Sarmer S, Ergin S, Yavuzer G. The validity and reliability of the Turkish version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire. *Rheumatol Int.* 2000 Dec;20(1):9-12.
26. Rivera J, Gonzalez T. The Fibromyalgia Impact Questionnaire: a validated Spanish version to assess the health status in women with fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol.* 2004 Sep-Oct;22(5):554-60.
27. Perrot S, Dumont D, Guillemin F, Pouchot J, Coste J. Quality of life in women with fibromyalgia syndrome: validation of the QIF, the French version of the fibromyalgia impact questionnaire. *J Rheumatol.* 2003 May;30(5):1054-9.
28. Offenbaecher M, Waltz M, Schoeps P. Validation of a German version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ-G). *J Rheumatol.* 2000 Aug;27(8):1984-8.
29. Osada K, Oka H, Isomura T, Nakamura I, Tominaga K, Takahashi S, et al. Development of the Japanese version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire (JFIQ): psychometric assessments of reliability and validity. *Int J Rheum Dis.* 2011 Feb;14(1):74-80.
30. Kim YA, Lee SS, Park K. Validation of a Korean version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire. *J Korean Med Sci.* 2002 Apr;17(2):220-4.
31. Hedin PJ, Hamne M, Burckhardt CS, Engstrom-Laurent A. The Fibromyalgia Impact Questionnaire, a Swedish translation of a new tool for evaluation of the fibromyalgia patient. *Scand J Rheumatol.* 1995;24(2):69-75.
32. Gencay-Can A, Can SS. Validation of the Turkish version of the fatigue severity scale in patients with fibromyalgia. *Rheumatol Int.* 2012 Jan;32(1):27-31.
33. Friend R, Bennett RM. Distinguishing fibromyalgia from rheumatoid arthritis and systemic lupus in clinical questionnaires: an analysis of the revised Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR) and its variant, the Symptom Impact Questionnaire (SIQR), along with pain locations. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(2):R58.
34. Fallon J, Bujak DI, Guardino S, Weinstein A. The Fibromyalgia Impact Questionnaire: a useful tool in evaluating patients with post-Lyme disease syndrome. *Arthritis Care Res.* 1999 Feb;12(1):42-7.
35. Ediz L, Hiz O, Toprak M, Tekeoglu I, Ercan S. The validity and reliability of the Turkish version of the Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire. *Clin Rheumatol.* 2011 Mar;30(3):339-46.
36. Burckhardt CS, Clark SR, Bennett RM. The fibromyalgia impact questionnaire: development and validation. *J Rheumatol.* 1991 May;18(5):728-33.
37. Bennett R. The Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ): a review of its development, current version, operating characteristics and uses. *Clin Exp Rheumatol.* 2005 Sep-Oct;23(5 Suppl 39):S154-62.
38. Bennett RM, Friend R, Jones KD, Ward R, Han BK, Ross RL. The Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR): validation and psychometric properties. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(4):R120.
39. Assumpcao A, Pagano T, Matsutani LA, Ferreira EA, Pereira CA, Marques AP. Quality of life and discriminating power of two questionnaires in fibromyalgia patients: Fibromyalgia Impact Questionnaire and Medical Outcomes Study 36-Item Short-Form Health Survey. *Rev Bras Fisioter.* 2010 Jul-Aug;14(4):284-9.

40. Bennett RM, Bushmakin AG, Cappelleri JC, Zlateva G, Sadosky AB. Minimal clinically important difference in the fibromyalgia impact questionnaire. *J Rheumatol.* 2009 Jun;36(6):1304-11.
41. Baker R, Shaw EJ. Diagnosis and management of chronic fatigue syndrome or myalgic encephalomyelitis (or encephalopathy): summary of NICE guidance. *BMJ.* 2007 Sep 1;335(7617):446-8.
42. Gracely RH, Petzke F, Wolf JM, Clauw DJ. Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1333-43.
43. Guliaev VA, Avtandilov GG, Filatov VV. [Principles of diagnosis formulation based on requirements of the International statistical classification of diseases and health-related problems]. *Voen Med Zh.* 2000 Dec;321(12):18-22.
44. Yunus MB, Masi AT, Aldag JC. A controlled study of primary fibromyalgia syndrome: clinical features and association with other functional syndromes. *J Rheumatol Suppl.* 1989 Nov;19:62-71.
45. Yunus MB, Aldag JC. The Concept of Incomplete Fibromyalgia Syndrome: Comparison of Incomplete Fibromyalgia Syndrome With Fibromyalgia Syndrome by 1990 ACR Classification Criteria and Its Implications for Newer Criteria and Clinical Practice. *J Clin Rheumatol.* 2012 Mar;18(2):71-5.
46. Henriksen M, Lund H, Christensen R, Jespersen A, Dreyer L, Bennett RM, et al. Relationships between the fibromyalgia impact questionnaire, tender point count, and muscle strength in female patients with fibromyalgia: a cohort study. *Arthritis Rheum.* 2009 Jun 15;61(6):732-9.
47. Schneider MJ. Tender points/fibromyalgia vs. trigger points/myofascial pain syndrome: a need for clarity in terminology and differential diagnosis. *J Manipulative Physiol Ther.* 1995 Jul-Aug;18(6):398-406.
48. Byrne E. Idiopathic chronic fatigue and myalgia syndrome (myalgic encephalomyelitis): some thoughts on nomenclature and aetiology. *Med J Aust.* 1988 Jan 18;148(2):80-2.
49. Capelli E, Zola R, Lorusso L, Venturini L, Sardi F, Ricevuti G. Chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010 Oct-Dec;23(4):981-9.
50. Esteve Vives JJ, Batlle Gualda E. Evaluation of patients with fibromyalgia. Comparative study of 4 Spanish versions of the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ). *Reumatol Clin.* 2006 Nov;2(6):283-8.
51. de Miquel CA, Campayo JG, Florez MT, Arguelles JM, Tarrio EB, Montoya MG, et al. Interdisciplinary consensus document for the treatment of fibromyalgia. *Actas Esp Psiquiatr.* 2010 Mar-Apr;38(2):108-20.
52. Myhill S, Booth NE, McLaren-Howard J. Chronic fatigue syndrome and mitochondrial dysfunction. *Int J Clin Exp Med.* 2009;2(1):1-16.
53. Calandre EP, Garcia-Carrillo J, Garcia-Leiva JM, Rico-Villademoros F, Molina-Barea R, Rodriguez-Lopez CM. Subgrouping patients with fibromyalgia according to the results of the Fibromyalgia Impact Questionnaire: a replication study. *Rheumatol Int.* 2011 Dec;31(12):1555-9.
54. de Souza JB, Goffaux P, Julien N, Potvin S, Charest J, Marchand S. Fibromyalgia subgroups: profiling distinct subgroups using the Fibromyalgia Impact Questionnaire. A preliminary study. *Rheumatol Int.* 2009 Mar;29(5):509-15.
55. Verra ML, Angst F, Brioschi R, Lehmann S, Keefe FJ, Staal JB, et al. Does classification of persons with fibromyalgia into Multidimensional Pain Inventory subgroups detect differences in outcome after a standard chronic pain management program? *Pain Res Manag.* 2009 Nov-Dec;14(6):445-53.
56. Andreu J, Sanz J. La fibromialgia y su diagnóstico. *Rev Clin Esp.* 2005;205(7):333-6.

57. J. Rivera. Controversias en el diagnóstico de fibromialgia. Revista Española de Reumatología 2004;31(9):501-6, Artículo 94.810.
58. Belenguer R, Ramos-Casals M, Siso A, Rivera J. [Classification of fibromyalgia. A systematic review of the literature]. Reumatol Clin. 2009 Mar-Apr;5(2):55-62.
59. Hissink Muller W. [Classification of fibromyalgia: criteria of the American College of Rheumatology]. Ned Tijdschr Geneeskd. 1992 Mar 21;136(12):596-7.
60. Giesecke T, Williams DA, Harris RE, Cupps TR, Tian X, Tian TX, et al. Subgrouping of fibromyalgia patients on the basis of pressure-pain threshold and psychological factors. Arthritis Rheum. 2004;50:2716-7.
61. Müller W, Schneider EM, Stratz T. The classification of fibromyalgia syndrome. Rheumatol Int. 2007;27:1005-10.
62. Thieme K, Turk DC, Flor H. Comorbid depression and anxiety in fibromyalgia syndrome: relationship to somatic and psychosocial variables. Psychosom Med. 2004;66:837-44.
63. Hassett AL, Simonelli LE, Radvanski DC, Buyske S, Savage SV, Sigal LH. The relationship between affect balance style and clinical outcomes in fibromyalgia. Arthritis Rheum. 2008;59:833-40.
64. Arita H, Hayashida M, Mizuno J, Ogawa S, Hanaoka K. [Pharmacological classification of intractable chronic pain (drug challenge tests)]. Masui. 2008 Nov;57(11):1330-6.
65. Riveraa J, Alegreb C, Nishishinyac MB y Peredad CA. Evidencias terapéuticas en fibromialgia. Reumatol Clin. 2006;2 Supl 1:S34-7.
66. Wolfe F. Fibromyalgia in the elderly: differential diagnosis and treatment. Geriatrics. 1988 Jun;43(6):57-60, 5, 8.
67. Neumann L, Sukenik S, Bolotin A, Abu-Shakra M, Amir M, Flusser D, et al. The effect of balneotherapy at the Dead Sea on the quality of life of patients with fibromyalgia syndrome. Clin Rheumatol. 2001;20(1):15-9.
68. Langhorst J, Musial F, Klose P, Hauser W. Efficacy of hydrotherapy in fibromyalgia syndrome--a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. Rheumatology (Oxford). 2009 Sep;48(9):1155-9.
69. Karper WB. Exercise program effects on one woman with multiple sclerosis, Crohn's disease, fibromyalgia syndrome, and clinical depression. N C Med J. 2001 Jan-Feb;62(1):14-6.
70. Buskila D, Abu-Shakra M, Neumann L, Odes L, Shneider E, Flusser D, et al. Balneotherapy for fibromyalgia at the Dead Sea. Rheumatol Int. 2001 Apr;20(3):105-8.
71. Millea PJ, Holloway RL. Treating fibromyalgia. Am Fam Physician. 2000 Oct 1;62(7):1575-82, 87.
72. Brady DM, Schneider MJ. Fibromyalgia syndrome: a new paradigm for differential diagnosis and treatment. J Manipulative Physiol Ther. 2001 Oct;24(8):529-41.
73. Iglesias Arrabal C, Neira-Reina F, Del Pino Algarrada R, Elorza Guisasola J, Rendón Acosta A y Gómez Rodríguez F. Documento de consenso multidisciplinar para la implantación del Proceso Asistencial Integrado Fibromialgia en el área hospitalaria dependiente del Hospital Universitario de Puerto Real. Rev Soc Esp Dolor 2011;18(4):241-8.
74. Buskila D, Sarzi-Puttini P, Ablin JN. The genetics of fibromyalgia syndrome. Pharmacogenomics. 2007 Jan;8(1):67-74.
75. Bondy B, Spaeth M, Offenbaecher M, Glatzeder K, Stratz T, Schwarz M, et al. The T102C polymorphism of the 5-HT2A-receptor gene in fibromyalgia. Neurobiol Dis. 1999 Oct;6(5):433-9.
76. Frank B, Niesler B, Bondy B, Spath M, Pongratz DE, Ackenheil M, et al. Mutational analysis of serotonin receptor genes: HTR3A and HTR3B in fibromyalgia patients. Clin Rheumatol. 2004 Aug;23(4):338-44.

77. Theoharides TC, Asadi S, Weng Z, Zhang B. Serotonin-selective reuptake inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs--important considerations of adverse interactions especially for the treatment of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *J Clin Psychopharmacol.* 2011 Aug;31(4):403-5.
78. Barbosa FR, Matsuda JB, Mazucato M, de Castro Franca S, Zingaretti SM, da Silva LM, et al. Influence of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms in pain sensitivity of Brazilian fibromyalgia patients. *Rheumatol Int.* 2012 Feb;32(2):427-30.
79. Buskila D, Press J. Neuroendocrine mechanisms in fibromyalgia-chronic fatigue. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001 Dec;15(5):747-58.
80. Light KC, White AT, Tadler S, Jacob E, Light AR. Genetics and Gene Expression Involving Stress and Distress Pathways in Fibromyalgia with and without Comorbid Chronic Fatigue Syndrome. *Pain Res Treat.* 2012;2012:427869.
81. Lynch S, Seth R. Depression and myalgic encephalomyelitis. *J R Soc Med.* 1990 May;83(5):341.
82. Yunus MB. Psychological aspects of fibromyalgia syndrome: a component of the dysfunctional spectrum syndrome. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1994 Nov;8(4):811-37.
83. Kerr JR. Gene profiling of patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *Curr Rheumatol Rep.* 2008 Dec;10(6):482-91.
84. Williams DA, Gendreau M, Hufford MR, Groner K, Gracely RH, Clauw DJ. Pain assessment in patients with fibromyalgia syndrome: a consideration of methods for clinical trials. *Clin J Pain.* 2004 Sep-Oct;20(5):348-56.
85. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain Suppl.* 1986;3:S1-226.
86. Lo SC, Pripuzova N, Li B, Komaroff AL, Hung GC, Wang R, et al. Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Sep 7;107(36):15874-9. Retraction in: Lo SC, Pripuzova N, Li B, Komaroff Al, Hung GC, Wang R, et al. Retraction for Lo et al., Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 3;109(1):346.
87. Sudlow C, Macleod M, Al-Shahi Salman R, Stone J. Comment on "Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome". *Science.* 2010 May 14;328(5980):825; author reply
88. 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.
89. Klimas NG, Salvato FR, Morgan R, Fletcher MA. Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome. *J Clin Microbiol.* 1990 Jun;28(6):1403-10.
90. Meeus M, Nijs J, McGregor N, Meeusen R, De Schutter G, Truijen S, et al. Unravelling intracellular immune dysfunctions in chronic fatigue syndrome: interactions between protein kinase R activity, RNase L cleavage and elastase activity, and their clinical relevance. *In Vivo.* 2008 Jan-Feb;22(1):115-21.
91. Nijs J, Van Oosterwijck J, Meeus M, Lambrecht L, Metzger K, Fremont M, et al. Unravelling the nature of postexertional malaise in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: the role of elastase, complement C4a and interleukin-1beta. *J Intern Med.* 2010 Apr;267(4):418-35.
92. Demettre E, Bastide L, D'Haese A, De Smet K, De Meirlier K, Tieb KP, et al. Ribonuclease L proteolysis in peripheral blood mononuclear cells of chronic fatigue syndrome patients. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20;277(38):35746-51.
93. Lombardi VC, Ruscetti FW, Das Gupta J, Pfost MA, Hagen KS, Peterson DL, et al. Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science.* 2009 Oct 23;326(5952):585-9. Retraction in: Alberts B. *Science.* 2011 Dec 23;334(6063):1636. Partial retraction in: Silverman RH, Das Gupta J, Lombardi M. *García Escudero*

- VC, Ruscetti FW, Pfost MA, Hagen KS, Peterson DL, Ruscetti SK, Bagni RK, Petrow-Sadowski C, Gold B, Dean M, Mikovits JA. *Science*. 2011 Oct 14;334(6053):176.
94. Robinson MJ, Erlwein OW, Kaye S, Weber J, Cingoz O, Patel A, et al. Mouse DNA contamination in human tissue tested for XMRV. *Retrovirology*. 2010;7:108.
95. Oakes B, Tai AK, Cingöz O, Henefield MH, Levine S, Coffin JM, Huber BT. Contamination of human DNA samples with mouse DNA can lead to false detection of XMRV-like sequences. *Retrovirology*. 2010;7:109.
96. Hué S, Gray ER, Gall A, Katzourakis A, Tan CP, Houldcroft CJ, McLaren S, Pillay D, Futreal A, Garson JA, Pybus OG, Kellam P, Towers GJ. Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination. *Retrovirology*. 2010;7(1):111.
97. Zhang YA, Maitra A, Hsieh JT, Rudin CM, Peacock CD, Karikari C, et al. Frequent detection of infectious xenotropic murine leukemia virus (XMLV) in human cultures established from mouse xenografts. *Cancer Biol Ther*. 2011 Oct 1;12(7):617-28.
98. Kim S, Kim N, Dong B, Boren D, Lee SA, Das Gupta J, et al. Integration site preference of xenotropic murine leukemia virus-related virus, a new human retrovirus associated with prostate cancer. *J Virol*. 2008 Oct;82(20):9964-77.
99. Arredondo M, Hackett J Jr, de Bethencourt FR, Treviño A, Escudero D, Collado A, Qiu X, Swanson P, Soriano V, de Mendoza C. Prevalence of xenotropic murine leukemia virus-related virus infection in different risk populations in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(9):1089-94.
100. Maggi F, Bazzichi L, Sernissi F, Mazzetti P, Lanini L, Scarpellini P, Consensi A, Giacomelli C, Macera L, Vatteroni ML, Bombardieri S, Pistello M. Absence of xenotropic murine leukemia virus-related virus in Italian patients affected by chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, or rheumatoid arthritis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25(2):523-9.
101. Luczkowiak J, Sierra O, González-Martín JJ, Herrero-Beaumont G, Delgado R. No xenotropic murine leukemia virus-related virus detected in fibromyalgia patients. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(2):314-5.
102. Linial ML, Fan, H., Hahn, B., Lo" wer, R., Neil, J., Quackenbush, S., Rethwilm A, Sonigo, P., Stoye, J. & Tristem, M. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Retroviridae. 2005:421-40.
103. Harriet C. T G, Kate N. Bishop. The tale of xenotropic murine leukemia virus-related virus. *Journal of General Virology*. 2012(93):915-24.
104. Frankel WN, Stoye, J. P., Taylor, B. A. & Coffin, J. M. A linkage map of endogenous murine leukemia proviruses. *Genetics*. 1990;221-36.
105. Stocking CK, C. A. Murine endogenous retroviruses. *Cell Mol Life Sci*. 2008;3383-98.
106. Waterston RH, Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M. & other authors. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420:520-62.
107. Stoye J. P, Coffin JM. The four classes of endogenous murine leukemia virus: structural relationships and potential for recombination. *J Virol*. 1987;61:2659-69.
108. Kai K, Furuta, T. Isolation of paralysis-inducing murine leukemia viruses from Friend virus passaged in rats. *J Virol*. 1984;50:970-3.
109. Ruscetti SK. Deregulation of erythropoiesis by the Friend spleen focus-forming virus. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:1089-109.
110. Kozak CA. The mouse "xenotropic" gammaretroviruses and their XPR1 receptor. *Retrovirology*. 2010;7:101.
111. Dong B, Kim, S., Hong, S., Das Gupta, J., Malathi, K., Klein, E. A., Ganem, D., Derisi, J. L., Chow, S. A. & Silverman, R. H. An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:1655-60.
112. Groom HC, Boucherit, V. C., Makinson, K., Randal, E., Baptista, S., Hagan, S., Gow, J. W., Mattes, F. M., Breuer, J. & other authors. Absence of xenotropic murine leukaemia M. García Escudero

- virus-related virus in UK patients with chronic fatigue syndrome. *Retrovirology*. 2010;7:10.
113. Rodriguez JJ, Goff, S. P. Xenotropic murine leukemia virus-related virus establishes an efficient spreading infection and exhibits enhanced transcriptional activity in prostate carcinoma cells. *J Virol*. 2010;84:2556-62.
114. Stieler K, Schulz, C., Lavanya, M., Aepfelmacher, M., Stocking, C., Fischer, N. Host range and cellular tropism of the human exogenous gammaretrovirus XMRV. *Virology*. 2010;399:23-30.
115. Bogerd HP, Zhang, F., Bieniasz, P. D., Cullen, B. R. Human APOBEC3 proteins can inhibit xenotropic murine leukemia virus-related virus infectivity. *Virology*. 2011;410:234-9.
116. Paprotka T, Delviks-Frankenberry, K. A., Cingo" z, O., Martinez, A., Kung, H. J., Tepper, C. G., Hu, W. S., Fivash, M. J., Jr, Coffin, J. M., Pathak, V. K. Recombinant origin of the retrovirus XMRV. *Science*. 2011;333:97-101.
117. Stieler K, Fischer, N. Apobec 3G efficiently reduces infectivity of the human exogenous gammaretrovirus XMRV. *PloS One*. 2010 Jul 23;5(7):e11738.
118. Paprotka T, Venkatachari, N. J., Chaipan, C., Burdick, R., Delviks-Frankenberry, K. A., Hu, W. S., Pathak, V. K. Inhibition of xenotropic murine leukemia virus-related virus by APOBEC3 proteins and antiviral drugs. *J Virol*. 2010 Jun;84(11):5719-29.
119. Toro C, Rodes B, Bassani S, Jimenez V, Tuset C, Brugal MT, et al. Molecular epidemiology of HTLV-2 infection among intravenous drug users in Spain. *J Clin Virol*. 2005 May;33(1):65-70.
120. Vrielink H, andReesink,H.W. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. *TransfusMedRev*. 2004;18:46-57.
121. Brites C, Oliveira,A.S.,Netto,E.M. Coinfection with HIV and human T lymphotropic virus type1: what is the real impact on HIV disease? *Clin Infect Dis*. 2005;40:329-30.
122. Pilotti E, Bianchi MV, De Maria A, Bozzano F., Romanelli MG., Bertazzoni U., Casoli C. HTLV-1/-2 and HIV-1 co-infections: retroviral interference on host immune status. *Front Microbiol*. 2013 Dec 23;4:372.
123. Elaine DeFreitas, Brendan Hillard, Paul R. Cheneyt, David S. Bells, Edward Kiggundu, Diane Sankey, Zofia Wroblewska, Maria Palladino, John P. Woodwards and Hilary Koprowski. Retroviral sequences related to human T-lymphotropic virus type II in patients with chronic fatigue immune dysfunction syndrome. 1991;88:2922-6.
124. Beilke MA, Traina-Dorge VL, Sirois M, Bhuiyan A, Murphy EL, Walls JM, Fagan R, Winsor EL, Kissinger PJ. Relationship between human T lymphotropic virus (HTLV) type 1/2 viral burden and clinical and treatment parameters among patients with HIV type 1 and HTLV-1/2 coinfection. *Clin Infect Dis*. 2007;44(9):1229-34.
125. Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev*. 2004;6(3):144-54.
126. Ezelle HJ, Hassel BA. Pathologic effects of RNase-L dysregulation in immunity and proliferative control. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012 Jan 1;4:767-86.
127. Bisbal C, Silverman RH. Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie*. 2007 Jun-Jul;89(6-7):789-98.
128. Chakrabarti A, Jha BK, Silverman RH. New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J Interferon Cytokine Res*. 2011 Jan;31(1):49-57.
129. Slattery E, Ghosh N, Samanta H, Lengyel P.. Interferon, double-stranded RNA, and RNA degradation: activation of an endonuclease by (2'-5')An. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:4778-82.
130. Floyd SG, Yoshie O, Lengyel P. Interferon action. Covalent linkage of (2'-5') $\text{p}(\text{pApA})_n\text{pCp}$ to (2'-5')(A)n-dependent ribonucleases in cell extracts by ultraviolet irradiation. *J Biol Chem*. 1982;257:8584-7.
131. Silverman RH JD, Nolan SN, Dieffenbach CW, Kedar VP, SenGupta DN. Purification and analysis of murine 2-5A-dependent RNase. *J Biol Chem*. 1988;263:7336-41.

132. Zhou A HB, Silverman RH. Expression cloning of 2'-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell.* 1993;72:753-65.
133. Bisbal C, Salehzada T, Lebleu B, Bayard B. Characterization of two murine (2'-5')(A)n-dependent endonucleases of different molecular mass. *Eur J Biochem.* 1989;179:595-602.
134. Le Roy F, Laskowska A, Silhol M, Salehzada T, Bisbal C. Characterization of RNABP, an RNA binding protein that associates with RNase L. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20:635-44.
135. Bisbal C, Martinand C, Silhol M, Lebleu B, Salehzada T. Cloning and characterization of RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2'-5A pathway. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270:13308-17.
136. Shetzline SE, Martinand-Mari C, Reichenbach NL, Buletic Z, Lebleu B, Pfleiderer W, et al. Structural and functional features of the 37-kDa 2'-5A-dependent RNase L in chronic fatigue syndrome. *J Interferon Cytokine Res.* 2002 Apr;22(4):443-56.
137. Le Roy F, Bisbal C, Silhol M, Martinand C, Lebleu B, Salehzada T. The 2'-5A/RNase L/RNase L inhibitor (RLI) [correction of (RNI)] pathway regulates mitochondrial mRNAs stability in interferon alpha-treated H9 cells. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276:48473-82.
138. Martinand C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. RNase L inhibitor (RLI) antisense constructions block partially the down regulation of the 2'-5A/RNase L pathway in encephalomyocarditis-virus-(EMCV)-infected cells. *Eur J Biochem.* 1998;254:248-55.
139. Karcher A, Buttner K, Martens B, Jansen R, Hopfner K. X-ray structure of RLI, an essential twin cassette ABC ATPase involved in ribosome biogenesis and HIV capsid assembly. *Structure.* 2005;13:649-59.
140. Martinand C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. The RNase L inhibitor (RLI) is induced by double-stranded RNA. *J Interferon Cytokine Res.* 1998;18:1031-8.
141. Aubry F, Mattei M, Barque J, Galibert F. Chromosomal localization and expression pattern of the RNase L inhibitor gene. *FEBS Lett.* 1996;381:135-9.
142. Benoit De coignac A, Bisbal C, Lebleu B, Salehzada T. cDNA cloning and expression analysis of the murine ribonuclease L Inhibitor. *Gene.* 1998;209:149-56.
143. Nijs J, De Meirlier K. Impairments of the 2'-5A synthetase/RNase L pathway in chronic fatigue syndrome. *In Vivo.* 2005;19:1013-21.
144. Suhadolnik R, Reichenbach N, Hitzges P, Sobol RW, Peterson D, Henry B, et al. Upregulation of the 2'-5A synthetase/RNase L antiviral pathway associated with chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis.* 1994;18:96-104.
145. Suhadolnik R, Peterson D, Cheney P, Horvath S, Reichenbach N, O'Brien K, et al. Biochemical dysregulation of the 2'-5A synthetase/RNase L antiviral defense pathway in chronic fatigue syndrome. *J Chronic Fatigue Syndr.* 1999;5:223-42.
146. Martinand C, Montavon C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2'-5A/RNase L pathway in human T cells. *J Virol.* 1999;73:290-6.
147. Le Roy F, Salehzada T, Bisbal C, Dougherty J, Peltz S. A newly discovered function for RNase L in regulating translation termination. *Nature structural and molecular biology.* 2005;12:502-12.
148. Pisarev A, Skabkin M, Pisareva V, Skabkina O, Rakotondrafara A, Hentze M, et al. The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Molecular cell.* 37:196-210.
149. Vojdani A, Choppa PC, Lapp CW. Downregulation of RNase L inhibitor correlates with upregulation of interferon-induced proteins (2'-5A synthetase and RNase L) in patients with chronic fatigue immune dysfunction syndrome. *J Clin Lab Immunol.* 1998;50:1-16.
150. Curriu M, Carrillo J, Massanella M, Rigau J, Alegre J, Puig J, Garcia-Quintana AM, Castro-Marrero J, Negredo E, Clotet B, Cabrera C, Blanco J. Screening NK-, B- M. García Escudero

- and T-cell phenotype and function in patients suffering from Chronic Fatigue Syndrome. *J Transl Med.* 2013 Mar 20;11:68.
151. Whiteside T, Friberg D. Natural killer cells and natural killer cell activity in chronic fatigue syndrome. *Am J Med.* 1998;105:27S-34S.
 152. Suhadolnik R, Peterson D, O'Brien K, Cheney P, Herst CV, Reichenbach NL, et al. Biochemical evidence for a novel low molecular weight 2'-5A-dependent RNase L in chronic fatigue syndrome. *J Interferon Cytokine Res.* 1997;17(377-385).
 153. Roelens S, Herst CV, D'Haese A, De Smedt K, Fremont M, De Meirleir K, et al. G-actin cleavage parallels 2'-5A-dependent RNase L cleavage in peripheral blood mononuclear cells-relevance to a possible serum-based screening test for dysregulations in the 2'-5A pathway. *Journal of Chronic Fatigue Syndrome.* 2001;8:63-82.
 154. Shetzline SE, Suhadolnik R. Characterization of a 2',5'-oligoadenylate (2'-5A)-dependent 37-kDa RNase L: azido photoaffinity labeling and 2'-5A dependent activation. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276:23707-11.
 155. Fremont M, El Bakkouri K, Vaeyens F, Herst CV, De Meirleir K, Englebienne P. 2',5'-Oligoadenylate size is critical to protect RNase L against proteolytic cleavage in chronic fatigue syndrome. *Exp Mol Pathol.* 2005 Jun;78(3):239-46.
 156. Marie I, Blanco J, Rebouillat D, Hovanessian A. 69-kDa and 100kDa isoforms of interferon-induced (2'-5')oligoadenylate synthetase exhibit differential catalytic parameters. *Eur J Biochem.* 1997;248:558-66.
 157. Hartmann R, Norby P, Martensen P, Jorgensen P, James M, Jacobsen C, et al. Activation of 2'-5'oligoadenylate synthetase by single-stranded and double-stranded RNA aptamers. *J Biol Chem.* 1998;273:3236-46.
 158. Sarkar S, Brandyopadhyay S, Ghosh A, Sen G. Enzymatic characteristics of recombinant medium isozyme of 2'-5'oligoadenylate synthetase. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274:1848-55.
 159. Fremont M, Vaeyens F, Herst CV, De Meirleir K, Englebienne P. 37-Kilodalton/83-kilodalton RNase L isoform ratio in peripheral blood mononuclear cells: analytical performance and relevance for chronic fatigue syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Oct;12(10):1259-60; author reply 60.
 160. Tiev KP, Demetre E, Ercolano P, Bastide L, Lebleu B, Cabane J. RNase L levels in peripheral blood mononuclear cells: 37-kilodalton/83-kilodalton isoform ratio is a potential test for chronic fatigue syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Mar;10(2):315-6.
 161. Fletcher MA, Zeng XR, Maher K, Levis S, Hurwitz B, Antoni M, et al. Biomarkers in chronic fatigue syndrome: evaluation of natural killer cell function and dipeptidyl peptidase IV/CD26. *PLoS One.* 2010;5(5):e10817.
 162. Nijs J, Fremont M. Intracellular immune dysfunction in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: state of the art and therapeutic implications. *Expert Opin Ther Targets.* 2008 Mar;12(3):281-9.
 163. Brenu EW, van Driel ML, Staines DR, Ashton KJ, Ramos SB, Keane J, et al. Immunological abnormalities as potential biomarkers in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *J Transl Med.* 2011;9:81.
 164. Tiev KP, Briant M, Ziani M, Cabane J, Demetre E, Lebleu B. Variability of the RNase L isoform ratio (37 kiloDaltons/83 kiloDaltons) in diagnosis of chronic fatigue syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Feb;12(2):366.
 165. Krupp LB, LaRocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD. The fatigue severity scale. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol.* 1989 Oct;46(10):1121-3.
 166. Bullinger M, Morfeld M, Kohlmann T, Nantke J, van den Bussche H, Dodd B, et al. [SF-36 Health Survey in Rehabilitation Research. Findings from the North German Network for Rehabilitation Research, NVRF, within the rehabilitation research funding program]. *Rehabilitation (Stuttg).* 2003 Aug;42(4):218-25.

167. Elfaitouri A, Shao X, Mattsson Ulfstedt J, Muradrasoli S, Bölin Wiener A, Golbob S, Ohrmalm C, Matousek M, Zachrisson O, Gottfries CG, Blomberg J: Murine gammaretrovirus group G3 was not found in Swedish patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and fibromyalgia. *PLoS One* 2011, 6(10):e24602.
168. Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schaffer AA. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*. 2008 Aug 15;24(16):1757-64.
169. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan 1;42(1):D7-D17.
170. Oltra E, García-Escudero M, Mena-Durán AV, Monsalve V, Cerdá-Olmedo G. Lack of evidence for retroviral infections formerly related to chronic fatigue in Spanish Fibromyalgia patients. *virology journal*. 2013;10:332.
171. Levine PH, Jacobson S, Pocinki AG, Cheney P, Peterson D, Connelly RR, Weil R, Robinson SM, Ablashi DV, Salahuddin SZ, et al. Clinical epidemiologic, and virologic studies in four clusters of the chronic fatigue syndrome. *Arch Intern Med* 1992, 152(8):1611-1616.
172. Honda M, Kitamura K, Nakasone T, Fukushima Y, Matsuda S, Nishioka K, Matsuda J, Hashimoto N, Yamazaki S: Japanese patients with chronic fatigue syndrome are negative for known retrovirus infections. *Microbiol Immunol* 1993, 37(10):779-784.
173. Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C TR, Ganem D, Silverman RH, DeRisi JL. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog*. 2006;2(3):25.
174. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.
175. UK L. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
176. Forbes NE, Ping J, Dankar SK, Jia JJ, Selman M, Keleta L, et al. Multifunctional adaptive NS1 mutations are selected upon human influenza virus evolution in the mouse. *PLoS One*. 2012;7(2):e31839.
177. Rezende LF, Prasad VR. Nucleoside-analog resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase and their influence on polymerase fidelity and viral mutation rates. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Sep;36(9):1716-34.
178. Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *J Virol*. 2010 Oct;84(19):9733-48.
179. Yi M, Lemon SM. Adaptive mutations producing efficient replication of genotype 1a hepatitis C virus RNA in normal Huh7 cells. *J Virol*. 2004 Aug;78(15):7904-15.
180. Yang Z, Lu Z, Wang A. Adaptive mutations in *Salmonella typhimurium* phenotypic of purR super-repression. *Mutat Res*. 2006 Mar 20;595(1-2):107-16.
181. Yang Z, Lu Z, Wang A. Study of adaptive mutations in *Salmonella typhimurium* by using a super-repressing mutant of a trans regulatory gene purR. *Mutat Res*. 2001 Dec 12;484(1-2):95-102.
182. Oltra E, Mena-Durán A, Cerdá-Olmedo G. La infección crónica por el gamma retrovirus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia murina (xmrV) en patología humana: ¿realidad o artefacto de laboratorio? *Therapeia, Estudios y propuestas en ciencias de la salud*. 2011;3:81-90.
183. Paolucci S, Piralla A, Zanello C, Minoli L, Baldanti F. Xenotropic and polytropic murine leukemia virus-related sequences are not detected in the majority of patients with chronic fatigue syndrome. *New Microbiol*. 2012;35(3):341-4.
184. Gow JW, Simpson K, Schliephake A, Behan W M H, Morrison L J A, Cavanagh H, A Rethwilm PB. Search for retrovirus in the chronic fatigue syndrome. *Clin Pathol*. 1992;45:1058-61.

185. Menendez-Arias L. Evidence and controversies on the role of XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Rev Med Virol.* 2011 Jan;21(1):3-17.
186. Kuff EL, Lueders KK. The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Adv Cancer Res.* 1988;51:183-276.
187. Lee LL, Lin L, Bell DS, Levine S, Hanson MR. Sensitivity of PCR assays for murine gammaretroviruses and mouse contamination in human blood samples. *PLoS One.* 2012;7(5):e37482.
188. Switzer W, Jia H, Hohn O, Zheng H, Tang S, Shankar A, et al. Absence of evidence of xenotropic murine leukemia virus-related virus infection in persons with chronic fatigue syndrome and healthy controls in the United States. *Retrovirology.* 2010;7:57.
189. Delwart E. A roadmap to the human virome. *PloS Pathog* 2013, 9(2):e1003146.
190. Delviks-Frankenberry K, Cingöz O, Coffin JM, Pathak VK. Recombinant origin, contamination, and de-discovery of XMRV. *Curr Opin Virol* 2012, 2(4):499-507.
191. Alter HJ, Mikovits JA, Switzer WM, Ruscetti FW, Lo SC, Klimas N, Komaroff AL, Montoya JG, Bateman L, Levine S, Peterson D, Levin B, Hanson MR, Genfi A, Bhat M, Zheng H, Wang R, Li B, Hung GC, Lee LL, Sameroff S, Heneine W, Coffin J, Horning M, Lipkin Wi. A multicenter blinded analysis indicates no association between chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis and either xenotropic murine leukemia virus-related virus or polytropic murine leukemia virus. *MBio* 2012, 3(5).
192. Weiss RA. A cautionary tale of virus and disease. *BMC Biol* 2010, 8:124.
193. Fiebig U, Hartmann MG, Bannert N, Kurth R, Denner J. Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. *J Virol* 2006, 80(11):5651-5654.

ANEXOS

ANEXO I



DEPARTAMENTO DE SALUD DE LA PLANA

Dª Patrocinio Gascón Calderón, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de la Plana de Vila-real (Castellón).

CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica, según consta en acta de la reunión celebrada el día 14 de julio de 2010, ha analizado el proyecto de investigación titulado: "DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL RETROVIRUS XMRV (XENOTROPIC MURINE LUKEMIA VIRUS-RELATED VIRUS) EN PACIENTES DE FIBROMIALGIA Y SINDROME DE FATIGA CRONICA (FM/SFC) EN UNA MUESTRA DE PACIENTES DE LA COMUNIDAD VALENCIANA" versión 3.0 (12 julio 2010)

Investigador principal: German Cerdá Olmedo.

Investigadores colaboradores: Elisa Oltra García, Armando V. Mena Duran y Jose M. Hernandez Andreu.

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este Centro, y, por tanto, ha decidido su aprobación

Lo que firmo, en Vila-real, a 15 de julio de 2010.

LA SECRETARIA DEL CEIC


Patro Gascón Calderón



Hospital de la Plana • Ctra. de Vila-real a Borriana km. 0,5 • 12540 Vila-real (Castelló) • Tel. 964 35 76 00 • Fax 964 35 76 01

ANEXO II**HOJA INFORMATIVA****CÓDIGO DEL ESTUDIO: UCV000100****ESTUDIO OBSERVACIONAL DE DETECCIÓN DE SECUENCIAS NUCLÉICAS VIRALES EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE FIBROMIALGIA (FM) Y SÍNDROME DE FATIGA CRÓNICA (SFC) DE LA COMUNIDAD VALENCIANA**

Durante décadas los científicos han intentado sin éxito encontrar las causas de la FM y del síndrome de fatiga crónica. Recientes estudios indican la posible relación de estas enfermedades con infecciones por virus. Dichas infecciones pueden alterar los genes de las personas expuestas a esos virus modificando funciones normales de las células de nuestro organismo que podrían desencadenar la enfermedad. La alteración de los genes se debe a la incorporación de pequeños fragmentos de información genética propia de los virus en el ADN humano existiendo actualmente técnicas de laboratorio que permiten su detección.

Se le ofrece la oportunidad de participar en un estudio planteado por el Dr. Germán Cerdá Olmedo y colaboradores de la Facultad de Medicina de Universidad Católica de Valencia que consiste en detectar si en su sangre están presentes dichos cambios genéticos causados por una infección viral crónica.

La presencia de dichas alteraciones genéticas, que no son hereditarias ni transmisibles a sus descendientes, no garantiza que la infección sea el único agente causante de la enfermedad y podría haber otros mecanismos implicados. Sin embargo del conocimiento de estos errores genéticos podrían derivarse beneficios futuros en el diagnóstico y tratamiento del SFC y la FM.

Los pacientes que quieran participar en el estudio serán evaluados por profesionales cualificados utilizando los cuestionarios establecidos por las Sociedades Científicas para el diagnóstico de FM y SFC. Se les extraerán 10 ml de sangre que serán empleadas para el análisis genético descrito anteriormente u otros estudios de FM no pudiendo en ningún caso emplearse para otros fines.

Su participación requiere su CONSENTIMIENTO, es completamente VOLUNTARIA y puede REVOCAR su consentimiento en cualquier momento sin que esto afecte a su tratamiento ni su relación con el Centro y los profesionales que lo traten.

La confidencialidad de los participantes se mantendrá en todo momento de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal.

Ante cualquier duda o cuestión que se plantee durante el estudio, o si quiere revocar su consentimiento, puede contactar con los Investigadores:

German.cerda@ucv.es

Elisa.oltra@ucv.es

963637412 ext 53120

ANEXO III



Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir

CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO OBSERVACIONAL DE DETECCIÓN DE SECUENCIAS NUCLÉICAS VIRALES EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE FIBROMIALGIA (FM) Y SÍNDROME DE FATIGA CRÓNICA (SFC) DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

CÓDIGO DEL ESTUDIO: UCV000100

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Accedo a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser almacenadas en el Biobanco de la UCV o en el Biobanco Central de la Red Valenciana de Biobancos sito en el CSISP (Centro Superior de Investigación en Salud Pública), y utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad no previstos en el protocolo actual.

SI

NO

Firma del paciente o representante legal

Nombre:

DNI :

Fecha:

Médico de cabecera:

Firma del investigador

Nombre:

DNI :

Fecha:

ANEXO IV



Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

**ESTUDIO OBSERVACIONAL DE DETECCIÓN DE SECUENCIAS NUCLÉICAS VIRALES EN
PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE FIBROMIALGIA (FM) Y SÍNDROME DE FATIGA CRÓNICA
(SFC) DE LA COMUNIDAD VALENCIANA**

CÓDIGO DEL ESTUDIO: UCV000100

Don/Dña.....DNI

En calidad de, Revoco el consentimiento para mi
participación en el estudio **ESTUDIO OBSERVACIONAL DE DETECCIÓN DE SECUENCIAS
NUCLÉICAS VIRALES EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE FIBROMIALGIA (FM) Y SÍNDROME
DE FATIGA CRÓNICA (SFC) DE LA COMUNIDAD VALENCIANA**

Firma del paciente o representante legal

ANEXO V



Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**DONACIÓN DE SANGRE PARA EL BIOBANCO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE VALENCIA SAN VICENTE MÁRTIR**

Yo (nombre y apellidos)

.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar mi muestra del Biobanco de la UCV:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones

Presto libremente mi conformidad para que mi muestra participe en las investigaciones de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

Accedo a que las muestras de sangre obtenidas para el estudio puedan ser almacenadas en el Biobanco de la UCV o en el Biobanco Central de la Red Valenciana de Biobancos sito en el CSISP (Centro Superior de Investigación en Salud Pública), y utilizadas en el futuro para nuevos análisis.

SI

NO

Firma del donante:

Firma del investigador

Nombre:

Nombre:

DNI :

DNI :

Fecha:

Fecha:

Médico de cabecera:



Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

**DONACIÓN DE SANGRE PARA EL BIOBANCO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE VALENCIA SAN VICENTE MÁRTIR**

Don/Dña.....

DNI

En calidad de,

Revoco el consentimiento para mi muestra de sangre alojada en el Biobanco de la UCV.

Firma del donante:

ANEXO VI

Cuestionario Impacto Fibromialgia (FIQ)

Rodee con un círculo el número que mejor describa cómo se encontró durante la ÚLTIMA SEMANA. Si no tiene costumbre de realizar alguna actividad tache la pregunta.

1. ¿Ha sido usted capaz de

		Siempre	La mayoría de las veces	En ocasiones	Nunca
a	Hacer la compra?	0	1	2	3
b	Hacer la colada, con lavadora?	0	1	2	3
c	Preparar la comida?	0	1	2	3
d	Lavar a mano los platos y los cacharros de cocina?	0	1	2	3
e	Pasar la fregona, la mopa o la aspiradora?	0	1	2	3
f	Hacer las camas?	0	1	2	3
g	Caminar varias manzanas?	0	1	2	3
h	Visitar a amigos o parientes?	0	1	2	3
i	Subir escaleras?	0	1	2	3
j	Utilizar transporte público?	0	1	2	3

2. ¿Cuántos días de la última semana se sintió bien?

0 1 2 3 4 5 6 7

3. ¿Cuántos días de la última semana dejó de hacer su trabajo habitual, incluido el doméstico, por causa de la fibromialgia?

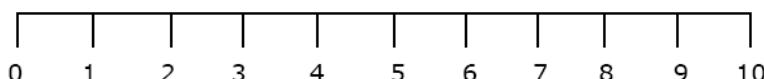
0 1 2 3 4 5 6 7

En las siguientes preguntas, ponga una cruz en el punto de la línea que mejor indique cómo se sintió en general DURANTE LA ÚLTIMA SEMANA:

4. En su trabajo habitual, incluido el doméstico, ¿hasta qué punto el dolor y otros síntomas de la fibromialgia dificultaron su capacidad para trabajar?

Sin dificultad

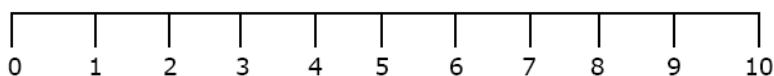
Mucha dificultad



5. ¿Cómo ha sido de fuerte el dolor?

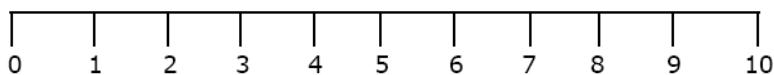
Sin dolor

Dolor muy fuerte

**6. ¿Cómo se ha encontrado de cansada?**

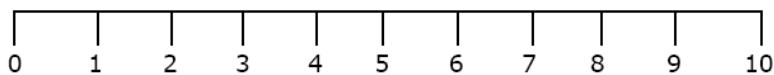
Nada cansada

Muy cansada

**7. ¿Cómo se ha sentido al levantarse por las mañanas?**

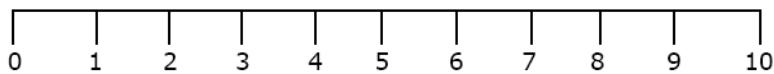
Descansada

Muy cansada

**8. ¿Cómo se ha notado de rígida o agarrotada?**

Nada rígida

Muy rígida

**9. ¿Cómo se ha notado de nerviosa, tensa o angustiada?**

Nada nerviosa

Muy nerviosa

**10. ¿Cómo se ha sentido de deprimida o triste?**

Nada deprimida

Muy deprimida



FUENTE: RIVERA J, GONZALEZ T. THE FIBROMYALGIA IMPACT QUESTIONNAIRE: A VALIDATED SPANISH VERSION TO ASSESS THE HEALTH STATUS IN WOMEN WITH FIBROMYALGIA. CLIN EXP RHEUMATOL. 2004 SEP-OCT;22(5):554-60

ANEXO VII**CUESTIONARIO MULTIDIMENSIONAL DE FATIGA – MFI®**

(Spanish version of the MFI®)

© E. Smets, B. Garssen, B. Bonke.

Instrucciones:

Mediante las siguientes afirmaciones, quisiéramos tener una idea de cómo se ha sentido **últimamente**.

Se incluye, por ejemplo, la siguiente afirmación:

"ME SIENTO RELAJADO/A"

Si considera que esto es **totalmente cierto**, que realmente se ha sentido relajado/a últimamente, por favor ponga una X en la casilla que se encuentra más a la izquierda, como se muestra a continuación:

Sí, es cierto 1 2 3 4 5 **No, no es cierto**

Cuento más en **desacuerdo** esté con la afirmación, más cerca de "no, no es cierto" deberá poner la cruz.

Le rogamos que conteste a todas las afirmaciones y marque sólo una casilla por pregunta.

1	Me siento en forma.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
2	Siento que físicamente sólo soy capaz de hacer pocas cosas.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
3	Me siento muy activo/a.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
4	Me apetece hacer todo tipo de cosas agradables.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
5	Me siento cansado/a.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
6	Creo que hago muchas cosas durante el día.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
7	Cuando estoy haciendo algo, puedo mantener la atención en lo que hago.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
8	Aguanto mucho físicamente.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
9	Temo tener que hacer cosas.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
10	Creo que hago muy pocas cosas durante el día.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
11	Me puedo concentrar bien.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
12	Estoy descansado/a.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
13	Me cuesta mucho esfuerzo concentrarme.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
14	Siento que estoy en malas condiciones físicas.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
15	Tengo muchos planes.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
16	Me canso fácilmente.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
17	Consigo hacer pocas cosas.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
18	No tengo ganas de hacer nada.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
19	Me distraigo fácilmente.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto
20	Siento que estoy en excelentes condiciones físicas.	Sí, es cierto	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	No, no es cierto

Muchas gracias por su colaboración

ANEXO VIII

Datos para el estudio		Mes:	Año: (20...)	Número identificador:											
Días															
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> Enero	<input type="checkbox"/> Julio	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/> 9	<input type="checkbox"/> 10	<input type="checkbox"/> Febrero	<input type="checkbox"/> Agosto	1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/> 11	<input type="checkbox"/> 12	<input type="checkbox"/> 13	<input type="checkbox"/> 14	<input type="checkbox"/> 15	<input type="checkbox"/> Marzo	<input type="checkbox"/> Septiembre	2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/> 16	<input type="checkbox"/> 17	<input type="checkbox"/> 18	<input type="checkbox"/> 19	<input type="checkbox"/> 20	<input type="checkbox"/> Abril	<input type="checkbox"/> Octubre	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/> 21	<input type="checkbox"/> 22	<input type="checkbox"/> 23	<input type="checkbox"/> 24	<input type="checkbox"/> 25	<input type="checkbox"/> Mayo	<input type="checkbox"/> Noviembre	4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/> 26	<input type="checkbox"/> 27	<input type="checkbox"/> 28	<input type="checkbox"/> 29	<input type="checkbox"/> 30	<input type="checkbox"/> Junio	<input type="checkbox"/> Diciembre	5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/> 31							6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/>				
							7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 7	<input type="checkbox"/>				
							8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 8	<input type="checkbox"/>				
							9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 9	<input type="checkbox"/>				

Cuestionario de Salud SF-36 (versión 2)

Versión española de SF-36v2™ Health Survey © 1996, 2000
adaptada por J. Alonso y cols 2003.

Este instrumento ha superado los estándares de calidad del Medical Outcome Trust y de la Red Cooperativa para la Investigación en Resultados de Salud y Servicios Sanitarios (Red IRYSS).
El cuestionario y su material de soporte están disponibles en BIBlioPRO, la biblioteca virtual de la Red IRYSS (www.rediryss.net).



Su Salud y Bienestar

Por favor conteste las siguientes preguntas. Algunas preguntas pueden parecerse a otras pero cada una es diferente.

Tómese el tiempo necesario para leer cada pregunta, y marque con una la casilla que mejor describa su respuesta.

¡Gracias por contestar a estas preguntas!

1. En general, usted diría que su salud es:

<input type="checkbox"/> 1 Excelente	<input type="checkbox"/> 2 Muy buena	<input type="checkbox"/> 3 Buena	<input type="checkbox"/> 4 Regular	<input type="checkbox"/> 5 Mala
---	---	-------------------------------------	---------------------------------------	------------------------------------

2. ¿Cómo diría usted que es su salud actual, comparada con la de hace un año?:

Mucho mejor ahora que hace un año <input type="checkbox"/> 1	Algo mejor ahora que hace un año <input type="checkbox"/> 2	Más o menos igual que hace un año <input type="checkbox"/> 3	Algo peor ahora que hace un año <input type="checkbox"/> 4	Mucho peor ahora que hace un año <input type="checkbox"/> 5
---	--	---	---	--



11549035

3. Las siguientes preguntas se refieren a actividades o cosas que usted podría hacer en un día normal. Su salud actual, ¿le limita para hacer esas actividades o cosas? Si es así, ¿cuánto?

	Sí, me limita mucho	Sí, me limita un poco	No, no me limita nada
a <u>Esfuerzos intensos</u> , tales como correr, levantar objetos pesados, o participar en deportes agotadores.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
b <u>Esfuerzos moderados</u> , como mover una mesa, pasar la aspiradora, jugar a los bolos o caminar más de 1 hora.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
c Coger o llevar la bolsa de la compra.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
d Subir <u>varios pisos</u> por la escalera.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
e Subir <u>un sólo piso</u> por la escalera.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
f Agacharse o arrodillarse.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
g Caminar <u>un kilómetro o más</u> .	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
h Caminar varios centenares de metros.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
i Caminar unos 100 metros.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
j Bañarse o vestirse por sí mismo.	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

4. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de su salud física?

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
a ¿Tuvo que reducir el tiempo dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
b ¿Hizo menos de lo que hubiera querido hacer?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
c ¿Tuvo que dejar de hacer algunas tareas en su trabajo o en sus actividades cotidianas?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
d ¿Tuvo <u>dificultad</u> para hacer su trabajo o sus actividades cotidianas (por ejemplo, le costó más de lo normal)?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5



5. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de algún problema emocional (como estar triste, deprimido o nervioso)?

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
a) ¿Tuvo que <u>reducir el tiempo dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas por algún problema emocional?</u>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
b) ¿Hizo <u>menos de lo que hubiera querido hacer por algún problema emocional?</u>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
c) ¿Hizo su trabajo o sus actividades cotidianas <u>menos cuidadosamente que de costumbre, por algún problema emocional?</u>	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

6. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto su salud física o los problemas emocionales han dificultado sus actividades sociales habituales con la familia, los amigos, los vecinos u otras personas?

Nada	Un poco	Regular	Bastante	Mucho
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

7. ¿Tuvo dolor en alguna parte del cuerpo durante las 4 últimas semanas?

No, ninguno	Sí, muy poco	Sí, un poco	Sí, moderado	Sí, mucho	Sí, muchísimo
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6

8. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto el dolor le ha dificultado su trabajo habitual (incluido el trabajo fuera de casa y las tareas domésticas)?

Nada	Un poco	Regular	Bastante	Mucho
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5



11548035

9. Las preguntas que siguen se refieren a cómo se ha sentido y cómo le han ido las cosas durante las 4 últimas semanas. En cada pregunta responda lo que se parezca más a cómo se ha sentido usted. Durante las últimas 4 semanas ¿con qué frecuencia...

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
a) se sintió lleno de vitalidad?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
b) estuvo muy nervioso?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
c) se sintió tan bajo de moral que nada podía animarle?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
d) se sintió calmado y tranquilo?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
e) tuvo mucha energía?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
f) se sintió desanimado y deprimido?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
g) se sintió agotado?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
h) se sintió feliz?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
i) se sintió cansado?	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

10. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia la salud física o los problemas emocionales le han dificultado sus actividades sociales (como visitar a los amigos o familiares)?

Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

11. Por favor diga si le parece CIERTA o FALSA cada una de las siguientes frases:

	Totalmente cierta	Bastante cierta	No lo sé	Bastante falsa	Totalmente falsa
a) Creo que me pongo enfermo más fácilmente que otras personas	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
b) Estoy tan sano como cualquiera	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
c) Creo que mi salud va a empeorar	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
d) Mi salud es excelente	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

Gracias por contestar a estas preguntas

ANEXO IX

Query 1	GCCCCAGTCATCCGATAAGCTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTTCCAATAAGCCTTTG	60	XMRV 8185BP=
Sbjct 1	GCCCCAGTCCTCCGATAAGCTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTTCCAATAAGCCTTTG	60	MLV 8196 BP=
Query 61	CTGTTGCATCCGAAGCGTGGCCTCGTGTCCCTGGGAGGGTCTCCTCAGAGTGATTGA	120	
Sbjct 61	CTGTTGCATCCGAACGTGGCCTCGTGTCCCTGGGAGGGTCTCCTCAGAGTGATTGA	120	
Query 121	CTACCCAGCTGGGGCTTTCATTGGGGCTCGTCCGGGATTCGGAGACCCCCGCCA	180	
Sbjct 121	CTGCCCAGCTCGGGGCTTTCATTGGGGCTCGTCCGGGATTCGGAGACCCCCGCCA	180	
Query 181	GGGACCAACGACCCACCCTCGGGAGGTAAGCCGGCCGGCATCGTTTGTCTTGTCTC	240	
Sbjct 181	GGGACCA-CGACCCACCCTCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCGATCGTTTGTCTCCGTCTC	239	
Query 241	GTCTTGTGcggtgtgtgtgtccggcatctaattcctcgccctcgctgaatctgtat	300	
Sbjct 240	GTCTTGTGCGTGTGTGTGTACCGGATCTACTTTTGCCTCGCTGAATCTGTAT	299	
Query 301	CTAGTTAGCTAACTAGATCTGTATCTGGGGTTCCCGCGGAAGAACTGACGAGTCGTATT	360	
Sbjct 300	CTAGTTAGCTAACTAGATCTGTATCTGGGGTTCCCGTGGAAAGAACTGACGAGTCGTATT	359	
Query 361	CCCGGCCGAGCCCTGGGAGACGTCCAGCGGCCCTGGGGGCCGTTTGTGGCCCATTC	420	
Sbjct 360	CCCGACCGCAGCCCTGGGAGACGTCTAGAGGCATCGGGGCCGCTGGGTGGCCCATTC	419	
Query 421	TGTA--T-C-AGTTAACCTACCGAGTCGGACTTTTGAG---TGGCTTGT-TG-GGG	471	
Sbjct 420	AGTAAGTCCGAG-T--CCTGACCGATTCGGACTATTGGAGCCCCCTCCTTGTGGAGGG	476	
Query 472	G-AC----G-----A-GAGAC-AGA-G-AC-A--CTTC-CCGCCCCGTCTGAATT	512	
Sbjct 477	GTACGTGGTTTTAGGAGACGAGAGGTCAAAGCCCTCGCCGCTCATCTGAATT	536	
Query 513	GCTTCGGTTTACGCCAACCGCGCGCGCGTCTGAttttgttttgttcttgtt	572	
Sbjct 537	GCTTCGGTTTACGCCAACCGCGCGCGTCTGCTGTCTAGTGTGTTGTC	596	
Query 573	cttcgttagtttc-tt-ctgtctt-a-agtgtctCGAGATCATGGGACAGACCGTAA	628	
Sbjct 597	ATTTG-T-CTGTCGTTATTGTTGGACCGT-TTCTAAAAAT-ATGGGACAGACCGTAA	652	
Query 629	CTACCCCTCTGAGTCTAACCTGCAGCACTGGGAGATGTCCAGCGCATTGCATCCAACC	688	
Sbjct 653	CCACCCCTCTGAGTCTGACCTAGAACACTGGGAGACGTCCAGCGCATCGCGTCCAACC	712	
Query 689	AGTCTGTGGATGTCAGAACAGAGGGCCTGGTTACCTCTGTCGCCGAATGGCAA	748	
Sbjct 713	AGTCCTGGAACGTCAGAACAGAGACGCTGGTCACCTCTGCTCTGCCGAGTGGCAA	772	
Query 749	TCAATGTAGGATGGCCTCAGGATGGACTTTAATTAGGTGTTATCTCAGGTCAAGT	808	
Sbjct 773	TCGGTGTAGGGTGGCGCAAGATGGACTTTAATTGGACATTATTTACAGGTTAAAT	832	
Query 809	CTAGAGTGTTCCTGGTCCCCACGGACACCCGGATCAGGTCCCATAATCGTCACCT	868	
Sbjct 833	CTAAGGTGTTCTCCGGCCCCACGGACACCCAGATCAGGTCCCATACTGTCAACCT	892	
Query 869	GGGAGGCATTCGCTATGACCCCCCTCCGTGGTCAAACCGTTGTCTCCTAAACCCC	928	
Sbjct 893	GGGAGGCATTGCTATGAACCCCCCTCCGTGGTCAAACCTTTGTCTCCTCCAAACTCT	952	

Query	929	CTCCTTACCGACAGCTCCGTCCTCCGCCGGTCCTCTGCGCAACCTCCGTCCCCGAT	988
Sbjct	953	CCCCTCTCCAACCGTCCCATTCTGCATCCGGTCCCTCGACCCAACCTCCGCCCGAT	1012
Query	989	CTGCCCTTACCTGCCCTAACCCCTCTATAAAAGTCAAACCTCCTAAGCCCCAGGTT	1048
Sbjct	1013	CTGCCCTTACCTGCTTACCCCTCTATAAAACCCAGACCTCTAAACCTCAGGTT	1072
Query	1049	TCCGTATAGGGGGACCTCTCATGGACCTCTCACAGAGGATCCCCGGTACGGAG	1108
Sbjct	1073	TCTCCGATAATGGCGACCTCTCATGGACCTCTCACAGAAGACCTCCGGTACGGAG	1132
Query	1109	CACA---ACCTCCCTCTGCCAGGGAGAACATG--A-AGAAGAGGCGGCCACCACCT	1162
Sbjct	1133	AACAGGGACCGTCCCTCTG-ACGGAG-ACGGCAGAGAGAAGAGGCCACCTCCACTT	1189
Query	1163	CCGAGGTTccccccCTCTCCATGGTGTCTGACTGCCGGAAAGGAGAGACCCCTCCG	1222
Sbjct	1190	CTGAGATTCTGCCCTCTCCATGGTGTCTGCCCTGCCGGAAAGAGACCCCCCG	1249
Query	1223	CAGCGGACTCCACCACCTCCCGAGGATCCACTCCGATGGGGAGATGGCCAGCTC	1282
Sbjct	1250	CGGCAGATTCCACCACCTCTGGGTTTCCACTCGTTGGGGTAATGGTCAGTTAC	1309
Query	1283	AGTACTGGCGTTTCTCTGATTATATAATTGGAAAAATAATAACCTTCTTTT	1342
Sbjct	1310	AGTACTGGCGTTTCTCTGATCTATATAACTGGAAAAATAATAACCTTCTTTT	1369
Query	1343	CTGAAGATCCAGGTAATTGACGGCCTTGATTGAGTCGCTCTCATACCCACCAGCCCA	1402
Sbjct	1370	CTGAAGATCCAGGTAATTGACCGCTTAATTGAGTCGCTCACCACCCACCAACCCA	1429
Query	1403	CCTGGGACGACTGTCAGCAGTTGGGACCTGCTGACCGGAGAAGAAAAGCAGCGGG	1462
Sbjct	1430	CCTGGGACGACTGTCAGCAATTGAGTCGCTGACAGGAGAAGAAAAGCAGCGGG	1489
Query	1463	TGCTCTAGAGGCTAGAAAGGAGTCGGGGCAATGATGGACGCCACTCAGTTGCCTA	1522
Sbjct	1490	TGCTCTAGAGGCGAAAGGAGTCGGGGCAACGATGGACGCCACCCAGTTGCCTA	1549
Query	1523	ATGAAGTCAATGCTTTCCCTTGAGCGCCCCGATTGGGATTACACCACTACAGAAG	1582
Sbjct	1550	ATGAAGTCAATTCCGCCTTCCCCCTGAAACGTCCGATTGGGATTATAACCCCTGAAG	1609
Query	1583	GTAGGAACCACCTAGTCCTACCGCCAGTTGCTTCTAGCGGTCTCCAAACGCGGGCA	1642
Sbjct	1610	GTAGGAACCACCTAGTCCTATGCCAGTTGCTTCTAGCGGTCTCCAAACGCGGGCC	1669
Query	1643	GGAGCCCCACCAATTGCCAAGGTAAAAGGGATAACCCAGGGACCTAATGAGTCCTCCT	1702
Sbjct	1670	GAAGCCCCACCAATTGCCAAGGTAAAAGGAATAACCCAGGGACCTAATGAGTCCTCCT	1729
Query	1703	CAGCCTTTAGAGAGACTCAAGGAGGCCATCGCAGGTACACTCCTATGACCTGAGG	1762
Sbjct	1730	CAGCCTTCTAGAGAGACTCAAGGAAGCCTATCGCAGATACTCCTATGATCCTGAGG	1789
Query	1763	ACCCAGGGCAAGAACCAATGTCATGTCATTCTGCCAGTCGCCCCGATATCG	1822
Sbjct	1790	ACCCGGCAAGAACGAATGATCTATGTCATTCTGCCAGTCGCTCCAGACATTG	1849
Query	1823	GACGAAAGTTAGAGCGGTTAGAAGAGTTAAAGAGCAAGACCTAGGAGACTTAGTGAGGG	1882
Sbjct	1850	GTCGAAAGTTAGAGCGGTTAGAAGAGACTAAAAGTAAACTTAGGAGATTAGTGAGAG	1909
Query	1883	AAGCTGAAAAGATCTTAATAAGCGAGAACCCCGGAAGAAAGAGAGGAACGTATCggaa	1942
Sbjct	1910	AGGCCGAAAAGATCTTAATAAGGAGAAACTCCAGAGGAGAGAAGAGCGCTTAGGA	1969

Query	1943	gagaatagggaaaaagaagaacgcgttagggcagaggatgagcagagagagaga	AA	2002
Sbjct	1970	GGGAGACAGAGAAAAGGAAGAGCGCGTAGGCCAGAAGAGGAGCAGAAAGAGAAAGAGA		2029
Query	2003	GGGACCGCAGAACATAGAGAGATGAGCAAGCTTGGCCACTGTAGTTATTGGTCAGA		2062
Sbjct	2030	GGGACCGTAGGAGAACATAGAGAAATGAGCAAACCTTGCCACCGTAGTTAGTGGACAGA		2089
Query	2063	GACAGGATAGACAGGGGGAGAGCGGAGGAGGCCAACATTGATAAGGACCAATGCGCT		2122
Sbjct	2090	GACAGGATAGACAGGGGGAGAGCGAAGGAGGCCAACATTGACAAAGATCAATGTGCCT		2149
Query	2123	ACTGAAAGAAAAGGGACACTGGCTAAGGACTGCCAAAGAACGCCACGGGCCCGAG		2182
Sbjct	2150	ACTGTAAAGAAAAGGACACTGGCTAACAGACTGCCAAAGAACGCCACGGGTCCCCGAG		2209
Query	2183	GACCGAGGCCAGACCTCCCTCTGACCTTAGGTGACTA-GGGAGGTCAAGGTCAAGGAG		2241
Sbjct	2210	GACCGCGACCCAGACCTCCCTCTGACTTACAGACTAGGGGGTCAGGGTCAGGAG		2269
Query	2242	cccccccccTGAAACCAGGATAACCCCTCAAAGTCGGGGGCAACCCGTCACTTCCTGGTA		2301
Sbjct	2270	CCCCCCCTGAACCCAGGATAACCCCTACTGTGGGGGCAACCCGTCACTTCCTGGTG		2329
Query	2302	GATACTGGGCCAACACTCCGTGCTGACCCAAATCCTGGACCCCTAAGTGACAAGTCT		2361
Sbjct	2330	GATACGGGGCCAACACTCCGTGCTGACTCAAATCCGGCCCTAAGTGACAGGTG		2389
Query	2362	GCCTGGTCCAAGGGCTACTGGAGGAAGCGGTATCGTGGACACGGATCGCAAAGTA		2421
Sbjct	2390	GCTGGTCCAAGGGCTACTGGAGGAAGCGGTATCGTGGACACAGATCGCAAGGTG		2449
Query	2422	CATCTGGTACCGGTAAGGTACCCACTCTTCCTCCATGTACCAAGACTGCCCTATCCT		2481
Sbjct	2450	CACCTAGTACCGGTAAGGTCACTCACTCTTCCTCCATGTGCCAGACTGCCCTTACCCC		2509
Query	2482	CTGCTAGGAAGAGACTTGCTGACTAAACTAAAGCCAAATCCACTTGAGGGATCAGGA		2541
Sbjct	2510	TTGCTAGGAAGAGACTTGTAACTAAACTAAAGCCAGATCCACTTCGAGGGATCGGGA		2569
Query	2542	GCTCAGGTTGTGGGACCGATGGGACAGCCCTGCAAGTGTGACAGTAAACATAGAACAT		2601
Sbjct	2570	GCTCAGGTTGTGGGACCAAAGGACAGCCCTGCAAGGTGTTGACCCCTGGCATAGAGGAT		2629
Query	2602	GAGTATTGGCTACATGATACCAGGAAAGAGCCAGATGTTCTCTAGGGTCACATGGCTT		2661
Sbjct	2630	GAGTATCGGCTACATGAGACCTAACAGAGCCGGATGTTCTCTAGGGTCACCTGGCTT		2689
Query	2662	TCTGA-TTCCTTCAGGCCTGGCGGAAACCGGGGCGATGGACTGGCAGTCGCCAACGC		2720
Sbjct	2690	TCTGACTTTCCC-CAGGCCTGGCGAGAAACCGGGGCGATGGACTGGCAGTCGCCAACG		2748
Query	2721	TCCTCTGATCACCTCTGAAGGCAACCTCTACCCCCGTGTCATAAAACAATACCCAT		2780
Sbjct	2749	GCCTCTGATTACCTCTAAAGGCAACCTCACCCCTGTGTCATCAAACAGTACCCAT		2808
Query	2781	GTCACAAGAAGCCAGACTGGGATCAAGCCCCACATACAGAGGCTGTTGGACCAGGGAAAT		2840
Sbjct	2809	GTCACACGAAAGCCAGACTGGGATCAAGCCCCACATACAGAGACTGTTGGACCAGGGAAAT		2868
Query	2841	ACTGGTACCTGCCAGTCCCCCTGGAACACGCCCTGCTACCGTTAAGAAACCAGGGAC		2900
Sbjct	2869	ATTGGTACCTGCCAGTCCCCCTGGAACACACCCCTGCTGCCGTTAAGAAACCAGGGAC		2928
Query	2901	TAATGATTATAGGCCTGTCCAGGATCTGAGAGAAGTCACAAAGCGGGTGGAGACATCCA		2960

Sbjct	2929	TAAGGATTACAGGCCTGTCCAGGATCTGAGAGAAGTCAACAAGCGGGTGGAAAGATATCCA	2988
Query	2961	CCCCACCGTGCCAACCCCTAACACCTCTTGAGCGGGCTCCACCGTCCCACCGAGTGGTA	3020
Sbjct	2989	CCCCACCGTGCCAATCCTAACACCTTTAAGTGGACTCCCTCCGTCCCACCGAGTGGTA	3048
Query	3021	CACTGTGCTTGATTAAAGGATGCCCTTTCTGCCTGAGACTCCACCCACAGTCAGCC	3080
Sbjct	3049	CACTGTGCTTGATTAAAGGATGCCCTTTCTGCCTGAGACTCCACCCACAGTCAGCC	3108
Query	3081	TCTCTGCCTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAGGACAACGTGACCTGGAC	3140
Sbjct	3109	TCTCTTGCCCTTGAGTGGAGAGATCCAGAAATGGGAATCTGGACAATTGACCTGGAC	3168
Query	3141	CAGACTCCACAGGGTTCAAAAACAGTCCCACCCCTGTTGATGAGGCACTGCACAGAGA	3200
Sbjct	3169	CAGACTCCACAGGGTTCAAAAACAGTCCCACCCCTGTTGATGAGGCACTGCACAGAGA	3228
Query	3201	CCTAGCAGATTCCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTACAGTACGTGGATGACTT	3260
Sbjct	3229	CCTAGCAGACTCCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTACAGTACGTGGATGACTT	3288
Query	3261	ACTGCTGGCCGCCACTCTGAGCAAGACTGCCAACCGAGGTAACCGGGCCCTATTACAAAC	3320
Sbjct	3289	ACTGCTGGCCGCTACTTCCGAACTAGACTGCCAACAGGTACTCGGGCCCTCTACAAAC	3348
Query	3321	CCTAGGGAACCTCGGGTATCGGGCTCGGCCAAGAAAGCCAAATTGCCAGAAACAGGT	3380
Sbjct	3349	CCTAGGGAACCTCGGATACC CGGCCTCGCCAAGAAAGCCAAATCTGCCAGAAACAGGT	3408
Query	3381	CAAGTATCTGGGTATCTCTAAAAGAGGGACAGAGATGGCTGACTGAGGCGAGAAAAGA	3440
Sbjct	3409	TAAATACCTGGGTACCTTCTGAGGGAGGGTCAGAGATGGCTGACTGAGGCTAGAAAAGA	3468
Query	3441	GACTGTGATGGGCAGCCCACCTCGGAAGACCCCTCGACAACTAAGGGAGTTCTAGGGAC	3500
Sbjct	3469	GACTGTGATGGGCACCCGTTCCAAGACTCCTCGACAACTAAGGGAGTTCTAGGGAC	3528
Query	3501	GGCAGGCTCTGCGCTCTGGATCCCTGGTTGCAGAAATGGCAGCCCCCTGTACCC	3560
Sbjct	3529	GGCAGGCTCTGCGCTCTGGATCCCTGGTTGCAGAAATGGCAGCCCCCTGTACCC	3588
Query	3561	TCTTACCAAACGGGACTCTGTTAATTGGGCCAGACCAGAAAGGCCATCAAGA	3620
Sbjct	3589	TCTTACCAAACGGGACTCTGTTAATTGGGCCAGACCAGAAAGGCCATCAAGA	3648
Query	3621	AATCAAACAGGCCTCTCTAACCTGCCCGCCCTGGGATTGCCAGATTGACTAACCCCTT	3680
Sbjct	3649	AATCAAACAGGCCCTCTAACCTGCCCGCCCTGGGATTGCCAGATTGACTAACCCCTT	3708
Query	3681	TGAACCTTTGTCGACGAGAACGAGGGCTACGCCAAGGCCTTAACGAAAAACTGGG	3740
Sbjct	3709	TGAACCTTTGTCGACGAGAACGAGGGCTACGCC- AAAGGC-- CCTAACGAAAAACTGGG	3765
Query	3741	ACCTTGGCGTGGCCGTGGCTACCTGTCCAAAAGCTAGACCCAGTGGCAGCTGGTG	3800
Sbjct	3766	ACCTTGGCGTGGCCGTGGCTACCTGTCCAAAAGCTAGACCCAGTGGCAGCTGGTG	3825
Query	3801	GCCCCCTTGCCTACGGATGGTAGCAGCCATTGCCATTCTGACAAAAATGCAGGCAAGCT	3860
Sbjct	3826	GCCCCCTTGTACGGATGGTAGCAGCCATTGCCATTCTGACAAAAGATGCAGGCAAGCT	3885
Query	3861	AACTATGGGACAGCCGCTAGTCATTCTGGCCCCCATGCGGTAGAAGCACTGGTCAAACA	3920
Sbjct	3886	AACTATGGGACAGCCGCTAGTCATTCTGGCCCCCATGCGTAGAGGGCACTGGTCAAAGCA	3945
Query	3921	ACCCCTGACC GTGGCTATCCAATGCCGCATGACCCACTATCAGGCAATGCTCCTGGA	3980

Sbjct	3946	ACCCCCTGACCGCTGGCTATCCAACGCCCCGATGACCCACTACCAGGCATGCTCCTAGA	4005
Query	3981	TACAGACCGGGTTCAAGTTCGGACCGGTGGTGCCCTCAACC CGGCCACCCCTGCTCCCCCT	4040
Sbjct	4006	CACTGACCGAGTTCAAGTTCGGACCATGGGTGGCCCTCAATCTGCCACCTTACTCCCTCT	4065
Query	4041	ACCGGAA-AAGGAAGCCCCCATGACTGCCTCGAGATCTTGGCTGAGACGCACGGAACCA	4099
Sbjct	4066	CCCGGAAGAAGG-AGCCCCCATGATTGCCTCGAGATCTTGGCTGAAACGCATGGAACCA	4124
Query	4100	GACCGGACCTCACGGACCAGCCCATCC CAGACGCTGATTACACT TGGTACACAGATGGAA	4159
Sbjct	4125	GACCGGATCTCACCGACCAGCCCATCC CAGACGCGGACCACACTGGTATA CGATGGGA	4184
Query	4160	GCAGCTTCTACAAGAAGGACAACGGAGAGCTGGAGCAGCGGTGACTACTGAGACCGAGG	4219
Sbjct	4185	GCAGCTTTTGCAAGAAGGACAGC GAAAGGCTGGGCAGCGGTGACCACTGAGACCGAGG	4244
Query	4220	TAATCTGGGCAGGGCTCTGGCCTGGAACATCCGCCAACGAGCGAACTGATAGCAC	4279
Sbjct	4245	TAATCTGGCAAGGGCACTGCGGCTGGAACATCTGCCAACCGGCGAACTGATAGCAC	4304
Query	4280	TCACCCAA GCCTAAAGATGGCAGAAAGTAAGAAGCTAAAT GTTACACTGATAGCCGT	4339
Sbjct	4305	TCACTCAAGCCTGAAGATGGCAGAAAGTAAGAGGCTAAACGTTACACTGACAGCCGT	4364
Query	4340	ATGCCTTCGCCACGGCCATGTCCATGGAGAAA TATA TAGGAGGCAGGGTTGCTGACCT	4399
Sbjct	4365	ATGCTTGCACGGCCATATCCATGGAGAGATCTATAGGAGGCAGGGTTGCTAACCT	4424
Query	4400	CAGAAGGCAGAGAAATTAAAACAAGAACGAGATCTTGGCCTTGCTAAAAGCTCTTTTC	4459
Sbjct	4425	CAGAGGGTAGAGAAATCAAAAACAAGAACGAGATCTTGGCTTACTGAAAGCTTTTC	4484
Query	4460	TGCCCAA ACGACTTAGTATAATTCACTGTCCAGGACATCAAAAAGGAAACAGTGTGAGG	4519
Sbjct	4485	TGCCAAGGAGACTCAGTATAATCCACTGCCCTGGGCATCAAAAAGGAGATAGTGCCGAGG	4544
Query	4520	CCAGAGGCAACCGTATGGCAGATCAAGCAGCCGAGAGGCAGCCATGAAGGCAGTTCTAG	4579
Sbjct	4545	CTAGGGCAACCGCCTAGCAGACCAAGCGGCCGGGAGGCAGCCATAAGACGCCCTCAG	4604
Query	4580	AAACCTCTACACTCCATAGAGGACTCAACCCGTATGCCCTCCCATTCCATTACA	4639
Sbjct	4605	ATACATCCACTCCATTAGAGGATTCAACCCATATGCCCTGCCTATTCCATTATA	4664
Query	4640	CCGAAACAGATCTAAAGACTACGGAACTGGGAGCCACCTACAATCAGACAAAAGGAT	4699
Sbjct	4665	CTGAAACAGATCTAAAGAAACTCAGAGAGCTGGGCCCACCTATAACCAGACAAAGGAT	4724
Query	4700	ATTGGGTCTACAAGGCAACCTGTGATGCCGATCAGTCCGTGTTGAACTGTTAGACT	4759
Sbjct	4725	ACTGGGTCTTCCAAGGCAAGCGGTGATGCCGACCAATTGTTAGACTGTTAGACT	4784
Query	4760	CCTACACAGACTCACCCATCTGAGCCCTCAAAAGATGAAGGCACTCCTCGACAGAGAAG	4819
Sbjct	4785	CACTCCACCGGCTCACCCACCTCGGCTACCAGAAAATGAAAGCACTCCTTGACAGAGGAA	4844
Query	4820	AAAGCCCCTACTACATGTTAACCGGGACAGAACTATCCAGTATGACTGAGACCTGCA	4879
Sbjct	4845	AAAGCCCCTACTACATGCTAAACCGGGACAAACCCCTCCAATATGTCAGATTCCCTGCA	4904
Query	4880	CCGCCTGTGCCAAGTAAAGCCAGCAAAGCAAATTGGGCAGGGGTGCGAGTACGCG	4939
Sbjct	4905	CGGTCTGTGCCAAGTAAAGCCAGCAAAGCTAAATCGGACAGAGTAAGAGTACGAG	4964

Query	4940	GACATCGGCCAGGCACCCATTGGGAAGTTGATTCACGGAAGTAAAGCCAGGACTGTATG	4999
Sbjct	4965	GACATCGGCCAGGCACCCATTGGGAGATCGATTTACAGAAGTCAAGCCAGGCTGTATG	5024
Query	5000	GGTACAAGTACCTCCTAGTGGTAGACACCTCTCTGGCTGGTAGAGGCATTCCCGA	5059
Sbjct	5025	GGTACAAGTACCTCCTGGTATTCGTGGACACCTCTCTGGTTGGTAGAACGCTTCAA	5084
Query	5060	CCAAGCGGGAAACTGCCAAG-GTCGTGTCCAAAAGCTGTTAGAACATTTCCGAGA	5118
Sbjct	5085	CCAAGAGAGAACACG-AAGAGTCGTGTCAGAAATTGCTGAAAGAAATTCCCGAGA	5143
Query	5119	TTTGGAAATGCCGCAGGTATTGGGATCTGATAACGGGCCTGCCTCGCCTCCAGGTAAGT	5178
Sbjct	5144	TTCGGAATGCCACAGGTATTGGGATCTGATAACGGGCCTGCCTCACCTCCAGGTAAGT	5203
Query	5179	CAGTCAGTGGCGATTTACTGGGATCGATTGGAGTTACATTGTGTTATAGACCCAG	5238
Sbjct	5204	CAGTCGGTGGCCGATTTACTGGGATCGATTGGAAATTACATTGTGTTATAGACCCAG	5263
Query	5239	AGTCAGGACAGGTAGAAAGAATGAATAGAACAAATTAAAGGAGACTTGACCAAATTAAACG	5298
Sbjct	5264	AGTCAGGTCAGGTAGAAAGAATGAATAGAACCATCAAGGAGACTCTAACTAAATTAAACG	5323
Query	5299	CTTGCATCTGGCACTAGAGACTGGGACTCCTACTCCCTAGGCCCTAACGAGCCGG	5358
Sbjct	5324	CTTGCACACTGGCACTAGAGACTGGGACTCCTACTCCCTAGGCCCTAACGAGCCGC	5383
Query	5359	AATACTCCGGGCCCCACGGACTGACTCCGTATGAAATTCTGTATGGGCACCCCCGCC	5418
Sbjct	5384	AAACACTCCGGGCCCCATGGACTCACTCCGTATGAAATTCTGTATGGGCACCCCCG--	5440
Query	5419	CTTGTCAATTTCATGATCCTGAAATGTCAAAGTTAACTAATAGTCCCTCTCCAAGCT	5478
Sbjct	5441	CTTGTAAATTCCATGATCCTGAAATGTCAAAGTTAACTAATAGCCCCTCTCCAAGCT	5500
Query	5479	CACTTACAGGCCCTCCAAGCAGTACAACAAGAGGTCTGGAAGCCGCTGGCGCTGCTTAT	5538
Sbjct	5501	CACTTACAGGCCCTCCAAGCAGTACAACGAGGGTCTGGAAGCCACTGGCGCTGCCAT	5560
Query	5539	CAGGACCAGCTAGATCAGCCAGTGATACCACACCCCTCCGTGTCGGTGACCCGTG	5598
Sbjct	5561	CAGGACCAGCTGGACCAGCCAGTGATACCACACCCCTCCGTGTCGGGACACCGTGTG	5620
Query	5599	GTACGCCGGCACAGACTAAGAACTTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTACACCGTCTG	5658
Sbjct	5621	GTACGCCGGCACAGACTAAGAACTTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTACACCGTCTG	5680
Query	5659	CTGACAACCCCCACCGCTCTCAAAGTAGACGGCATCTCTCGCTGGATACACGCCGTCAC	5718
Sbjct	5681	CTGACCACCCCCACCGCTCTCAAAGTAGACGGCATCGCTCGCTGGATCCACGCCGTCAC	5740
Gen env XMRV	5719	GTAAAAGGCCGGCAGAACTCCCTCGGCCGGAACAGCAT--GGA---A-A-----GTCCAG	5766
Gen env MLV	5741	GTAAAAGGCCGGCACACCCCTCCGGCCAGAACAGCATCAGGACCGACATGGAAGGTCCAG	5800
Query	5767	CGTTCTAAAACCCCTAAAGATAAGATTAACCGTGGGGCCCCCTGATAATTATGGGA	5826
Sbjct	5801	CGTTCTAAAACCCCTAAAGATAAGATTAACCGTGGGGCCCCCTAATAATCCTGGGA	5860
Query	5827	TCTTGGTGAGGGCAGGAGCCTCAGTACAACGTGACAGCCCTCACCAGGTCTTAATGTCA	5886
Sbjct	5861	TCTTAATAAGGGCAGGAGTACAGTACAACATGACAGCCCTCATCAGGTCTCAATGTTA	5920
Query	5887	CTTGGAAAATTACCAACCTAATGACAGGACAAACAGCTAATGCTACCTCCCTGGGA	5946
Sbjct	5921	CTTGGAGAGTTACCAACTTAATGACAGGACAAACAGCTAATGCTACCTCCCTGGGA	5980

Query	5947		6006
Sbjct	5981		6040
Query	6007		6066
Sbjct	6041		6088
Query	6067		6126
Sbjct	6089		XMRV-env-outer-6156-F
Query	6127		6186
Sbjct	6149		6208
Query	6187		6246
Sbjct	6209		6268
Query	6247		6306
Sbjct	6269		XMRV-env-inner-6334-F
Query	6307		6366
Sbjct	6329		6388
Query	6367		6426
Sbjct	6389		6448
Query	6427		6486
Sbjct	6449		6508
Query	6487		6546
Sbjct	6509		6568
Query	6547		6606
Sbjct	6569		6628
Query	6607		6666
Sbjct	6629		6688
Query	6667		6726
Sbjct	6689		6748
Query	6727		6786
Sbjct	6749		6808
Query	6787		6846
Sbjct	6809		6868
Query	6847		6906
Sbjct	6869		XMRV-env-inner-6936-R
Query	6907		6966

Sbjct	6929	TGGCTGCTCCC GCCGGGACCATTGGGCTTGCACACCGGGCTACTCCCTGCCTATCTA	6988
Query	6967	CTACTGTGCTTAACCTAACCACTGATTACTGTGTCCTGGTTGAECTCTGCCAAAGGTAA	7026
Sbjct	6989	CCACTGTACTCGACCTCACCAACCGATTACTGTGTCCTGGTTGAGCTCTGCCAAAGGTGA	7048
Query	7027	CCTACCACTCCCCTAATTATGTTTATGCCAGTTGAAAAGAAAACATAAATATAAAAGAG	7086
XMRV-env-outer-7129-R	7049	CCTACCACTCCCCTGGTTATGTTATGCCAGTTGAGAGAAAACCAAATATAAAAGAG	7108
	7087	AGCCGGTGTCAAACTCTGCCCTGCTGTTGGGAGGACTTAATATGGGCCATAGCTG	7146
Sbjct	7109	AGCCGGTGTCAAACTTGCCCTGCTGTTGGGAGGACTTAATATGGGCCATAGCTG	7168
Query	7147	CAGGAGTTGAAACAGGGACTACAGCCCTAGTGGCCACCAAAACAATTGAGCAGCTCCAGG	7206
Sbjct	7169	CAGGAGTAGGAACCGGGACTACAGCCCTAGTGGCCACTCAGCAGTTCAACAACTCCAGG	7228
Query	7207	CAGCCATACATACAGACCTGGGGCCTAGAAAAATCAGTCAGTGCCTAGAAAAAGCTC	7266
Sbjct	7229	CTGCCGTGCAAAATGACCTTAAAGAAGTTGAAAGTCCATCAACTAATCTAGAAAAATCTT	7288
Query	7267	TGACCTCGTTGCTGAGGTGGCTCTACAGAACCGGAGGGATTAGATCTACTGTTCTAA	7326
Sbjct	7289	TGACCTCCTTGCCAGTAGTGTGAGAATCTAGAGGCCCTAGATCTACTATTCTAA	7348
Query	7327	AAGAAGGAGGATTATGTCGCTGCCCTAAAGAAGAATGCTTTTACCGGACACACTG	7386
Sbjct	7349	AAGAGGGAGGTTGCTGCTGCCCTAAAGAAGAATGCTTTCTATGCCACACACAG	7408
Query	7387	GCGTAGTAAGAGATAGCATGCCAAAGCTAAGAGAAAGGTTAAACAGAGACAAAAATTGT	7446
Sbjct	7409	GATTGGTACGGGATAGCATGCCAAACTTAGGGAAAGATTGAGTCAGAGACAAAAGCTCT	7468
Query	7447	TCGAATCAGGACAAGGGTGGTTGAGGGACTGTTAACAGGCCCATGGTCACGACCC	7506
Sbjct	7469	TTGAATCCAACAAGGTGGTTGAAGGGCTGTTAATAAGTCCCTGGTCACCAACCC	7528
Query	7507	TGATATCCACCATATTGGGCCCTCTGATAGTACTTTATTAACTCTACTCTCGGACCC	7566
Sbjct	7529	TGATATCCACCATCATGGGCCCTGATAATCTTGTATTACTCTGGCCCT	7588
Query	7567	GTATTCTCAACCGCTGGTCAGTTGTAAGAACAGAACATTGGTAGTGCAGGCCCTGG	7626
Sbjct	7589	GTATTCTCAATCGCTGGTCAGTTTCAAAAGACAGGATTGGTAGTGCAGGCCCTGG	7648
Query	7627	TTCTGACCCAACAGTATCACAACCTCAAATCAATAGATCCAGAAGAAGTGGAAATCAGTG	7686
Sbjct	7649	TTCTGACCCAACAGTATCACAACCTCAAATCAATAGATCCAGAAGAAGTGAATCGCGTG	7708
Query	7687	AATAAAGATTTATTCACTGTTCCAGAAAGAGGGGGAAATGAAAGACCCCACCATAGGC	7746
Sbjct	7709	AATAAAGATTTATTCACTGTTCCAGAAAGAGGGGGAAATGAAAGACCCCACCATAGGC	7768
Query	7747	TTAGCACGCTAGTACAGTAACGCCATTGCAAGGCATGGAAAAGTACCAAGAGCTGA-G	7805
Sbjct	7769	TTAGCCAGCTAACTGCAGTAACGCCATTGCAAGGCATGGAAAATACCAAGAGCTGATG	7828
Query	7806	TTCTCAAAAGTTACAAGGA-AGTTAATTAAGAATAAGGCTGAATAACACTGGGACAGG	7864
Sbjct	7829	TTCTCAGAAAA-ACAAGAACAGG-AAGTACAGAG-A-GACTGGAAAGTACCGGGACTAG	7884
Query	7865	GGCCAAACAGGATATCTGTAGTCAGGCACCTGGGCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATG	7924
Sbjct	7885	GGCCAAACAGGATATCTGTGGTCAAGCACCTGGGCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATG	7944
Query	7925	GTCCTCAGATAAAGCAGAAACTAACACAGTTCTGGAAAGTCCCACCT-CAGTTCAA-G	7982

Sbjct	7945		GTCCCCAGAAATAGCTAAAACAACAGTTCAAGAGA--CCCAGAAACTGTCTCAAGG	8002
Query	7983		TTCcccAAAAGACCGGGAAATACCCCAAGCCTTATTAAACTAACCAATCAGCTCGCTTC	8042
Sbjct	8003		TTCCCCAGATGACCGGGAAATAACCCCAAGCCTTATTAAACTAACCAATCAGCTCGCTTC	8062
Query	8043		TCGCTTCTGTACCCGCCTTTGCTCCCCAGTCCTAGCCCTATAAAAAAGGGGTAAGAA	8102
Sbjct	8063		TCGCTTCTGTACCCGCCTATTGCTGCCAG-C-T--C--TATAAAAA--GGGTAAAAA	8114
Query	8103		CTCCACACTCGGCGGCCAGTCATCCGATAGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTTCCA	8162
Sbjct	8115		CCCCACACTCGGCGGCCAGTCCTCCGATAGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTTCCA	8174
Query	8163		ATAAAGCCTTTGCTGTTGCA	8184
Sbjct	8175		ATAAAGCCTTTGCTGTTGCA	8196

ANEXO X

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80.

Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN.

Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y presenta una alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación.

Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos.

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una PCR en Tiempo Real, es la calidad del material de partida.

Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental.

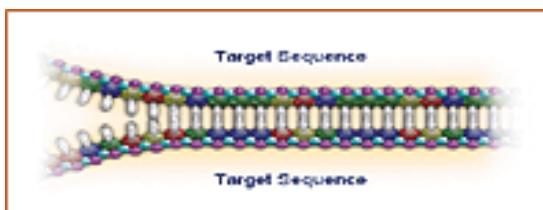
- La PCR está diseñada según el principio natural de replicación del ADN. Es un proceso de tres pasos, designado como un ciclo, que se repite un número específico de veces.
- El proceso de "PCR" incluye 3 pasos básicos que se repiten 25 veces o más:
 1. *Desnaturalización*
 2. *Alineación*
 3. *Extensión*

- Este proceso tiene lugar en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos de PCR (generalmente entre 30 y 40 ciclos).

Paso 1º PCR: Desnaturalización por calor.

- El calor (generalmente > 90°C) separa la doble hebra de ADN en dos filamentos, esto se conoce como "desnaturalización".

Puesto que los enlaces del hidrógeno que unen las bases de uno a otro son débiles, se rompen a altas temperaturas, mientras que los enlaces entre fosfatos y desoxirribosa, que son enlaces covalentes más fuertes, permanecen intactos.

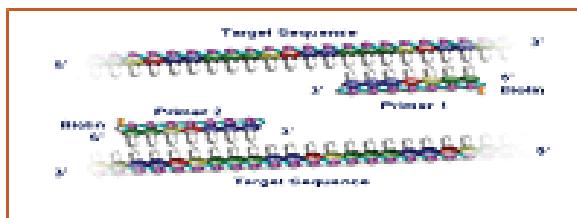


Ciclo PCR - Paso 1º: Desnaturalización por calor

Paso 2º PCR: Alineación – unión de la sonda a la secuencia diana.

- El objetivo no es replicar la hebra entera de ADN sino replicar la secuencia diana de aproximadamente 100-600 pares de bases que es única en el organismo.
- Los iniciadores marcan el final de la secuencia diana: éstos son sintéticos y cortos, creados a partir de una hebra única de ADN y que normalmente constan de 20-30 bases, con una marca de biotina 5' al final para ayudar a la detección.
- Dos cebadores están incluidos en la PCR, una para cada una de las hebras de ADN complementarias individuales que se producen durante la desnaturalización. El comienzo de la secuencia diana de ADN de interés está marcado por los cebadores que se reasocian (enlazar) a la secuencia complementaria.

- Temperatura de Alineación: generalmente ocurre entre 40°C y 65°C, dependiendo de la longitud y la secuencia de bases de los iniciadores. Permite que éstos se unan a la secuencia diana con alta especificidad.



Ciclo PCR - Paso 2º: Un par de iniciadores biotinilados se unen al final de la secuencia diana. De esta forma se optimizan las condiciones que nos permiten obtener una amplificación eficiente de una banda del peso molecular deseado.

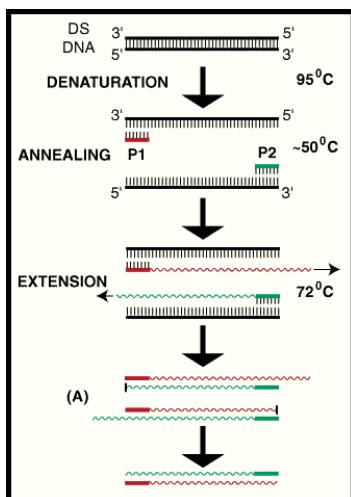
PRIMERS:

Para diseñar los primers o cebadores que hicieron posible replicar un fragmento de ADN mediante la técnica PCR es necesario conocer, en la mayoría de los casos, la secuencia de bases total o parcial de dicho fragmento. Por esta razón, aunque la PCR supera en sensibilidad y rapidez a las técnicas de clonado y de secuenciación convencionales, no se puede prescindir de la información brindada por las mismas.

Antes de comenzar el diseño con los programas informáticos de los primers o cebadores a partir de los cuales se irá formando una hebra complementaria por la acción de la polimerasa, se deben tener en cuenta una serie de recomendaciones sobre el diseño de oligonucleótidos.

- a) Los primers no deben tener ninguna discrepancia (mismatch), es decir serán exactamente complementarios.
- b) No exista algún sitio alternativo en el templado donde el primer pueda hibridarse.
- c) Los primers no formen estructura secundaria (Hairpin), se pegan a si mismo en forma de horquilla, especialmente en el extremo 3' que sean parcialmente complementarios con el otro par de primer (dimers).
- d) La longitud del oligo sea de 20 a 24 pares de bases para reducir al mínimo la posibilidad de hibridización en sitios secundarios en nuestra secuencia diana.

- e) La temperatura de fusión (Tm) sea de 55°C o más, de manera que este por arriba de la temperatura de "annealing", es la temperatura necesaria para que el 50% del primer se pegue al molde.
- f) El oligo no contenga "strings" de más de una base. Es de especial importancia evitar secuencias consecutivas repetitivas en los primers seleccionados porque sino sería un primer inespecífico.
- g) Los primers tengan un contenido de C/G entre 40 y 60%.
- h) El primer sea más afín en su extremo 3', siendo los enlaces de los últimos nucleótidos del extremo 3' fuertes como los enlaces formados por tres puentes nitrogenados.



ANEXO XI

Tabla 14: Resultados del Western Blot de muestras de pacientes de FM.

Nº muestra FM	V banda 1 (83KDa)	V banda 3 (37KDa)	Abundancia relativa
21	4568367,51	309873,57	7
11	3249135,65	765988,11	24
12	3506467,92	3790183,09	108
14	3674994,89	433966,49	12
15	659458,2	607602,46	92
16	2066751,80	2187059,87	106
17	1973105,58	521171,22	26
18	2360319,09	413915,68	18
19	3010539,26	1200907,11	40
1	14077774,00	6979656,00	50
2	18207531,00	8961259,00	49
3	35150373,00	8316475,00	24
4	12575323,00	4103047,00	33
5	11236806,00	4049762,00	36
6	19481196,00	6598826,00	34
7	22945988,00	5149175,00	22
8	19713706,00	4693574,00	24
31	92314387,00	10018176,00	11
32	43008902,00	12612604,00	29
33	56893600,00	20523393,00	36
36	43256761,00	41712970,00	96
37	15699308,00	9059517,00	58
38	42190504,00	34901049,00	83
39	59783905,00	27625519,00	46
40	89825567	59742277,00	67
41	78199392,00	30229788,00	39
22	26357311,00	27419248,76	104
23	39557744,00	41798142,23	106
24	4904793,43	405079,32	8
25	3702722,06	38840549,50	1049
26	39596641,95	23390432,91	59
27	73121576,00	47587035,51	65
28	1530997,97	2639434,33	172
29	24989148,00	4409968,57	18
30	34520208,86	654473,50	2
44	7793740,00	5745590,00	74
45	18039681,00	7629225,00	42
46	16302702,00	8572773,00	53
47	8817067,00	7052500,00	8
48	16041328,00	11653359,00	73
49	18455773,00	16458244,00	89
50	18095040,00	11224598,00	62
52	14374958,00	13107964,00	91
53	6365407,00	1101092,55	17
54	2366196,17	788902,11	33
55	2443219,14	636263,25	26
56	1265725,00	521437,00	41
57	2863770,87	233192,83	8
58	2362393,96	742097,48	31
59	2815091,74	345609,22	12
60	2728928,00	505417,80	19
61	3778730,20	643501,29	17
62	17108466,00	7314546,00	43
64	17896897,00	4768864,00	27
65	17121055,00	8808697,00	51
66	11337811,00	4229015,00	37
67	10188571,00	4053152,00	40
68	7334959,00	6123250,00	83
69	8019997,00	4147796,00	52
70	8715045,00	3390570,00	39
71	11317474,00	4756413,00	42
72	6141608,00	3551344,00	58

Tabla 15: Resultados del Western Blot de muestras de controles sanos.

Nº Control	V banda 1 (83KDa)	V banda 3 (37KDa)	Abundancia relativa 37KDa/83KDa (%)
17	34876758,00	11216267,00	32
38	39000662,00	20318435,00	52
40	71852121,00	27495722,00	38
41	86098368,00	13447911,00	16
42	5878018,5	19806265,3	337
43	13356699,00	9191179,00	69
50	18537156,00	81277220,00	44
54	9108668,00	4992975,00	55
55	11539624,00	4714980,00	41
16	7690218,00	3948073,00	51
59	8862128,00	5037381,00	57
61	5553603,00	3651497,00	66
62	4192519,00	5080078,00	121
63	4993621,00	4491865,00	90
64	5407390,00	4245876,00	79
66	8180083,00	3371007,00	41
81	203500871,00	21363377,00	10
78	154702277,00	27179002,00	18
75	210250403,00	35003339,00	17
74	151334144,00	11247654,00	7
73	160439239,00	6120204,00	4
21	207220994,00	9578916,00	5
20	266736463,00	29369035,00	11
19	256775568,00	29200278,00	11
18	409476106,00	37997793,00	9
52	13277636,5	21890611	165
53	2476466,25	526880,82	21
57	5310641,31	6020069,04	113
77	245673,32	197975,24	81
79	1570288,08	895836,5	57
80	2269467,71	1348619,47	59
1	5134148	2068070	40
2	5905579,6	1767493	30
3	1511617,5	1466376,92	97
4	941343,29	48709,18	5
5	68703,23	18971	28
7	5360	3216	60
8	249941,86	7319	3
9	246743	12440,18	5
10	68913,53	9678	14
11	487430,84	285648,74	59

ANEXO XII

Oltra et al. *Virology Journal* 2013, **10**:332
<http://www.virologyj.com/content/10/1/332>

**RESEARCH****Open Access**

Lack of evidence for retroviral infections formerly related to chronic fatigue in Spanish Fibromyalgia patients

Elisa Oltra^{2*}, María García-Escudero^{2†}, Armando Vicente Mena-Durán^{2‡}, Vicente Monsalve² and Germán Cerdá-Olmedo^{1,2}

Abstract

Background: The etiology of fibromyalgia and chronic fatigue syndrome (FM/CFS) is currently unknown. A recurrent viral infection is an attractive hypothesis repeatedly found in the literature since it would explain the persistent pain and tiredness these patients suffer from. The initial striking link of two distinct orphan retroviruses: the gamma retroviruses murine leukemia virus (MLV)-related virus and the delta retrovirus T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) to chronic fatigue have not been confirmed to date.

Results: Genomic DNA (gDNA) from 75 fibromyalgia patients suffering from chronic fatigue and 79 age-matched local healthy controls were screened for the presence of MLV-related and HTLV-2 related proviral sequences. The XMRV env gene was amplified in 20% of samples tested (24% patients/15% healthy controls). Unexpectedly, no PCR amplifications from independent gDNA preparations of the same individuals were obtained. None of the positive samples showed presence of contaminating murine sequences previously reported by other investigators, neither contained additional regions of the virus making us conclude that the initial env amplification came from spurious air-driven amplicon contaminants. No specific HTLV-2 sequences were obtained at any time from any of the 154 quality-controlled gDNA preparations screened.

Conclusions: Previous associations between MLV-related or HTLV-2 retrovirus infection with chronic fatigue must be discarded. Thus, studies showing positive amplification of HTLV-2 sequences from chronic fatigue participants should be revised for possible undetected technical problems. To avoid false positives of viral infection, not only extreme precautions should be taken when nested-PCR reactions are prepared and exhaustive foreign DNA contamination controls performed, but also consistent amplification of diverse regions of the virus in independent preparations from the same individual must be demanded. The fact that our cohort of patients did not present evidence of any of the two types of retroviral infection formerly associated to chronic fatigue does not rule out the possibility that other viruses are involved in inciting or maintaining fibromyalgia and/or chronic fatigue conditions.

Keywords: Fibromyalgia, Chronic fatigue, Murine leukemia virus (MLV)-related virus, Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV), T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)

* Correspondence: elisa.oltra@ucv.es

†Equal contributors

‡Facultad de Medicina, C/Quevedo, 2, 46001 Valencia, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2013 Oltra et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

Fibromyalgia and Chronic fatigue Syndrome (FM/CFS) are characterized by long-lasting debilitating fatigue, often accompanied by widespread muscle pain. Its incidence is rising and ranges between 0.5-6% with high prevalence in females [1]. The high socioeconomic expense that this disease supposes is worrisome.

Currently the FM/CFS diagnosis is made solely on clinically grounds, as no biological markers associated with the disease have been found. Alteration in cytokine profiling, decreased function of natural killer (NK) cells, presence of autoantibodies and reduced response of T cells to mitogens and other specific antigens have been reported in these patients [2-4]. The observed high level of pro-inflammatory cytokines may explain some of the manifestations such as fatigue and flu-like symptoms and modify NK cells activity. Existence of RNaseL isoforms reflecting an aberrant immune system function is also well documented [5,6]. Identification of markers consistently associated with this pathology will enable clinicians to effectively diagnose FM/CFS, follow the progress of the disease, monitor the effects of therapeutic approaches and probably develop preventive programs.

Since many of the symptoms characterizing FM/CFS resemble those of infectious diseases other authors have investigated a possible viral etiology of the disease. In October 2009, Lombardi *et al.* reported the finding of a novel gammaretrovirus named xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) in about 67% (68/101) of CFS patient DNA samples prepared from peripheral blood mononuclear cell (PBMC) compared to only 3.6% (5/218) of the samples prepared from healthy controls [7]. This finding, followed by the report on the presence of MLV-related virus sequences sharing 96% of identity with the XMRV in blood of patients with CFS published in 2010 by Lo *et al.* [8] prompted us to examine whether our local population of fibromyalgia patients affected by chronic fatigue also presented evidence of murine-leukemia virus-related infection. Our initial positive amplifications of XMRV sequences coincided with numerous reports attributing XMRV amplification to murine DNA contamination of reagents [9-14], making us investigate the possibility of spurious amplifications.

A second retrovirus, namely the human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2), had also been linked to chronic fatigue by a single study [15]. Contrary to XMRV screening studies, evaluation of HTLV-2 in different cohorts of FM/CFS patients has been scarce [16-18]. This latter retrovirus, closely related to the HTLV-1 virus causing adult T-cell leukemia and lymphoma and the demyelinating disease called myelopathy/Tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) has not yet been clearly associated with any disease. Since DeFreitas *et al.* reported that 83% (10/12) of chronic fatigue patients had a positive amplification of gag HTLV-2

sequence compared to 0% (0/20) in matched healthy subjects we considered that a screening of HTLV-2 sequences in our patient cohort was pertinent.

In addition, antiretroviral therapy had been shown to be of limited value in controlling HTLV-2 virus expression in patients co-infected with a second retrovirus, at least for co-infections with the HIV virus [19,20]. Thus, finding out whether any of the participating patients were co-infected with a second retrovirus could be of relevance to patient care.

In this study we evaluated the presence of both retroviruses: XMRV and HTLV-2 formerly associated to chronic fatigue, and their close relatives, in a cohort of 75 Spanish fibromyalgia patients affected of chronic fatigue and 79 population-matched healthy subjects. This is, to our knowledge, the largest cohort of patients suffering from chronic fatigue evaluated for infection with the HTLV-2 virus.

Results

Study population

Patients' median age was 52 yrs (range 25–76), female sex was the most prevalent (94%) and the vast majority lived in the urban area of Valencia (Spain). All patients had pain in both sides of their body as well as pain above and below their waist, with axial skeletal pain involvement. Median number of trigger points defined by the American College of Rheumatology (ACR) criteria [21] was 14 (range 11–18). Most patients (52%) were under welfare protection because of disability caused by FM. Participants had suffered from FM for a median time of 17 yrs (range 0–40). MFI average score for general fatigue of fibromyalgia patients was 18.36 ± 2.35 (range 7–20). Physical fatigue scores were more prominent than mental fatigue's with average scores of 17.29 ± 2.81 (range 8–20) and 14.74 ± 4.32 (range 4–20) respectively.

Inconsistent amplification of env XMRV sequence

An initial nested PCR screening of the *env* XMRV sequence in our fibromyalgia ($n = 75$) and control samples ($n = 79$) showed close to a 20% positive amplification that corresponded to 24% (18/75) of fibromyalgia patient samples and to 15% (12/79) of the healthy control samples (Additional file 1: Figure S1, panel A and Table 1). Only once a negative control with no DNA showed positive *env* amplification. The in-house designed primer set used for the detection of XMRV and MLV-related pro-viral sequences span sequences conserved to both viruses, as described in material and methods, so that the assay would detect not only the XMRV but also related virus. However, sequencing of the PCR amplified products yielded sequences identical to the XMRV *env* sequence in all cases (data not shown). At that precise time several reports had shown that some commercial polymerases and PCR kits

Table 1 Screening of retroviruses by nested PCR

Samples positive/ assayed	XMRV/MLV				HTLV-2 <i>gag</i>	
	<i>env</i>		<i>gag</i>			
	Assay 1	Assay 2	GAG-I/F/R	NP116/117		
F	gDNAprep1 (n = 75)	18/75	8/18*	0/75	0/75	0/75
	gDNAprep2 (n = 18)	ND	0/18	0/18	0/18	0/18
C	gDNAprep1 (n = 79)	12/79	5/12*	0/79	0/79	0/79
	gDNAprep2 (n = 12)	ND	0/12	0/12	0/12	0/12

The table shows the ratio between positive samples and the number of samples assayed as determined by nested PCR amplification of retroviral genes using different sets of specific primers in fibromyalgia patients (F) and healthy controls (C), as indicated. The gDNA prep2 correspond to independent preparations from frozen aliquots of the exact same participants that gave a positive amplification in the first assay (Assay 1). The asterisk (*) indicates that only positive samples in the first *env* amplification (Assay 1) were tested.

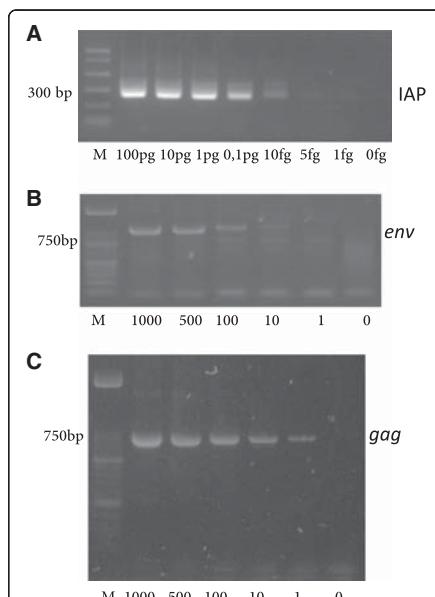
contained murine DNA contaminants [9–14]. In fact hybridomas were known to contain XMLV (xenotropic murine leukaemia virus) particles for long [22]. The polymerase used in our assays was not a hotstart polymerase, but our supplier could not guarantee absence of contaminant mouse DNA in the reagents. In order to discard the possibility that mouse DNA contaminants were the source of our *env* amplified sequences a sensitive PCR assay based on detection of the high-copy intracisternal A-particle (IAP) transposable elements was used [10,23]. This assay was selected for its known superior sensitivity to the mouse mitochondrial DNA PCR test which relies on the IAP high copy number in the mouse genome [10,24]. In addition, since some DNA preparing columns have been questioned to contain mouse DNA traces [25] a mock elute control consisting of DNA rehydration solution added to the master mix was included. Sensitivity assays showed positive amplification of IAP sequences up to 5 fg of mouse gDNA spiked into 1 μg of human gDNA under our amplification conditions (Figure 1A). However, no amplification proceeded in any of the samples or the negative controls confirming that neither our samples nor the reagents used contained contaminating mouse DNA (Additional file 1: Figure S1, panel B).

False *env* XMRV sequence amplification in blood samples due to VP62 XMRV control-derived amplicon contamination

To evaluate whether the *env* amplified sequences were product of air driven contaminants coming from the XMRV VP62 control reactions, the screening was repeated, this time using two different PCR-work stations placed in separated laboratories for the setting of sample and control reactions. Under these extreme precautions, still more than one third of the samples that showed

initial *env* amplification: (8/18) patient samples and (5/12) control samples showed positive PCR amplification of *env* sequences. However, none of the 30 *env* positive samples (18 patients and 12 controls) were able to amplify *gag* sequences with any of two sets of primers formerly used to successfully amplify MLV related sequences [7,8] (Table 1).

The most likely explanation for this puzzling result was that our samples were contaminated with the VP62 XMRV control first round PCR products which lack any *gag* sequence. To further confirm this was the case new genomic DNA was prepared from all the samples that had turned positive in the first round of screening.

**Figure 1** IAP and XMRV amplification sensitivity assays. **Panel A:**

A: the indicated amounts of mouse genomic DNA were spiked into 1 μg of human gDNA and IAP sequences (236–312 bp) were amplified using previously described conditions [10]. **Panels B and C** show amplification of the *env* (973 bp) and *gag* (730 bp) genes using each outer primer set respectively, from the pcDNA3.1-VP62 construct (AIDS Research and Reference Reagent Program Cat# 11881) (number of copies 0–1000 as indicated) spiked into 1 μg of human gDNA with the outer amplification primers and conditions described in Methods. All PCR products were visualized on 2% agarose real-safe stained gels. M: molecular DNA markers correspond to PCR markers (Promega) (**panel A**) and marker XIII (Roche) (**panels B and C**).

Repetition of PCR amplification with the same *env* primers set showed negative results in all 30 samples (Additional file 1: Figure S1, panel C) allowing us to confirm that the initial amplification of *env* sequences in 20% of the samples was due to contamination by amplicons from the control reactions.

Lack of amplification of XMRV sequences in sensitive nested PCR assays is neither due to lack of gDNA integrity nor to the presence of PCR inhibitors

To rule out the possibility that the lack of amplification of viral sequences was due to degradation of the gDNA template and/or presence of PCR inhibitors the 30 (18 patients and 12 controls) newly prepared samples and also the initial gDNA samples showing no XMRV amplification (57 patient and 67 control samples) were analyzed by gel electrophoresis and by PCR amplification of known genomic sequences (the house-keeping gene β -actin and a fragment of the human chromosome X [Genebank accession: NT_079573]). The latter was amplified with the GAPDH specific primers designed Lombardi *et al.* [7]. Which in addition to match the GAPDH mRNA sequence between nucleotides 107 and 334 corresponding to exons 1 and 2 and their corresponding location on chromosome 12, also match the human genomic X chromosome GRCh37.p10 contig sequence between positions 2499130 and 2498903. All 75 patient and the 79 control samples showed gDNA larger than 23 kb and showed positive amplification of both fragments, allowing us to conclude that lack of XMRV amplification is neither due to lack of gDNA integrity nor to the presence of PCR amplification inhibitors (Additional file 2: Figure S2). In addition, sensitivity assays of *env* and *gag* sequences showed detection of 1–10 copies from the pcDNA3.1-XMRV control spiked into 1 μ g of human gDNA (Figure 1, panels B and C)

indicating that lack of detection is most likely due to lack of infection.

Lack of amplification of MLV *gag* related sequences

In order to determine whether the samples analyzed could contain other retroviruses partially related to the MLV virus, the nested PCR amplifications were performed at lower annealing temperatures up to 5°C below primers melting temperature (T_m), which would allow annealing to, and thus amplification of non-perfect matches. Under these permissive amplification conditions, several bands were obtained with both the GAG-I-F and GAG-I-R set and more abundantly with the NP116/NP117 set (Figure 2). No bands were obtained for the *env* set of primers under these same amplification conditions (data not shown). Although most bands had a smaller size, some of them showed a molecular weight close to the expected *gag* MLV or XMRV product size. However, sequencing of these PCR amplified fragments confirmed that all of them corresponded to unspecific amplification of human genomic sequences.

Lack of HTLV-2 or related sequences amplification

An additional objective of the present study was to determine whether the participating fibromyalgia patients suffering of chronic fatigue were infected with the HTLV-2 retrovirus formerly related to chronic fatigue patients [15].

Using a similar nested PCR based approach used to screen XMRV and MLV-related sequences the gDNA samples of patients and controls were rescreened; this time HTLV-2 sequence specific primers under formerly described conditions [26] were used.

None of the fibromyalgia ($n = 75$) or the healthy blood donor controls ($n = 79$) showed amplification of a HTLV-2 specific sequence (Table 1). In order to investigate whether

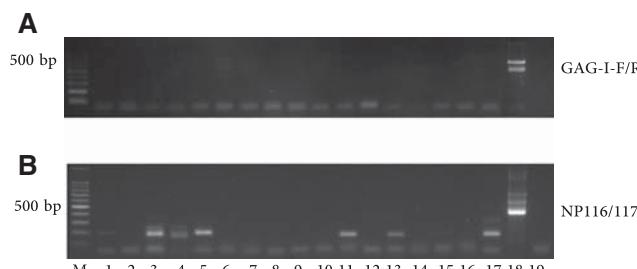


Figure 2 Amplified products with *gag* primers were unspecific. Representative nested PCR amplification of 17 gDNA samples from 9 patient samples (lanes 1–9) and 8 healthy controls (lanes 10–17) visualized on 2% agarose real-safe stained gels. Lane 18 corresponds to the VP62 XMRV positive control and lane 19 is a negative control with no DNA template. M is the 100 bp ladder marker (Promega). **Panel A** shows the products amplified with the GAG-I-F and GAG-I-R primers (410 bp) [7,44] while **Panel B** shows the products of the NP116 and NP117 primers (380 bp) [8]. All amplifications were performed under the permissive conditions described in materials and methods.

the samples contained other retroviral sequences related to HTLV-2 the screening was repeated using similar permissive amplification conditions previously mentioned. Under these low temperature conditions no final amplification product was obtained either (Figure 3, panel B). Unexpectedly, 2 patient samples showed amplification in the first round of PCR, one of the bands had a size close to the expected product (802 bp). The other had an approximate size of 450 bp (Figure 3, panel A; sample 17). Subcloning and sequencing of either band revealed that none of them contained viral sequences. Again, sensitivity assays using subcloned HTLV-2 *gag* sequences spiked into 1 μg of human gDNA showed that our nested-PCR assay detection threshold was 1–10 viral copies (Figure 3, panel C). Thus, neither the FM/CFS samples nor the healthy controls presented any evidence of infection by viruses related to HTLV-2.

Discussion

This is the first report to our knowledge that evaluates the presence of the both families of retrovirus formerly associated with chronic fatigue: the gamma retroviruses MLV-related and the delta retrovirus HTLV-2 in

a cohort of patients suffering from fibromyalgia and chronic fatigue.

At present enough evidence exists to support the inexistence of a natural form of the XMRV virus in humans [14,27,28]. However, since the XMRV is competent to infect and replicate within human cells [29] and some of its relatives: the xenotropic-MLV (X-MLV) viruses can infect non-human primates and other species causing disease [22,30], the possibility of a human xeno-infection by an MLV-related virus remains.

Opposite to the actively studied relationship of the XMRV to chronic fatigue, the association or non-association of the orphan HTLV-2 retrovirus to the disease has not been clarified. The initial study which used PCR amplification of HTLV-2 proviral sequences followed by probe hybridization assays to find an association of HTLV-2 infection to CFS was followed by only a few negative studies [16–18]. Even though this technique is highly specific and sensitive, amplification by nested PCR may be superior when detection of low levels of infection and/or virus variants is pursued. In addition none of the three negative studies that followed the initial one included more than 30 patient blood samples [16–18], and therefore further investigation including larger cohorts of patients was at need.

This, to our knowledge, constitutes the study with the largest number of patients ($n = 75$) of fibromyalgia suffering from chronic fatigue examined for infection by HTLV-2. None of the samples assayed showed specific amplification of HTLV-2 or related sequences at any time making us conclude a non-association between HTLV-2 retroviral infection and the chronic fatigue condition of our patients. As we already proposed [31] HTLV-2 association with CFS reported by DeFreitas [15] may also be caused by undetected technical problems like it occurred with XMRV and CFS [7].

It is also interesting to note that the molecular weight of one of the two bands obtained in our first PCR amplification coincides with the endogenous unspecific 440 bp *gag* band obtained by Gow *et al.* [17] in the first round PCR step. However, different to them, we could only observe it in 2/154 samples assayed (Figure 3, panel A) and therefore we cannot coin it as endogenous.

Contrary to the negative results obtained in the HTLV-2 screen, our initial screening analysis of XMRV and MLV-related sequences yielded a moderate percentage of positives 20% (30/154) with a slight predominance on the patient subgroup (24% positive patients versus 15% positive healthy controls).

The lack of sequence diversity of our PCR amplified products with respect to the american VP62 XMRV isolate we were using as the positive control made us suspect our samples could be contaminated with a specific template. Even though our lab does not harbor mice work and nor mouse-derived or XMRV-infected cell lines are maintained

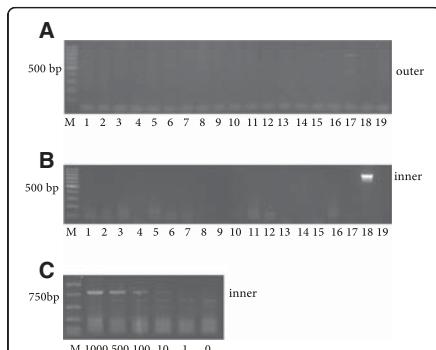


Figure 3 Lack of HTLV-2 amplification. Representative nested PCR amplification of 17 samples (10 patient and 7 healthy controls) (lanes 1–10 and 11–17 respectively) visualized on 2% agarose real-safe stained gels. **Panel A** shows the products of the first round of PCR amplification (outer primers), while **Panel B** shows the nested PCR final products (inner primers). Lane 18 corresponds to a HTLV-2 patient positive gDNA kindly provided by Drs. Treviño and Soriano [26], and lane 19 is a negative control with no DNA template. **Panel C** shows amplification of the *gag* HTLV-2 gene from the pGEMT-HTLV-2-gag construct (see Methods) (number of copies 0–1000 as indicated) spiked into 1 μg of human gDNA with the inner amplification primers and conditions described in Methods. All PCR products were visualized on 2% agarose real-safe stained gels. M: molecular DNA markers correspond to 100 bp ladder marker (Promega) (**panels A and B**) and PCR markers (Promega) (**panel C**).

we proceeded to perform a sensitive IAP test to evaluate whether the *env* positive amplifications could come from mouse DNA contamination in any of the components used. Different to other researchers we could not find any presence of murine DNA.

If the obtained amplified sequences were really derived from our participant blood samples we should be able not only to reproduce the obtained results from an independently prepared sample from the same patient but also to detect other parts of the viral genome. The fact that the initial positive amplification of the XMRV *env* sequence could not be reproduced in an independent extraction of gDNA prepared from frozen aliquots of the same exact samples, added to the complete lack of amplification of other regions of the viral genome, specifically the *gag* sequence, made us conclude that the initial amplification should have come from fortuitous air driven spreading of *env* specific amplicons, most likely product of the first round of PCR of our VP62 XMRV positive control. This conclusion points out the extreme importance of independently confirming positive results when using highly sensitive assays.

In addition to the two initial reports by Lombardi *et al.* and Lo *et al.* which showed a striking association between the presence of XMRV or MLV-related sequences and a chronic fatigue condition, both of which are currently retracted, some other groups of researchers have also reported positive amplification of murine gamma retrovirus sequences in human samples. Most amplifications have been attributed to sample contamination with mouse DNA [9-14], others confirming lack of contaminant mouse DNA, have not been able to find an alternative explanation, but as in our study, their positive results could never be confirmed for a second viral gene in the same sample [32-34]. It is therefore possible that their inconsistent amplifications may come from spurious amplicon contamination similar to the ones we detected. Alternatively, inconsistent PCR amplifications could come from extremely scarce target sequence presence. However, being that most of the studies finding inconsistent viral sequence amplifications, including ours; used 0.5-1 µg of gDNA template in their assays [32,35] it is very unlikely this could be the case. Spiking amplification assays determined 1-10 copies to be the lower threshold limit for successful nested PCR amplification in the context of 1 µg of human gDNA, coinciding with previous reports [35], and since each somatic cell has 6.16 pg of DNA, less than 1 in 3×10^5 cells would need to be infected for such a scenario to take place.

Although, great efforts had been directed to look for MLV related infection in CFS patients only a few [33,36-38] included fibromyalgia patients in the studied groups, and only one of them included a larger cohort of patients than our study [33].

To ensure that our testing would not miss genetically diverse XMRV, MLV or HTLV-2 strains we decreased the annealing temperature to allow missprimed amplification. Even though some bands were amplified under these non-stringent conditions none of them contained viral sequences, most probably indicating absence of related infections in our patient and control participants.

Because negative PCR results would be obtained from defective samples, we considered necessary to rigorously perform controls to guarantee that lack of amplification was not due to degraded or impure DNA preps. Even though amplification of house-keeping genes which are present at a frequency of 2 copies per cell does not guarantee amplification of less abundant templates, at least rules out the presence of potent inhibitors of PCR amplification.

It was noticed that the GAPDH primer set used in Figure 1 of the Lombardi *et al.* study [7] amplifies a human non-related genomic sequence in chromosome X of a similar size to expected GAPDH RT-PCR product (228 vs 227 bp) and therefore careful interpretation of the results obtained with it should be taken. In our study it served the purpose of detecting amplification of a region of the genome (Additional file 1: Figure S1, panel B) to evaluate the quality of the gDNA preps screened.

Conclusions

No evidence of infection by any of the two retroviruses formerly associated to chronic fatigue syndrome: the XMRV and the HTLV-2 or their close relatives was found in any of the 154 tested samples.

The *env* positive amplifications obtained in our study (20% of the samples) derived from a specific source: amplicons corresponding to the products of our positive control sample: the VP62 isolate of the XMRV. It is, therefore, our recommendation that in addition to rigorous contamination checkups and restricted access of positive controls to sample working areas; independent amplification of more than one gene of the virus is confirmed from more than one independent sample preparation from a particular individual in order to diagnose infection by the sensitive nested PCR method. We also recommend the inclusion of controls to guarantee the quality of the gDNA template evaluated especially when all results obtained are negative.

The negative results reported in this and other studies do not allow ruling out the possibility of a viral or a set of viral infections to be the origin for the fibromyalgia and/or chronic fatigue syndrome. Low cost high throughput, deep sequencing assays are powerful tools to identify all viral species commonly infecting humans (the human virome) and also to allow a comprehensive understanding of viral variation and evolution during replication

and transmission events. The use of these techniques in metagenomic studies is critical as we aim to understand how the human virome affects long-term human health, immunity, and response to coinfections [39].

Methods

Patients and healthy controls

From January 2011 to April 2011, 75 patients and 79 healthy participants individually matched by age (range +/- 5 yrs) were recruited for this study. All 75 patients came from a single Institution, Catholic University Medical School in Valencia, Spain and meet the criteria for fibromyalgia diagnosis according to the American College of Rheumatology's (1990) [21]. Healthy matched controls were regular blood donors from the Valencian Community Blood Bank. A single sample of whole blood was obtained from each individual after signing an informed consent form. Each participant underwent a thorough clinical interview to assess clinical criteria and severity of fibromyalgia using standardized Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) case report forms [40,41]. For fatigue assessment the Multifatigue inventory MFI was used [42]. Those with a score \geq well population medians on the general fatigue or reduced activity scales of the MFI were considered to meet fatigue criteria of the 1994 international case definition. Patient data were entered into a computer database (Microsoft Access 2003, Redmond, WA: Microsoft Corp). The study was approved by the Hospital de la Plana de Vila-Real (Castellón, Spain) CEIC. Written informed consent was obtained from patients for the publication of this report and any accompanying images.

Specimen collection, processing and storage

Approximately 20 ml of blood per patient was collected in 2 Vacutainer tubes containing 170 IU of lithium heparin (Becton Dickinson BD 365725) were hand-carried at RT and processed within 2 h. After taking 2.4 ml of fresh blood aliquoted into 2 vials: one to be freshly processed for genomic DNA (gDNA) and the other to be kept at -80°C, the remaining sample was subjected to Ficoll based gradient separation for the isolation of PBMCs.

Isolation of PBMCs

Samples diluted at 1:1 (v/v) ratio in phosphate-buffered saline solution (PBS) were layered on top of 1 vol of Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare) and subjected to density centrifugation at 20°C at 500 g for 30 min (brakes off). The PBMC layer was removed, washed with PBS and centrifuged (brakes on). The isolated PBMC pellets were resuspended in 1 vol of red blood cell lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, pH 7.4, 0.1 mM EDTA), kept on ice for 5 min, and centrifuged (20°C, 500 g, 10 min), as previously described [43]. The PBMC were washed with PBS and centrifuged again. The pellets were resuspended

in freezing medium (90% FBS, 10% DMSO) concentration adjusted to 10^7 mononuclear cells/ml aliquoted and frozen at -150°C until use.

Isolation of genomic DNA

The Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) was used to isolate human gDNA either from 600 µl of fresh whole blood or from 600 µl of pre-frozen whole blood or pre-frozen PBMCs for samples that needed a second preparation of gDNA (*env* positive samples), following manufacturer's recommendations. The same kit was used to isolate mouse gDNA from 600 µl of mouse tail fresh whole blood under equivalent conditions. gDNA yield was measured by spectroscopic absorption at 260 nm in a nanodrop 2000c (Thermo Scientific) and concentration was adjusted to 200 ng/µl in TE buffer. gDNA stocks were kept at 4°C in tightly capped tubes to prevent gDNA breakage by freeze-thaw cycles.

Nested PCR amplifications

The nested PCR for the *env* and *gag* genes were performed according to the protocols described previously [7,8,44] with some modifications. For the first round of PCR, the amplification reaction performed in a final volume of 50 µl contained 1 µg of gDNA, 1x Green Go Taq Flexi buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 pmol/µl of each primer and 2.5 units of Go Taq Flexi DNA polymerase (Promega) and 5% DMSO. The cycles were 94°C 5 min, (1 min at 94°C, 30 sec at 55°C and 1 min at 72°C) \times 40 cycles and 10 min at 72°C. For the second round PCR the amplification reaction was the same except that contained 1/10 vol of the first round as the target sequence to be amplified, the Tm used in the annealing step range from 50 to 60°C depending on the primer set used; the number of cycles was 45 in all cases. As PCR amplification positive control a pcDNA3.1 construct containing the XMRV VP62 cDNA (Cat# 11881) provided by the AIDS Research and Reference Reagent Program was used. Negative control contained all components in the master mix but no DNA. The conditions used for the amplification of HTLV-2 sequences were the same described else were [26] except that the annealing temperature of the second round was lowered to 55°C to achieve permissive amplification conditions. Positive controls for HTLV-2 amplification consisted of gDNA isolated from a HTLV-2 positive patient which was kindly provided by Drs. Soriano and Treviño at the Hospital Carlos III (Madrid, Spain) or a self-made construct using a PCR amplified HTLV-2 fragment from the first round (outer primers) subcloned in the pGEM-T Easy vector (Promega).

For detection of XMRV and MLV-related viral sequences

Primers to amplify conserved *env* sequences were self-designed upon alignment of the Xenotropic MuLV-related

virus VP62 complete genome [Genbank: DQ399707] with the Murine Leukemia Virus MCF1233 complete genome [Genbank: U13766]. For the first round PCR the primers selected were XMRV-env-outer-F 5'-TGTGA GACCACTGGACAGGC-3' and XMRV-env-outer-R 5'-GTAAGTCCTCCAAACAGCAG-3' and for the nested PCR the primers XMRV-env-inner-F 5'- ACGCGGGTAA AAGGGCCAGC-3' and XMRV-env-inner-R 5'-AAGCC CAAATGGTCCCCGGC-3' were used.

The primers to amplify *gag* XMRV sequences were the same used by Urisman *et al.* and Lombardi *et al.* to detect 413-bp XMRV *gag* sequences in prostate cancer and CFS patients, 419 F and 1154R (outer) and GAG-I-F and GAG-I-R respectively [7,44]. As inner primers the NP116 and NP117, designed by Lo *et al.* [8] to anneal to highly conserved sequences in different MLV-like viruses and XMRVs, were also used.

For detection of HTLV-2 sequences

The outer primers were: 5'-CTAGCCTCCAAAGCCAG CCACC-3' as the forward primer and 5'-CCAGTGGT GGGTTGATAGCCC-3' as the reverse. The inner primers were: 5'-CGAGTCATGACCCAAAGGTC-3' and 5'-G GAGTTGGGAAAGCCGTGG-3'forward and reverse, respectively, for detection of an 802 bp LTR fragment of the HTLV-2 b2 southern Europe subtype, formerly described by Toro *et al.* [26].

PCR amplifications

For detection of IAP sequences

The primers IAP-F 5'-ATAATCTGCGCATGAGCCAAG G-3' and IAP-R 5'-AGGAAGAACACCACAGACCAGA-3' and previously described amplification conditions were used [10].

For detection of house-keeping gene sequences

The primers for the human genomic X chromosome GRCh37.p10 contig sequence between positions 2499130 and 2498903 were described elsewhere [7] as GAPDH forward - 5' GGAAAGGTGAAGGTGGAGTC 3' and reverse - 5' GGAAAGATGGTGTAGGGATTTC 3'. The house designed β -actin primer sequences were: 5'ATA TCGCCGCGCTCGTCGTC 3'(forward) and 5'GAGC CACACGCAGCTATTG 3' (reverse). 50–100 ng genomic DNA were used under the standard PCR amplification conditions described, 3 minutes at 95°C followed by 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, followed by 1 cycle of 72°C for 2 minutes.

All assays were optimized to achieve the highest sensitivity in detecting the target sequences up to 110 copies of either target plasmid control sequence spiked in one μ g of human genomic DNA before start which coincided with previous reports [32,35]. One μ g of human DNA

was used as input for the PCR tests and all PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by real safe-staining.

Subcloning, sequencing of PCR amplified fragments and BLAST alignments

The pGEM-T Easy (Promega) vector was used to subclone gel purified (GenElute™ Agarose Spin Columns, Sigma) PCR amplified fragments by TA cloning according to manufacturer protocols. Sequencing was performed at the sequencing facility: Unidad de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, using the T7 forward and SP6 reverse primers under standard conditions. Sequences obtained were aligned to the non-repetitive sequences at the Genbank database using the Basic local alignment search tool at the NCBI [45].

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Env positive samples were not contaminated with mouse DNA. Panel A: representative result of the first round of XMRV env screening by nested PCR (602 bp). Lanes 1–12 contained gDNA from 7 patient samples (lanes 1–7) and 5 healthy controls (lanes 8–12). Positive and negative controls corresponding to pCDNA3.1-VP62 (AIDS Research and Reference Reagent Program Cat# 11881) and no gDNA, are shown in lanes 14 and 13 respectively. Panel B: amplification of IAP mouse sequences (236–312 bp) from 17 env positive samples (11 patients and 6 controls) (lanes 1–11 and 12–17 respectively). Lane 18 shows amplification from mouse genomic DNA (positive control) while lane 19 shows amplification of a mock gDNA elute (negative control). Panel C: env screening by nested PCR of the same env positive samples shown in panel B now using new independent preparations of gDNA. All PCR products were visualized on 2% agarose real-safe stained gels. M: 100 bp ladder marker (Promega).

Additional file 2: Figure S2. gDNA preparations from PBMCs were intact and pure. Panel A: representative gDNA from 9 patient samples (lanes 1–9) and 9 healthy controls (lanes 10–18) (0.5 μ g/lane) visualized in a 1% real-safe stained agarose gel. Panel B: PCR products amplified from the same samples with either the previously described GAPDH primers (227 bp) [7] (upper) or the in-house designed β -actin set (lower) (416 bp); lane 19 shows a negative control with no DNA. All samples were visualized in 2% real-safe stained agarose gels. M: lambda phage HindIII DNA marker (Biotoools) (panel A); M: 100 bp ladder marker (Promega) (panel B).

Abbreviations

FM/CFS: Fibromyalgia/chronic fatigue syndrome; NK: Natural killer; PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells; FIQ: Fibromyalgia Impact Questionnaire; MFI: Multi-fatigue inventory; MLV: Murine leukemia virus; XMRV: Xenotropic murine leukemia virus-related virus; HTLV-2: T-lymphotropic virus type 2; IAP: Intracisternal A-type particle; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Competing interests

The authors declare they have no competing interests.

Authors' contributions

EO, AMD, VM and GCO conceived and designed the study. VM, AMD, MGE and GCO confirmed patient diagnostic and collected data on participating patients. EO, MGE and AMD performed specimen testing and data analysis. EO and AMD wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Authors are grateful to the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH for providing us with the XMRV VP62 cDNA from Drs. Robert H. Silverman and Beihua Dong; and to Drs. Vincent Soriano and Ana Treviño at the Service of Infectious Diseases, Hospital Carlos III, Madrid (Spain) for the genomic DNA of a patient that tested positive for HTLV-2. Authors are also grateful to the Escuela Valenciana de Estudios de la Salud (EVES) Generalitat Valenciana (07/2010) for the financial support, to Ms. Elena Castellana for performing patient blood draw and to Ms. Teresa Sánchez-Fito for technical support.

Author details

¹Catedra Univalle en innovación e investigación en patologías del trabajo, C/Quevedo, 2, 46001 Valencia, Spain. ²Facultad de Medicina, C/Quevedo, 2, 46001 Valencia, Spain.

Received: 29 August 2013 Accepted: 17 October 2013

Published: 11 November 2013

References

- Bartels EM, Dreyer L, Jacobsen S, et al: Fibromyalgia, diagnosis and prevalence. Are gender differences explainable? *Ugeskr Laeger* 2009, **171**(49):3588–3592.
- 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.
- Fletcher MA, Zeng XR, Barnes Z, Lewis S, Klimas NG: Plasma cytokines in women with chronic fatigue syndrome. *J Transl Med* 2009, 7:96.
- Fletcher MA, Zeng XR, Maher K, Lewis 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.
- Bisbal C, Silverman RH: Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie* 2007, **89**(6–7):789–798.
- Meeus M, Nijs J, McGregor N, Meeusen R, De Schutter G, Truijen S, Frémont M, Van Hoof E, De Meirlier K: Unraveling intracellular immune dysfunctions in chronic fatigue syndrome: interactions between protein kinase R activity, RNase L cleavage and elastase activity, and their clinical relevance. *In Vivo* 2008, **22**(1):115–121.
- Lombardi VC, Ruscetti FW, Das Gupta J, Pfost MA, Hagen KS, Peterson DL, Ruscetti SK, Bagni RK, Petrow-Sadowski C, Gold B, Dean M, Silverman RH, Mikovits JA: Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Nature* 2009, **326**(5952):585–589. Retraction in: Alberts B. *Science* 2011; **334**(6063):1636. Partial retraction in: 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. *Science* 2011; **334**(6053):176.
- Lo SC, Pripuzova N, Li B, Komaroff AL, Hung GC, Wang R, Alter HJ: Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(44):15874–15879. Erratum in: Lo SC, Pripuzova N, Li B, Komaroff AL, Hung GC, Wang R, Alter HJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(1):346.
- Oakes B, Tai AK, Cingoz O, Heneff MH, Levine S, Coffin JM, Huber BT: Contamination of human DNA samples with mouse DNA can lead to false detection of XMRV-like sequences. *Retrovirology* 2010, **7**:109.
- Robinson MJ, Erlwein OW, Kaye S, Weber J, Cingoz O, Patel A, Walker MM, Kim WJ, Uppasankar M, Coffin JM, McClure MO: Mouse DNA contamination in human tissue tested for XMRV. *Retrovirology* 2010, **7**:108.
- Hüé S, Gray ER, Gall A, Katzourakis A, Tan CP, Houldcroft CJ, McLaren S, Pillay D, Futreal A, Garson JA, Pybus OG, Kellam P, Towers GJ: Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination. *Retrovirology* 2010, **7**(1):111.
- Smith RA: Contamination of clinical specimens with MLV-encoding nucleic acids: implications for XMRV and other candidate human retroviruses. *Retrovirology* 2010, **7**:112.
- Tuke PW, Tettmar KJ, Tamuri A, Stoye JP, Tedder RS: PCR master mixes harbour murine DNA sequences. Caveat emptor! *PLoS One* 2011, **6**(5):e19953.
- Delviks-Frankenberry KA, Cingoz O, Coffin JM, Pathak VK: Recombinant origin, contamination, and de-discovery of XMRV. *Curr Opin Virol* 2012, **2**(4):499–507.
- DeFreitas E, Hilliard B, Cheney PR, Bell DS, Kiggundu E, Sankey D, Wroblewska Z, Palladino M, Woodward JP, Koprowski H: Retroviral sequences related to human T-lymphotropic virus type II in patients with chronic fatigue immune dysfunction syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(7):2922–2926.
- Levine PH, Jacobson S, Pocinki AG, Cheney P, Peterson D, Connally RR, Weil R, Robinson SM, Ablashi DV, Salahuddin SZ, et al: Clinical, epidemiologic, and virologic studies in four clusters of the chronic fatigue syndrome. *Arch Intern Med* 1992, **152**(8):1611–1616.
- Gow JW, Simpson K, Schliephake A, Behan WM, Morrison LJ, Cavanagh H, Rethwilm A, Behan PO: Search for retrovirus in the chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol* 1992, **45**(12):1058–1061.
- Honda M, Kitamura K, Nakasone T, Fukushima Y, Matsuda S, Nishioka H, Matsuda J, Hashimoto N, Yamazaki S: Japanese patients with chronic fatigue syndrome are negative for known retrovirus infections. *Microbiol Immunol* 1993, **37**(10):779–784.
- Beilke MA, Traña-Dorge VL, Sirois M, Bhuiyan A, Murphy EL, Walls JM, Fagan R, Winsor EL, Kissinger PJ: Relationship between human T lymphotropic virus type 1/2 viral burden and clinical and treatment parameters among patients with HIV type 1 and HTLV-1/2 coinfection. *Clin Infect Dis* 2007, **44**(9):1229–1234.
- Rouxou DF, Murphy EL: The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev* 2004, **6**(3):144–154.
- Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al: The American college of rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia: report of the multicenter criteria committee. *Arthritis Rheum* 1990, **33**:160–172.
- Weiss RA: A cautionary tale of virus and disease. *BMC Biol* 2010, **8**:124.
- Stoye JP, Silverman RH, Boucher CA, Le Grice SF: The xenotropic murine leukemia 35 virus-related retrovirus debate continues at first international workshop. *Retrovirology* 2010, **7**:113.
- Kuff EL, Lueders KK: The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Adv Cancer Res* 1988, **51**:183–276.
- Erlwein O, Robinson MJ, Dustan S, Weber J, Kaye S, McClure MO: DNA extraction columns contaminated with murine sequences. *PLoS One* 2011, **6**(8):e23484.
- Toro C, Rodés B, Bassani S, Jiménez V, Tuset C, Brugal MT, de la Fuente L, Soriano V: HTLV Spanish Study Group. Molecular epidemiology of HTLV-2 infection among intravenous drug users in Spain. *J Clin Virol* 2005, **33**(1):65–70.
- Patrón T, Delviks-Frankenberry KA, Cingoz O, Martínez A, Kung HJ, Tepper CG, Hu WS, Fivash MJ Jr, Coffin JM, Pathak VK: Recombinant origin of the retrovirus XMRV. *Science* 2011, **333**(6038):97–101.
- Alter HJ, Mikovits JA, Switzer WM, Ruscetti FW, Lo SC, Klimas N, Komaroff AL, Montoya JG, Bateman L, Levine S, Peterson D, Levin B, Hanson MR, Genf A, Bhat M, Zheng H, Wang R, Li B, Hung GC, Lee LL, Sameroff S, Heneine W, Coffin J, Hornig M, Lipkin WI: A multicenter blinded analysis indicates no association between chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis and either xenotropic murine leukemia virus-related or polytropic murine leukemia virus. *MBio* 2012, **3**(5):e00051–12.
- Stielker K, Schulz C, Lavanya M, Aepli-Bacheler M, Stocking C, Fischer N: Host range and cellular tropism of the human exogenous gammaretrovirus XMRV. *Virology* 2010, **399**(1):23–30.
- Fiebig U, Hartmann MG, Bannert N, Kurth R, Denner J: Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. *J Virol* 2006, **80**(11):5651–5654.
- Oltra E, Mena-Durán AV, Cerdá-Olmedo G: La infección crónica por el gamma retrovirus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia murina (xmrv) en patología humana: realidad o artefacto de laboratorio? *Terapeia. Estudios y propuestas en ciencias de la salud* 2011, **3**:81–90. ISSN:1889-6111. Spanish.
- Lee LL, Lin L, Bell DS, Levine S, Hanson MR: Sensitivity of PCR assays for murine gammaretroviruses and mouse contamination in human blood samples. *PLoS One* 2012, **7**(5):e37482.
- Arredondo M, Hackett J Jr, de Bethencourt FR, Treviño A, Escudero D, Collado A, Qiu X, Swanson P, Soriano V, de Mendoza C: Prevalence of xenotropic murine leukemia virus-related virus infection in different risk populations in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012, **28**(9):1089–1094.
- Paolucci S, Piralla A, Zanello C, Minoli L, Baldanti F: Xenotropic and polytropic murine leukemia virus-related sequences are not detected in the majority of patients with chronic fatigue syndrome. *New Microbiol* 2012, **35**(3):341–344.

35. Switzer WM, Jia H, Hohn O, Zheng H, Tang S, Shankar A, Barnett N, Simmons G, Hendry RM, Falkenberg VR, Reeves WC, Heneine W: Absence of evidence of xenotropic murine leukemia virus-related virus infection in persons with chronic fatigue syndrome and healthy controls in the United States. *Retrovirology* 2010, **7**:57.
36. Maggi F, Bazzichi L, Sernissi F, Mazzetti P, Lanini L, Scarpellini P, Consensi A, Giacomelli C, Macera L, Vatteroni ML, Bombardieri S, Pistello M: Absence of xenotropic murine leukemia virus-related virus in Italian patients affected by chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, or rheumatoid arthritis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012, **25**(2):523–529.
37. Elfaitouri A, Shao X, Mattsson Ulfstedt J, Muradrasoli S, Bölin Wiener A, Gollob S, Ohmalm C, Matousek M, Zachrisson O, Gottfries CG, Blomberg J: Murine gammaretrovirus group G3 was not found in Swedish patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and fibromyalgia. *PLoS One* 2011, **6**(10):e24602.
38. Luczkowiak J, Sierra O, González-Martin JJ, Herrero-Beaumont G, Delgado R: No xenotropic murine leukemia virus-related virus detected in fibromyalgia patients. *Emerg Infect Dis* 2011, **17**(2):314–315.
39. Delwart E: A roadmap to the human virome. *PLoS Pathog* 2013, **9**(2):e1003146.
40. Burckhardt CS, Clark SR, Bennett RM: The fibromyalgia impact questionnaire: development and validation. *J Rheumatol* 1991, **18**:728–733.
41. Rivera J, Gonzalez T: The fibromyalgia impact questionnaire: a validated spanish version to assess the health status in women with fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol* 2004, **22**:554–560.
42. Smets EMA, Garsen B, Bonke B, de JCJM H: The multidimensional fatigue inventory (MFI); psychometric qualities of an instrument to assess fatigue. *J Psychosom Res* 1995, **39**:315–325.
43. Demmetre É, Bastide L, D'Haese A, De Smet K, De Meirlier K, Tiev KP, Englebienne P, Lebleu B: Ribonuclease L proteolysis in peripheral blood mononuclear cells of chronic fatigue syndrome patients. *J Biol Chem* 2002, **277**(38):35746–35751.
44. Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbs RR, Ganem D, Silverman RH, DeRisi JL: Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog* 2006, **2**(3):e25. Retraction in: *PLoS Pathog*. 2012; **8**(9).
45. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990, **215**(3):403–410.

doi:10.1186/1743-422X-10-332

Cite this article as: Oltra et al.: Lack of evidence for retroviral infections formerly related to chronic fatigue in Spanish Fibromyalgia patients. *Virology Journal* 2013 10:332.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANEXO XIII**NIH AIDS Reagent Program**

20301 Century Boulevard
Building 6, Suite 200
Germantown, MD 20874
USA

Phone: 240 686 4740
Fax: 301 515 4015
aidsreagent.org

DATA SHEET

Reagent:	pGEMT-HTLV-2
Catalog Number:	12496
Lot Number:	140032
Release Category:	E
Provided:	5µg in 12.5µl TE
Cloning Vector:	pGEMT-Easy (Promega)
Cloning Site:	EcoRI and SpeI
Description:	The HTLV-2 PCR amplified sequence was ligated to the T's between EcoRI and Spe I sites of the pGEMT-Easy (Promega) vector. The size of the insert is 801 bp. The cloning vector is pGEMT-Easy (Promega). The size of the cloning vector including the insert is 3818 bp. The insert was obtained by PCR amplification from human genomic DNA and ligated to the pGEMT-Easy vector (Promega) following manufacturer recommendations. The sequence maps to partial LTR and gag sequences of the HTLV-2 virus (Human T-cell lymphotropic virus type II, complete proviral genome of isolate G12)[Genbank accession: L11456] between nucleotides 39 and 840 corresponding to partial LTR and gag sequences of the virus. Not for protein expression
Special Characteristics:	The construct contains partial sequence of the orphan HTLV-2 virus that could serve as a positive control in population screenings using the following primers: Forward: 5'-CGAGTCATCGACCCAAAGGTC-3' Reverse: 5'-GGAGTTGGGAAAGCCCCGTGG-3'
Recommended Storage:	-20C

ALL RECIPIENTS OF THIS MATERIAL MUST COMPLY WITH ALL APPLICABLE BIOLOGICAL, CHEMICAL, AND/OR RADIOCHEMICAL SAFETY STANDARDS INCLUDING SPECIAL PRACTICES, EQUIPMENT, FACILITIES, AND REGULATIONS. NOT FOR USE IN HUMANS.

Contributor: Dr. Elisa Oltra (Universidad Católica de Valencia "San Vicente Mártir", Valencia, Spain)

References:
Oltra E, García-Escudero M, Mena-Durán AV, Monsalve V, Cerdá-Olmedo G. Lack of evidence for retroviral infections formerly related to chronic fatigue in Spanish Fibromyalgia patients. *Virol J.* 2013 Nov 11;10(1):332. [Epub ahead of print]PubMed PMID: 24216038.

Last Updated January 21, 2014

ALL RECIPIENTS OF THIS MATERIAL MUST COMPLY WITH ALL APPLICABLE BIOLOGICAL, CHEMICAL, AND/OR RADIOCHEMICAL SAFETY STANDARDS INCLUDING SPECIAL PRACTICES, EQUIPMENT, FACILITIES, AND REGULATIONS. NOT FOR USE IN HUMANS.

