

PROTEA biopharma
Conferencia de prensa
Hotel Ritz, Londres, jueves 28 de mayo de 2009

**Estudio del origen de la
Encefalomiелitis miálgica:
Disfunción gastrointestinal, producción de neurotoxinas y exposición al medio**

Prof. Kenny De Meirleir, Doctor en Medicina
Chris Roelant, Doctor
Marc Frémont, Doctor





Encefalomielitis miálgica: Una enfermedad debilitante de elevada prevalencia

- Agotamiento persistente y debilitante asociado a numerosos síntomas físicos y neurocognitivos
- La gravedad de la enfermedad puede oscilar entre moderada y extremadamente grave: pacientes postrados en la cama durante años, con dependencia total de un cuidador
-
- Prevalencia estimada: del 0,3 al 0,6%; un millón de pacientes en los EEUU, dos millones de pacientes en Europa
- Esto puede ser solo la punta del iceberg
-
- Elevado coste socio-económico
- Se calcula que los gastos para la sociedad sean aproximadamente de 16.000 millones de Dólares en los EEUU, 20.000 millones de Euros en Europa



Trastornos intestinales en pacientes de EM

- Los pacientes normalmente presentan múltiples síntomas intestinales entre los que se encuentran:

Náuseas

Dolor abdominal

Falta de apetito

Motilidad intestinal anormal

Reflujo gástrico

Meteorismo

- Inflamación del tracto gastrointestinal
- Alteración acusada de la flora microbiana intestinal



Alteraciones de la población microbiana intestinal (aerobios)

- Especies de *Enterococcus* y *Streptococcus* están muy presentes en los pacientes de EM:

Organismos	Control	Pacientes de EM	Valor <i>p</i>
<i>E.coli</i>	$1,0 \times 10^8$	$4,26 \times 10^7$	$p = 0,98$
Subespecies de <i>Enterococcus</i>	$5,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$	$p < 0,001$
Subespecies de <i>Streptococcus</i>	$8,9 \times 10^4$	$9,8 \times 10^7$	$p > 0,001$

Henry Butt, Universidad de Melbourne



Alteraciones de la población microbiana intestinal (anaerobios)

- Dentro de las bacterias anaerobias, *Prevotella* es la que de forma sistemática está más presente:

Organismos	Control	Pacientes de EM	Valor <i>p</i>
Subespecies de <i>Bacteroids</i>	$3,2 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{11}$	$p = 0,39$
Subespecies de <i>Prevotella</i>	$1,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^9$	$p < 0,001$
Subespecies de <i>Bifidobacterium</i>	$6,0 \times 10^8$	$5,5 \times 10^9$	$p = 0,001$
Subespecies de <i>Lactobacillus</i>	$2,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$p = 0,002$

Henry Butt, Universidad de Melbourne



PROTEA
biopharma

Relación entre los niveles bacteriológicos y la gravedad de los síntomas

- La cantidad de subespecies de *Enterococcus* está relacionada con la expresión sintomática:

Síntomas	Valores r y p
Dolor de cabeza	$r = .17$ $p < 0,01$
Dolor de brazos	$r = .20$ $p < 0,003$
Dolor de hombros	$r = .15$ $p < 0,04$
Mialgia	$r = .20$ $p < 0,003$
Palpitaciones	$r = .16$ $p < 0,02$
Trastornos de sueño	$r = .20$ $p < 0,004$

Henry Butt, Universidad de Melbourne

Relación entre los niveles bacteriológicos y la gravedad de los síntomas

- La cantidad de subespecies de *Streptococcus* está relacionada con la expresión sintomática:

Síntomas	Valores r y p
Fatiga tras un esfuerzo extremo	r =.15 p < 0,03
Fotofobia	r =.14 p < 0,04
Pérdidas de memoria	r =.17 p < 0,01
Linfodinia de la glándula cervical	r =.14 p < 0,04
Palpitaciones	r =.15 p < 0,03
Mareos/desmayos	r =.14 p < 0,05



Sulfuro de hidrógeno producido por la bacteria se convierte en una poderosa toxina para el cuerpo

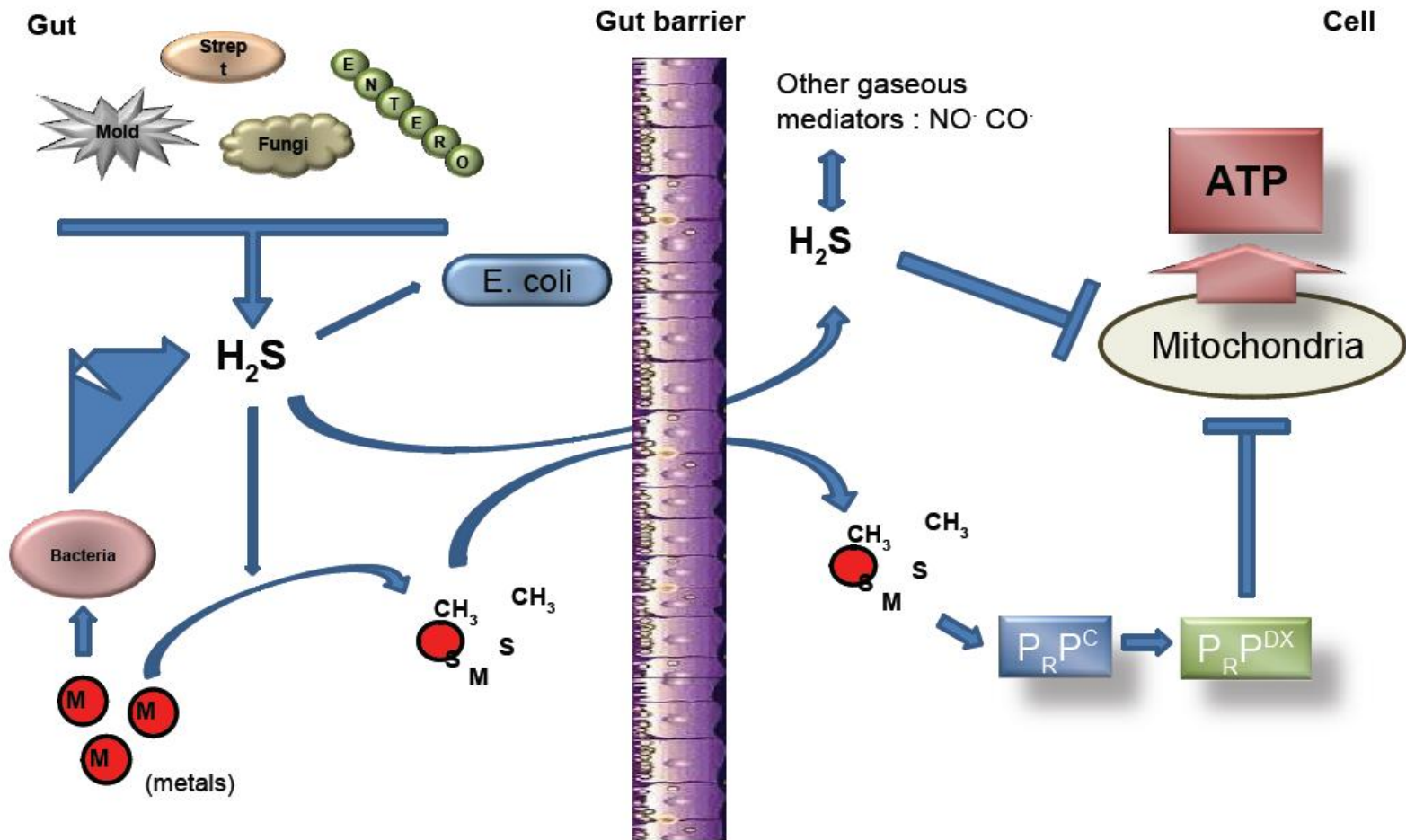
- El sulfuro de hidrógeno (H_2S) tiene funciones psicológicas importantes...
- Las células producen H_2S que es una molécula gaseosa importante implicada en la regulación de la presión sanguínea, la neurotransmisión, la relajación muscular y la regulación de inflamaciones
- Pero la exposición exógena puede ser extremadamente tóxica
- Los *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Prevotella* producen grandes cantidades de H_2S
- En exceso, el H_2S actúa como un veneno mitocondrial. Puede inhibir directamente a las enzimas implicadas en la producción celular de energía. Asimismo, el H_2S interfiere en el transporte de oxígeno bloqueando la hemoglobina en las células rojas.

Los *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Prevotella* producen grandes cantidades de H_2S



PROTEA
biopharma

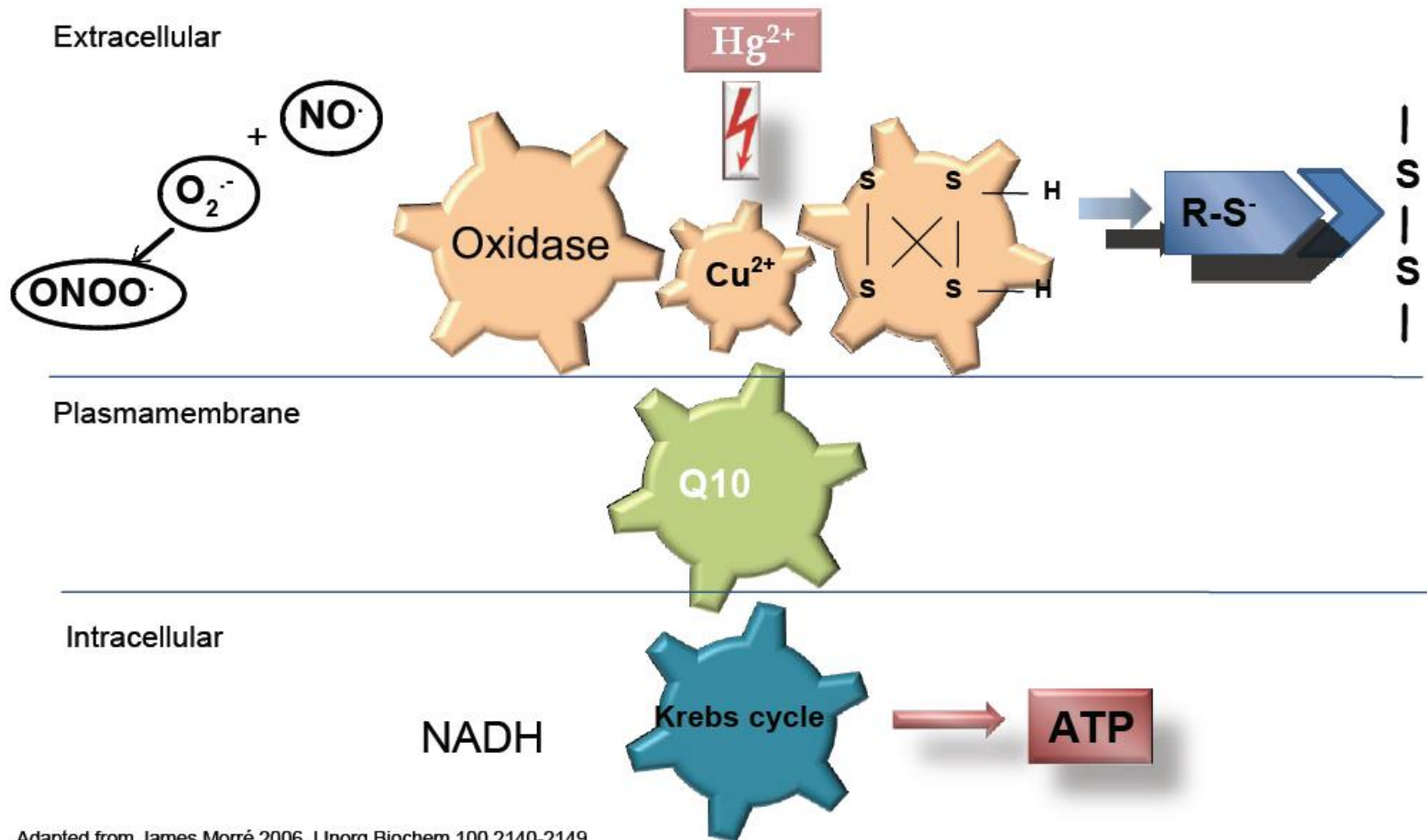
Efectos de la acumulación de H_2S y metales pesados





PROTEA
biopharma

Los metales pesados interfieren directamente en la producción de energía

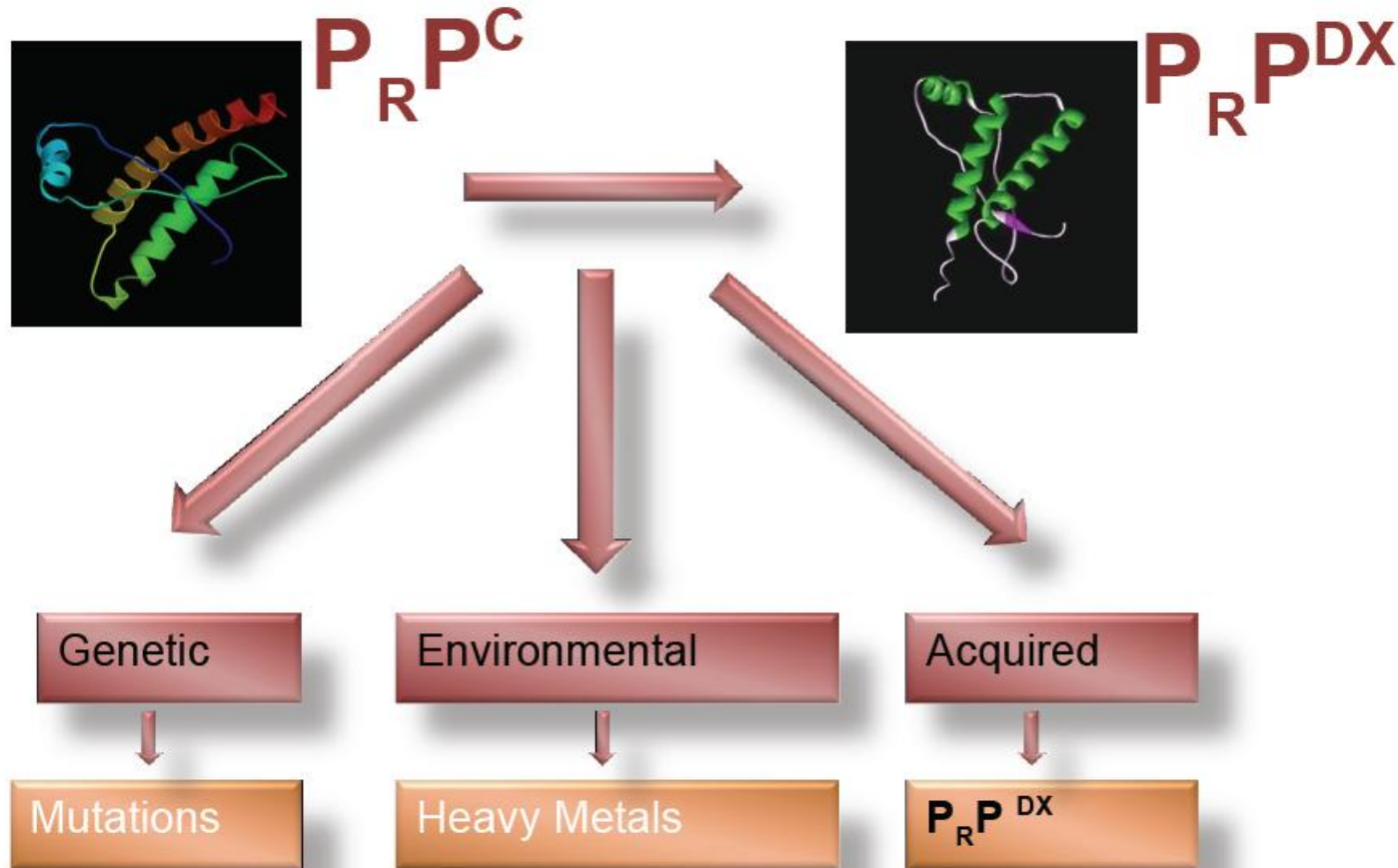


Adapted from James Morré 2006 J Inorg Biochem 100 2140-2149

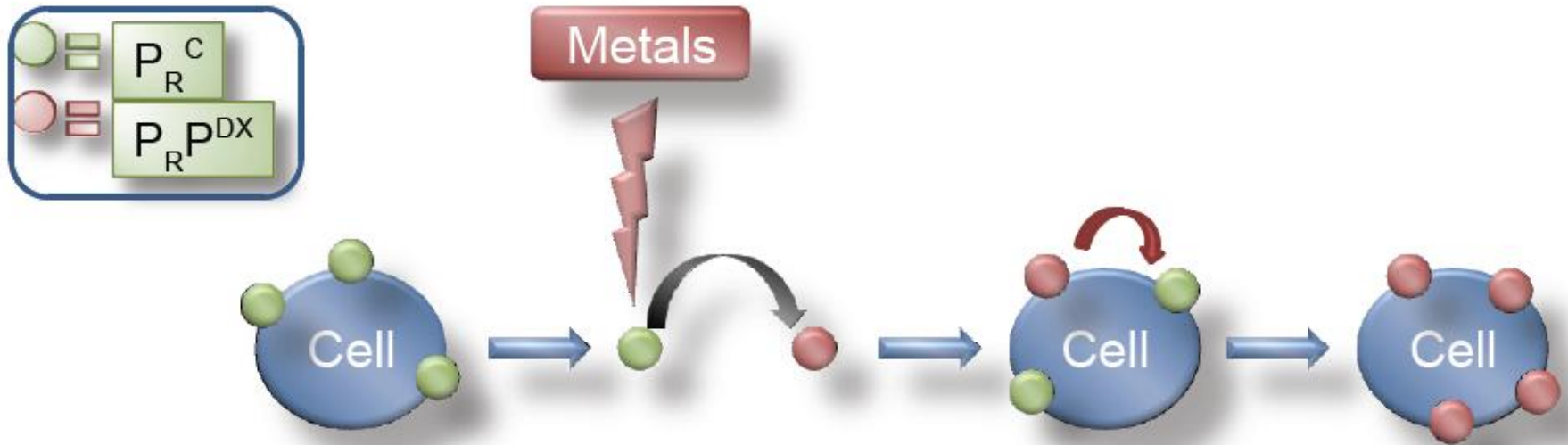


PROTEA
biopharma

Factores genéticos y del medioambiente contribuyen a la conformación anormal de proteínas



La conformación anormal puede ser transmitida de una célula a otra





PROTEA
biopharma

La gravedad de la EM se asocia a diferentes disfunciones psicológicas

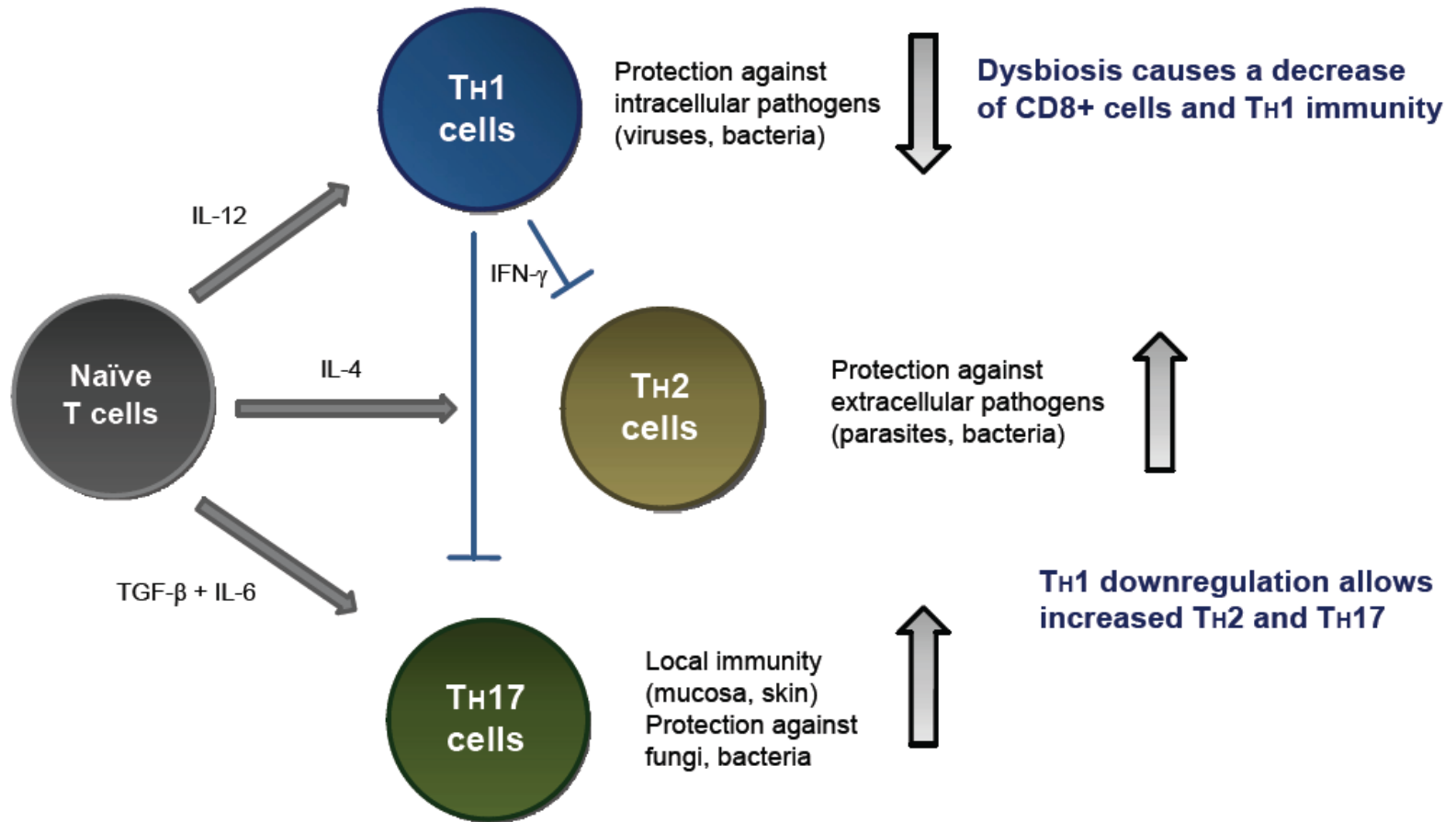
	I «Pre-EM»	II Enfermedad moderada	III Enfermedad grave
Disfunciones	Análisis de heces anormal, nivel alto de H ₂ S	Análisis de heces anormal, nivel alto de H ₂ S, exposición a metales pesados	Análisis de heces anormal, nivel alto de H ₂ S. exposición a metales pesados que provocan una conformación anormal de proteínas
Síntomas	No hay cansancio, posibles síntomas intestinales. Nivel bajo de VO ₂ , recuperación lenta. Puede no mostrar síntomas.	Fatiga, síntomas gastrointestinales	Fatiga aguda, múltiples síntomas
Tratamiento	Regeneración del intestino: probióticos	Regeneración del intestino: probióticos, antibióticos recubiertos. Quelación metálica, suplemento de zinc	Difícil. Regeneración del intestino, quelación metálica. Tratamiento de las disfunciones asociadas (infecciones oportunistas). El tratamiento está todavía en fase experimental

Aumento de las disfunciones inmunológicas (depresión de las células T y NK, activación de Th17, infecciones oportunistas...)



PROTEA
biopharma

Alteraciones inmunológicas que resultan de la disfunción intestinal





Consecuencias de una inmunidad alterada

- La disminución de TH1 favorece el desarrollo de infecciones víricas oportunistas. Enterovirus HHV-6, Epstein-Barr, parvovirus B19 están presentes en pacientes de EM. La mucosa gastrointestinal es un sitio de infección
- El aumento de TH2 favorece el desarrollo de alergias
- El aumento de TH17 provoca inflamación, autoinmunidad, blood-brain barrier disruption

In vivo 23:209.214 (2009)

Detección de Herpesvirus y Parvovirus B19 en la mucosa gástrica e intestinal de pacientes del Síndrome de Fatiga Crónica

MARC FRÉMONT, KRISTINE METZGER, HAMADA RADY, JAN HULSTAERT Y KENNY DE MEIRLEIR

Los antecedentes genéticos están relacionados con la regulación hacia arriba de TH17
Polimorfismos de los genes IL-17F, IL-6, TLR4, TGF- β están asociados con la EM y otras enfermedades intestinales (Enfermedad de Crohn, UC, IBS)



Evaluación del paciente

- Análisis de orina para valores asociados con la producción de H_2S
- Evaluación de la microflora intestinal
- Análisis de metales pesados
- Presencia de proteínas con conformación anormal
- Ensayo para evaluar las consecuentes disfunciones inmunológicas (alteraciones inmunológicas, infecciones oportunistas...)



PROTEA
biopharma

Los valores asociados a la producción de H_2S pueden medirse mediante un simple análisis de orina

1. Recoger la orina



2. Abrir el tubo que contiene el reactivo de la prueba



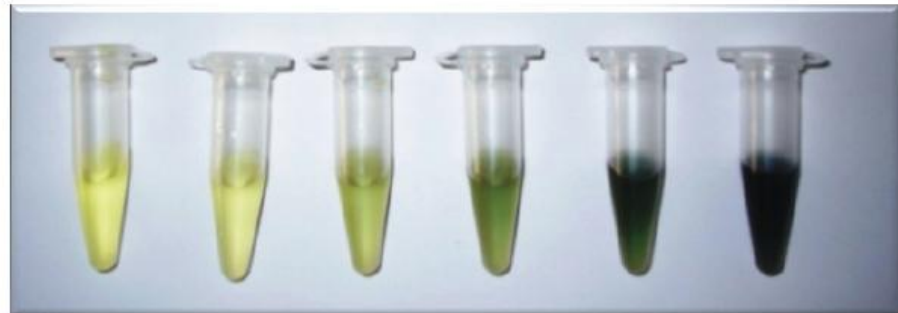
3. Añadir unas gotas de orina al reactivo de la prueba



4. Mezclar agitando suavemente. Esperar dos minutos



5. Observe los cambios de color. Color oscuro = muestra positiva



Negativo o
Pre-EM

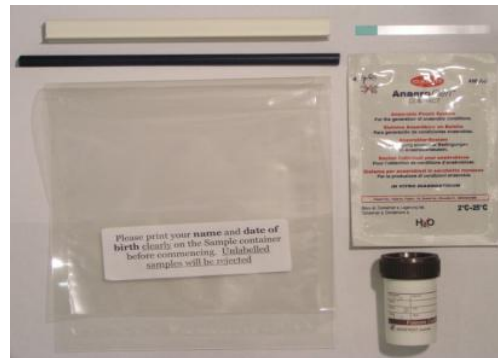
Enfermedad
moderada

Enfermedad
grave



Un ensayo microbiológico específico puede determinar la población de microflora intestinal

- Investigación de la flora microbial del tracto intestinal
 - Cuantificación de los principales grupos de bacterias aerobias y anaerobias y levadura
 - Se centra en la disbiosis (desequilibrio del ecosistema intestinal) en vez de en el análisis digestivo para determinar la integridad del intestino
-
- Reto: mantener viables las bacterias anaeróbicas para su análisis
 - Serán válidas si se transportan sin oxígeno y con una temperatura controlada



Ensayo microbiológico: ejemplo de resultados

- El paciente presenta un aumento de *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Prevotella*

Faecal Microbial Analysis

Patient ID: 510284 DOB: 31/10/1940 Gender: Female
 Phone (H): (W):
 Name: Denise Tuerlinckx
 Address: Eggersberg 1A
 Scherpenheuvel 03270
 Belgium

Referred by: Kenny De Meirleir, Physician

Diagnosis or Comments:

Collection Date: 29/04/2009 Receipt Date: 29/04/2009 Entry Date: 29/04/2009 Sample ID: M990236

R.E.D. Laboratories N.V./S.A.
 Z.1 Researchpark 100
 D-1731 Zellik
 Belgium
 Phone: +32-(0)2-461-5310
 Fax: +32-(0)2-461-5311

Total Counts

cfu/gm	Lo	Hi	Normal Range
Total Bacterial Count	1.4E+10		(1.0E+9 - 1.0E+12)
Aerobe : Anaerobe Ratio	7.8E+03		(1.0 - 2.0) = (Aerobe count/Anaerobe count) x 1000

Aerobic Bacteria

cfu/gm	Lo	Hi	Normal Range
Total Aerobe Count	9.7E+07		(1.0E+7 - 1.0E+8)
<i>Escherichia coli</i>	1.0E+07		(7.0E+6 - 9.0E+7)
<i>Salmonella</i> sp.	0.0E+00		(1.0E+6)
<i>Staphylococcus</i> spp.	0.0E+00		(1.0E+5)
<i>Enterococcus</i> spp.	0.0E+00		(1.0E+5)

Anaerobes

cfu/gm	Lo	Hi	Normal Range
Total Anaerobe Count	1.4E+13		(1.0E+9 - 1.0E+12)
<i>Bacteroides fragilis</i> spp.	5.0E+08		(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Bacteroides urealyticus</i> spp.	5.0E+08		(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Prevotella</i> spp.	5.0E+08		(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Porphyromonas</i> spp.	1.5E+09		(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Eubacterium</i>	5.0E+09		(9.0E+7 - 9.3E+11)

Yeasts

None Isolated 0.0E+00 (1.0E+4 cfu/g)

Total Counts		cfu/gm	Lo	Hi	Normal Range
Total Bacterial Count		1.4E+10			(1.0E+9 - 1.0E+12)
Aerobe : Anaerobe Ratio		7.8E+03			(1.0 - 2.0) = (Aerobe count/Anaerobe count) x 1000
Anaerobes		Total Count	Lo	Hi	Normal range
Total Bacteroides		5.0E+08			(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Bacteroides fragilis</i> spp.*		5.0E+08			(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Bacteroides urealyticus</i> spp.*		5.0E+08			(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Prevotella</i> spp.*		5.0E+08			(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Porphyromonas</i> spp.*		1.5E+09			(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Eubacterium</i>		5.0E+09			(9.0E+7 - 9.3E+11)
<i>Bifidobacterium</i> *		3.0E+08			(5.0E+6 - 5.0E+8)
<i>Lactobacillus</i> *		0.0E+00			(5.0E+5 - 1.0E+7)
Total Clostridium		0.0E+00			(1.0E+5 - 1.0E+8)
<i>Clostridium</i> spp.		0.0E+00			(1.0E+5 - 1.0E+8)
Total Peptostreptococcus		0.0E+00			(1.0E+5 - 1.0E+8)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.		0.0E+00			(1.0E+5 - 1.0E+8)

Análisis de metales pesados: ejemplo de resultados

El paciente presenta intoxicación de mercurio y níquel

MICRO TRACE MINERALS GmbH environmental & clinical laboratory
 Rohrenstrasse 20 D-91217 Hersbruck Telefon: +49 (0) 9151 4332
 USA, P.O.Box 4913, Boulder, Co 80306-4913 Telefax: +49 (0) 9151 2306
<http://www.microtrace.de>
service@microtrace.de

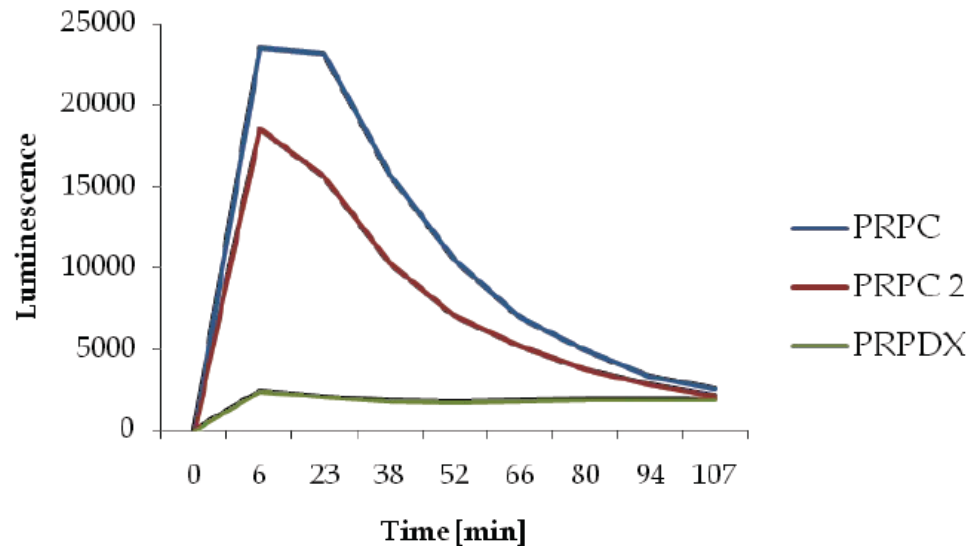
Lab Number: IUR92853

MINERAL ANALYSIS		Urine	
Doctor	Prof. Dr. K. De Meirleir		
Patient Name	Sofie de Middelste		
Clinical Information	post 250mg SmI DMPS+150ml NaCl 0.3% 2hr		
Test Date	20. Mai 09	D.O.B.	31.12.1987
		Sex	f
		Creatinine (g/l)	0.3
Essential Macro- & Trace Elements (mg/g creatinine)			
	Acceptable Range	Test Value	
Calcium	55.00 -- 245.00	137.05	*****
Magnesium	12.00 -- 150.00	89.75	*****
Zinc	0.07 -- 7.00	3.64	*****
Essential Trace Elements (mcg/g Creatinine)			
	Acceptable Range	Test Value	
Chromium	0.10 -- 3.50	0.00	Low <
Cobalt	< 5.00	0.97	*****
Copper	1.45 -- 60.00	651.86	High *****
Iron	2.00 -- 95.00	12.34	*****
Manganese	< 4.50	2.95	*****
Molybdenum	9.70 -- 100.00	13.03	*****
Selenium	12.00 -- 90.00	10.24	Low *****
Vanadium	< 70.00	0.24	*****
Potentially Toxic Elements in mcg/g Creatinine			
	Acceptable Range	Test Value	
Aluminum	< 125.00	19.75	*****
Arsenic	< 15.00	7.67	*****
Barium	< 8.22	1.04	*****
Beryllium	< 1.20	0.94	*****
Cadmium	< 1.50	0.13	<
Lead	< 5.00	4.88	*****
Mercury	< 1.00	16.56	High *****
Nickel	< 3.00	27.69	High *****
Silver	< 1.40	1.47	High *****
Tin	< 5.00	3.23	*****

* The 95percentile Rauges represent baseline urine values and are calculated on the creatinine value. The utilized

Ensayo de la conformación anormal de proteínas

Respuesta anormal a la luz indica una conformación anormal





Conclusiones

- Las disfunciones gastrointestinales tienen un papel central en la patogénesis de la EM
- Efecto perjudicial de la disbiosis a través del aumento de la producción de H_2S
- Disfunciones inmunológicas e infecciones oportunistas surgen como consecuencia de problemas intestinales anteriores
- Una vez establecidas, las infecciones contribuirán al mantenimiento o agravamiento de la enfermedad



Menciones

- Henry Butt y el Instituto Bio21, Universidad de Melbourne
- Marian Dix Lemle, Investigadora independiente, Washington DC
Med Hypotheses. 2009 Jan;72(1):108-9. Epub 2008 Sep 16. Hypothesis: chronic fatigue syndrome is caused by dysregulation of hydrogen sulfide metabolism. Lemle MD.