



**UNIVERSITA' DI PISA**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

*Tesi di Laurea Specialistica*

***Miopatie Mitocondriali e Stress Ossidativo.  
Uno Studio in Doppio Cieco e Cross Over con  
un Integratore Donatore di Cisteina.***

**Candidato: Daniele ORSUCCI**

**Relatore: Chiar.mo Prof. Gabriele SICILIANO**

Anno Accademico 2007/2008

# INDICE

<b>1.</b>	<b>RIASSUNTO DELLA TESI.....</b>	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>6</b>
2.1.	I mitocondri e la fosforilazione ossidativa.....	6
2.2.	Il DNA mitocondriale.....	9
2.3.	Le malattie mitocondriali: generalità .....	12
2.4.	Classificazione della malattie mitocondriali .....	15
2.5.	Approccio diagnostico.....	19
2.5.1.	<i>Marcatore solubili a riposo</i> .....	20
2.5.2.	<i>Test da sforzo</i> .....	21
2.5.3.	<i>Studi biomolecolari su cellule circolanti</i> .....	22
2.5.4.	<i>Tecniche di imaging</i> .....	22
2.5.5.	<i>Biopsia muscolare</i> .....	23
2.6.	Approcci terapeutici .....	26
2.7.	Disfunzione mitocondriale, stress ossidativo e apoptosi .....	28
<b>3.</b>	<b>OBIETTIVI E DISEGNO DELLO STUDIO.....</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>37</b>
4.1.	Soggetti in studio.....	37
4.2.	Valutazione clinica, test da sforzo e prelievi ematici .....	40
4.3.	Dosaggi biochimici .....	41
4.3.1.	<i>Determinazione dell'acido lattico</i> .....	41
4.3.2.	<i>Determinazione del glutatione totale</i> .....	41
4.3.3.	<i>Determinazione dell'attività ferro riducente plasmatica</i> .....	42

4.3.4.	<i>Determinazione dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine</i> .....	43
4.4.	Terapia .....	44
4.5.	Analisi statistica .....	46
<b>5.</b>	<b>RISULTATI</b> .....	<b>47</b>
5.1.	Determinazioni iniziali (T <sub>0</sub> ) .....	47
5.1.1.	<i>Acido lattico</i> .....	48
5.1.2.	<i>Glutazione totale</i> .....	48
5.1.3.	<i>Attività ferro riducente plasmatica</i> .....	50
5.1.4.	<i>Prodotti di ossidazione avanzata delle proteine</i> .....	53
5.2.	Determinazioni dopo trattamento (T <sub>1</sub> e T <sub>2</sub> ).....	54
5.2.1.	<i>Scale di forza muscolare (MRC) e qualità della vita (SF-36)</i> .....	54
5.2.2.	<i>Acido lattico</i> .....	54
5.2.3.	<i>Glutazione totale</i> .....	55
5.2.4.	<i>Attività ferro riducente plasmatica</i> .....	56
5.2.5.	<i>Prodotti di ossidazione avanzata delle proteine</i> .....	57
5.3.	Eventi avversi .....	58
<b>6.</b>	<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONE</b> .....	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>ABBREVIAZIONI</b> .....	<b>64</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>65</b>

# 1. RIASSUNTO DELLA TESI

*Introduzione.* Le miopatie mitocondriali (MM) sono patologie ereditarie o sporadiche, caratterizzate da alterazione della catena respiratoria del mitocondrio. Il trattamento di questo gruppo di malattie non è attualmente ben definito. L'alterato funzionamento della fosforilazione ossidativa ha come conseguenze un deficit energetico, incremento dei livelli di acido lattico sia a riposo che durante l'esercizio fisico, e aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno. Sono ben noti gli stretti rapporti a "feedback" positivo che intercorrono fra disfunzione mitocondriale e stress ossidativo; questo circolo vizioso potrebbe rappresentare un fattore di progressione nelle MM. A tale proposito, è stata dimostrata una riduzione dei livelli di glutathione (GSH), molecola antiossidante, nei muscoli scheletrici di pazienti affetti da malattie mitocondriali. La disponibilità intracellulare di cisteina sembra essere un importante fattore limitante la sintesi del GSH. Sulla base di tali osservazioni, l'utilizzo di preparati donatori di cisteina potrebbe avere valenza terapeutica.

*Obiettivi.* Obiettivi del presente studio sono: confermare l'ipotesi dello stress ossidativo nelle MM, anche in relazione alle condizioni cliniche dei pazienti; verificare l'efficacia, in termini di forza muscolare e qualità della vita, di un integratore proteico donatore di cisteina; valutare l'attività antiossidante di tale integratore nelle MM.

*Disegno dello studio.* È stato effettuato uno studio clinico in doppio cieco e cross-over. Sono stati arruolati tredici pazienti affetti da MM (di cui undici hanno

portato a termine lo studio), trattati con 10 g al giorno di integratore o placebo (caseina) per 30 giorni. Dopo il primo mese di terapia, i due gruppi sono stati invertiti per i 30 giorni successivi. All'inizio, dopo il primo e dopo il secondo mese sono state effettuate le seguenti valutazioni: scala Medical Research Council (forza muscolare), questionario sulla qualità della vita (SF-36), determinazione ematica dell'acido lattico e dei parametri relativi all'equilibrio proossidanti (prodotti di ossidazione avanzata delle proteine)/antiossidanti (GSH, attività ferro riducente plasmatica), AST, ALT, creatinina (per escludere l'esistenza di controindicazioni all'integratore). Otto degli undici pazienti sono stati inoltre sottoposti a test da sforzo aerobico incrementale su cicloergometro (con determinazione dell'acido lattico e dei parametri già citati di stress ossidativo), durante ognuna delle tre visite.

*Risultati.* È stata osservata una correlazione statisticamente significativa fra i parametri di stress ossidativo e le condizioni cliniche basali dei soggetti in studio. L'integratore proteico utilizzato non ha avuto un significativo effetto su forza muscolare e qualità della vita, ma ha significativamente ridotto i livelli di stress ossidativo.

*Conclusione.* In base alle nostre osservazioni, l'ipotesi dello stress ossidativo nelle MM sembra confermata, così come l'attività antiossidante dell'integratore utilizzato. Il fatto che questo non si sia tradotto in un miglioramento clinico apprezzabile può essere dovuto alla breve durata dello studio, anche in considerazione della cronicità e della lenta evolutività di queste malattie. Il circolo vizioso fra disfunzione mitocondriale e stress ossidativo può essere un promettente bersaglio per futuri trattamenti.

## 2. INTRODUZIONE

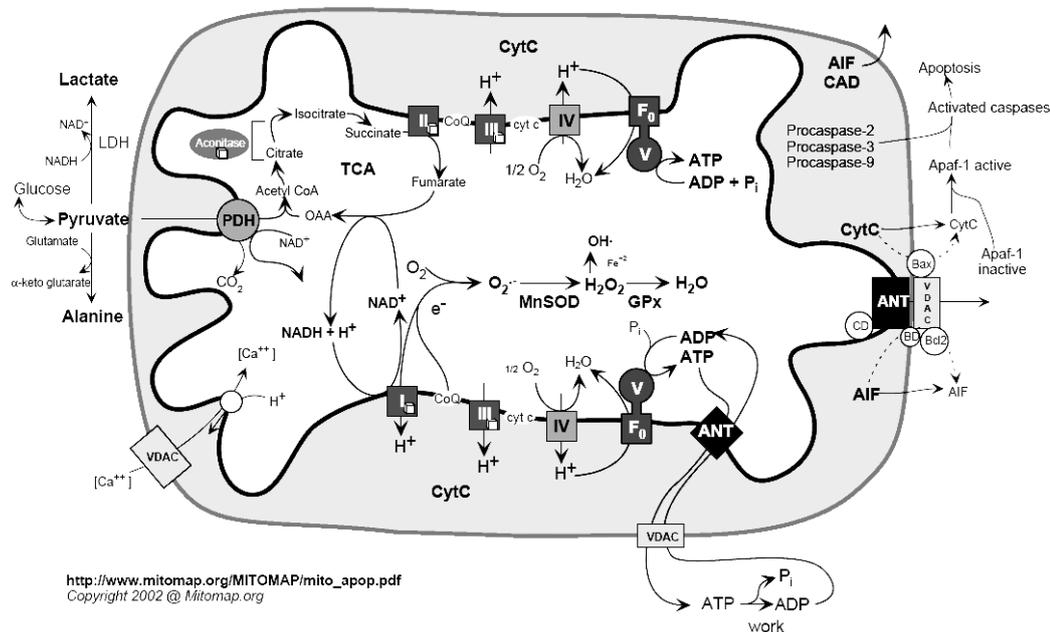
### 2.1. I mitocondri e la fosforilazione ossidativa

In origine le cellule eucariote primordiali erano prive della capacità di utilizzare l'ossigeno ( $O_2$ ) a fini metabolici. Più di un miliardo di anni fa furono colonizzate da batteri aerobi, che, coevolvendo insieme alle cellule ospiti, divennero quegli organelli intracellulari che oggi chiamiamo mitocondri. Questa alleanza simbiotica ha facilitato i batteri aerobi colonizzatori dal punto di vista della ricerca di substrati metabolici, demandata ora alla cellula ospite, e contemporaneamente ha apportato un nuovo tipo di metabolismo, molto più efficiente, agli eucarioti: il metabolismo aerobico, o ossidativo. La glicolisi anaerobia consente di ottenere solo quattro molecole di adenosina trifosfato (ATP) ad “alta energia” per ogni molecola di glucosio consumata; questa cifra sale a circa 30 nel metabolismo ossidativo (DiMauro & Schon 2003).

I mitocondri hanno diverse funzioni, fra cui il metabolismo di aminoacidi, acidi grassi ( $\beta$ -ossidazione) e steroidi, la gluconeogenesi, la biosintesi di pirimidine, aminoacidi, fosfolipidi, nucleotidi ed eme, l'ossidazione del piruvato ed il ciclo di Krebs (ciclo dell'acido citrico), l'omeostasi del calcio, la regolazione dello stato ossidoriduttivo intracellulare, l'induzione dell'apoptosi, ma soprattutto la generazione di ATP tramite la fosforilazione ossidativa (Figura 1). La fosforilazione ossidativa è il processo biochimico ad alta efficienza tramite il quale viene prodotto ATP, grazie all'energia progressivamente liberata dagli elettroni lungo la “catena di trasporto degli elettroni” (ETC). Infine gli elettroni

sono accettati dall'O<sub>2</sub>, che si combina con i protoni (H<sup>+</sup>) per formare acqua. La ETC consiste di cinque complessi proteici multimerici localizzati a livello della membrana mitocondriale interna, e richiede anche due piccoli trasportatori di elettroni, il coenzima Q10 (CoQ10) e il citocromo *c* (cyt *c*). Essa genera un gradiente elettrochimico di ioni H<sup>+</sup> a cavallo della membrana mitocondriale interna; il flusso retrogrado degli H<sup>+</sup> attraverso il Complesso V avviene a favore di corrente (è perciò associato a liberazione di energia), ed è accoppiato alla sintesi di ATP a partire da adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorganico (Pi) (DiMauro & Schon 2003).

Dall'interno all'esterno, i mitocondri sono costituiti da una membrana esterna di origine "cellulare", uno spazio intermembrana, una membrana interna di origine "batterica" composta prevalentemente da cardiolipina, ed una matrice interna, contenente il DNA mitocondriale (mtDNA) (vedi Figura 1).



**Figura 1. Bioenergetica mitocondriale.** Rappresentazione schematica del mitocondrio, raffigurante la correlazione esistente fra produzione di energia (TCA, catena di trasporto degli elettroni), produzione di specie reattive dell'ossigeno (superossido  $O_2^{\cdot-}$ , idrossile  $OH^{\cdot}$ ), regolazione dell'apoptosi. CytC (via Apaf-1, caspasi, CAD) e AIF, quando rilasciati nel citoplasma, innescano la morte cellulare programmata; Bax e Bcl-2 sono fattori citoplasmatici rispettivamente pro- ed antiapoptotici. I, II, III, IV, F<sub>0</sub>V, rispettivi complessi della catena respiratoria; ADP, ATP, rispettivamente adenosina di- e trifosfato; AIF, fattore inducente l'apoptosi; ANT, traslocatore del nucleotide adenina; CAD, DNasi attivata da caspasi; CytC, citocromo c; CoQ, coenzima Q10; GPx, glutatione perossidasi; LDH, lattico deidrogenasi; MnSOD, manganese superossido dismutasi; NAD<sup>+</sup>/NADH nicotinammide adenina dinucleotide ossidato/ridotto; OAA, acido ossalacetico; PDH, piruvato deidrogenasi; P<sub>i</sub>, fosfato inorganico; TCA, ciclo degli acidi tricarbossilici; VDAC, canale anionico voltaggio-dipendente. (Da MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2008. Riproduzione consentita)

## 2.2. Il DNA mitocondriale

Il mitocondrio è l'unico organello delle cellule animali dotato di un proprio genoma. In ogni mitocondrio si trovano da due a dieci copie di mtDNA, ed in ogni cellula più di mille copie ("poliplasmia"). La struttura e il funzionamento del mtDNA sono diversi da quelli del DNA nucleare (nDNA), mentre sono più simili a quelli dei cromosomi batterici.

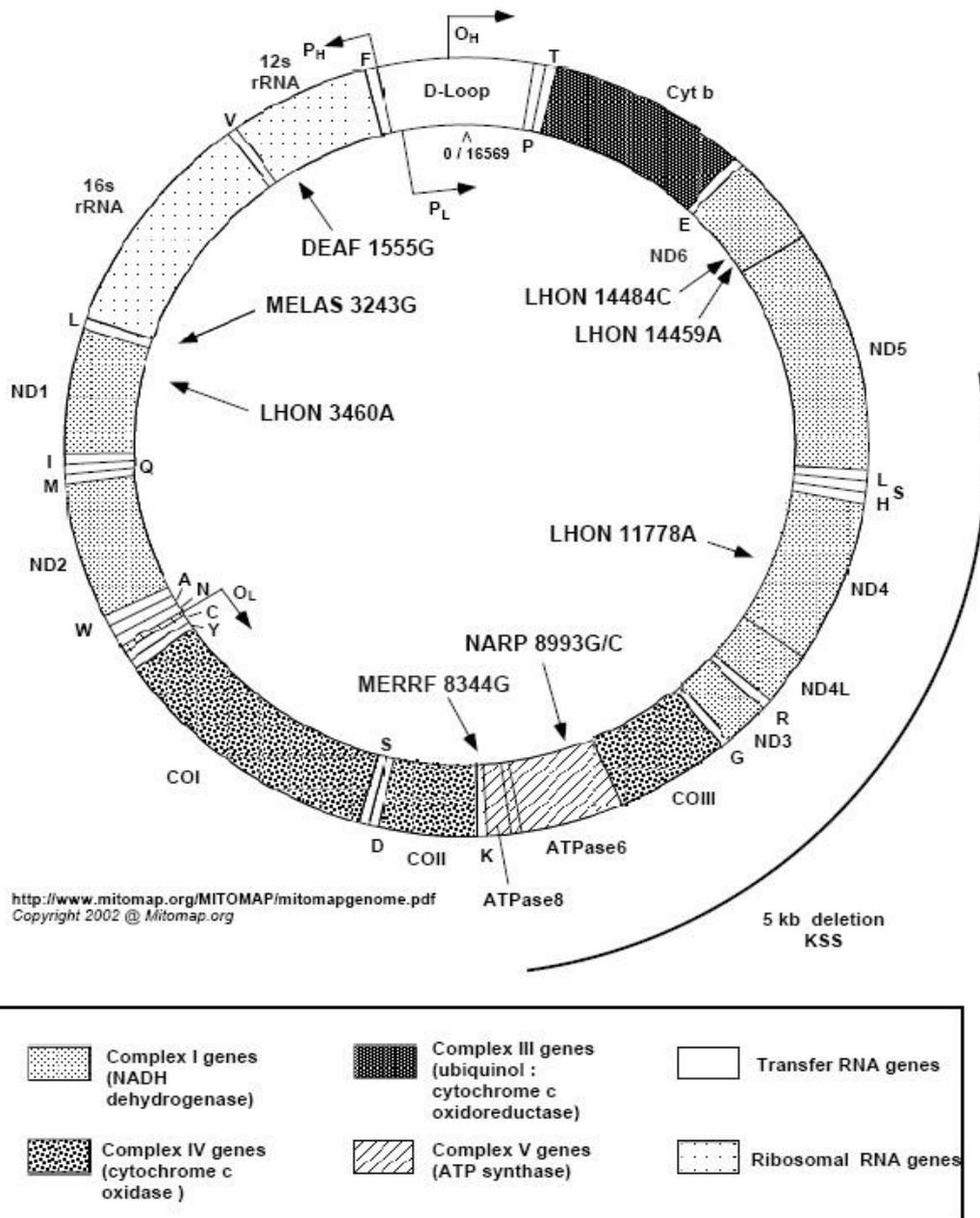
Il mtDNA è una molecola circolare di DNA a doppio filamento (tranne un tratto di tripla elica, il D-loop), costituito da 16569 paia basi (Figura 2). Il filamento pesante (H, da heavy), ricco in guanine, codifica 28 geni; quello leggero (L, da light), ricco in citosine, codifica nove geni. Le due catene sono dapprima trascritte in due lunghi RNA, che solo in un secondo tempo vengono scissi nei trascritti individuali. Di questi 37 geni, 13 codificano peptidi della ETC. Tutte le altre proteine mitocondriali (comprese le 67 subunità che concorrono a formare i cinque complessi della ETC) sono codificate dal nDNA. Gli altri geni del mtDNA vengono trascritti in due RNA ribosomali e 22 RNA transfer (tRNA). Il D-loop, ottenuto dalla sintesi di un tratto aggiuntivo di mtDNA, non codifica geni ma contiene l'origine di replicazione e di trascrizione della molecola di DNA.

A differenza del nDNA, il mtDNA non contiene introni ed è codificante per il 93%. Mancando un sistema di riparazione adeguato, il mtDNA è molto sensibile ai fattori mutageni, come lo stress ossidativo (Mancuso et al 2005). Il tasso di insorgenza di nuove mutazioni è 10-100 volte maggiore rispetto a quello del nDNA.

Il mtDNA è ereditato per via materna. Il mtDNA degli spermatozoi viene degradato dopo la fecondazione. Solo eccezionalmente è stata riportata la trasmissione paterna di una mutazione del mtDNA (Schwartz & Vissing 2002).

Clusters di genomi mitocondriali definiti in base alla presenza di polimorfismi stabili definiscono gruppi di mtDNA evolutivamente correlati, chiamati aplogruppi mitocondriali.

Tutti i fattori implicati in mantenimento, replicazione ed espressione del mtDNA sono codificati a livello nucleare. Questo spiega l'esistenza delle malattie mitocondriali ad eredità autosomica (vedi oltre).



**Figura 2. Il genoma mitocondriale.** Sono rappresentate le più frequenti mutazioni patogenetiche, compresa la delezione singola su larga scala associata alla sindrome di Kearns-Sayre (KSS). DEAF, sordità da aminoglicosidi; LHON, neuropatia ottica ereditaria di Leber; MELAS, encefalomiopatia mitocondriale, lattico acidosi, episodi simili a stroke; MERRF, epilessia mioclonica con fibre “ragged red”; NARP, neuropatia, atassia, retinopatia pigmentosa. (Da MITOMAP. <http://www.mitomap.org>, 2008. Riproduzione consentita)

### **2.3. Le malattie mitocondriali: generalità**

Le malattie mitocondriali sono un gruppo di disturbi causati da alterazioni della catena respiratoria mitocondriale. Gli effetti delle mutazioni che colpiscono la ETC tendono ad essere multisistemici, coinvolgendo le vie visive e uditive, il cuore, il sistema nervoso centrale (SNC), le ghiandole endocrine ed il muscolo scheletrico. Si stima che il rischio di sviluppare una malattia mitocondriale sia di 1 su 5000 individui (Haas et al 2007; Schaefer et al 2008).

La classificazione genetica delle malattie mitocondriali distingue i disordini dovuti a difetti nel mtDNA da quelli dovuti ad alterazioni primitive del nDNA (vedi oltre).

Le mutazioni del mtDNA sono ereditate secondo le regole della genetica mitocondriale (eredità materna, segregazione mitotica, eteroplasmia ed effetto soglia). Quando tutte le copie di mtDNA in una cellula sono identiche si parla di “omoplasmia”, altrimenti di “eteroplasmia” (DiMauro & Schon 2003). L’eteroplasmia è una condizione frequente nelle malattie da alterazione del mtDNA. Il numero di genomi mutati in un certo tessuto deve raggiungere un livello minimo critico prima che il metabolismo ossidativo sia compromesso a sufficienza da determinare manifestazioni cliniche (“effetto soglia”). La soglia patogenetica è diversa da tessuto a tessuto, in relazione alla diversa dipendenza dal metabolismo aerobico. Differenze nel carico mutazionale, che potrebbe superare la soglia patogenetica in certi tessuti e non in altri, contribuiscono all’eterogeneità fenotipica di queste condizioni. Il carico mutazionale può variare nel tempo ed essere diverso nei diversi tessuti, ed è spesso più elevato nei tessuti

post-mitotici, come neuroni, muscolo striato, cuore, ghiandole endocrine (DiMauro & Schon 2003). Inoltre, proprio questi stessi tessuti necessitano di un'elevata produzione di ATP. Questi due motivi possono spiegare il loro frequente coinvolgimento nelle malattie mitocondriali.

Sul piano clinico, alla complessità della genetica mitocondriale fa riscontro un'estrema eterogeneità dei quadri clinici associati a difetti del mtDNA (DiMauro & Schon 2003). Una singola mutazione può esprimersi in maniera differente in differenti famiglie o in membri della stessa famiglia (variabilità inter- e intra-familiare) e, viceversa, differenti mutazioni possono produrre quadri clinici simili. Pazienti con miopatia ed encefalopatia mitocondriale possono presentare ptosi palpebrale e oftalmoplegia esterna progressiva (PEO), affaticabilità muscolare, oltre che tutta una serie di disturbi del sistema nervoso centrale: tra questi atassia, demenza, crisi epilettiche, retinopatia, ipoacusia neurosensoriale, episodi tipo stroke (DiMauro & Schon 2003). Sono noti altresì quadri di miopatia mitocondriale (MM) associati a episodi critici, soprattutto di natura mioclonica (MERRF, epilessia mioclonica con fibre "ragged red"), e di encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi tipo stroke (MELAS) (DiMauro & Schon 2003).

Negli anni recenti sono stati individuati numerosi geni nucleari che codificano diverse subunità della ETC, proteine mitocondriali coinvolte nell'assemblaggio dei peptidi di ciascun complesso respiratorio, e proteine coinvolte nella trascrizione e replicazione del mtDNA (DiMauro & Schon 2003). Mutazioni a carico di questi geni causano malattie mitocondriali che seguono le regole della genetica mendeliana, e che si traducono clinicamente in patologie più o meno

multisistemiche. Le alterazioni del nDNA che possono causare malattie mitocondriali sono di vario genere: mutazioni in componenti strutturali o proteine ancillari delle ETC, difetti della comunicazione intergenomica (associati a delezioni multiple o deplezione del mtDNA), difetti nel milieu lipidico di membrana, e mutazioni nella via biosintetica del CoQ10 (DiMauro & Schon 2003).

L'insorgenza di una delezione singola su larga scala, generalmente associata a PEO, è quasi sempre sporadica (Filosto & Mancuso 2007).

## 2.4. Classificazione delle malattie mitocondriali

Sul piano clinico, la più importante conseguenza della complessità e delle peculiari caratteristiche della genetica mitocondriale è l'estrema eterogeneità dei quadri clinici associati a difetti del mtDNA (Mancuso et al 2007a). Una singola mutazione può esprimersi con diversi fenotipi e, viceversa, differenti mutazioni possono esitare in quadri clinici simili. Alcune sindromi ben codificate (es. PEO, MELAS, MERRF) sono associate a mutazioni specifiche (DiMauro & Schon 2003). In molti casi tuttavia i fenotipi sono polimorfi, da forme puramente miopatiche a quadri clinici multisistemici, ed è difficile stabilire una precisa relazione genotipo/fenotipo.

Negli anni recenti l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sulle alterazioni genetiche del nDNA che possono alterare componenti strutturali mitocondriali da esso codificate, oppure compromettere la stabilità e la replicazione del mtDNA. Circa il 90% delle proteine mitocondriali correlate alla catena respiratoria è codificato da geni nucleari; tuttavia il numero di disordini mitocondriali causati da difetti nucleari geneticamente definiti rimane ancora limitato.

Ad oggi, la classificazione più utile delle malattie mitocondriali sembra quella genetica (Filosto & Mancuso 2007). Si distinguono due grandi gruppi nosologici sulla base della localizzazione del difetto genetico nel mtDNA (forme sporadiche o a trasmissione materna; Tabella 1) o nel nDNA (forme autosomiche; Tabella 2).

La più frequente fra le malattie mitocondriali è la PEO. La PEO è una MM caratterizzata da ptosi palpebrale bilaterale di solito ad esordio nell'adolescenza, seguita da limitazione nei movimenti dei muscoli extraoculari, fino a un quadro

(più o meno tardivo) di oftalmoplegia completa. Generalmente si associano ipostenia muscolare ed intolleranza all'esercizio fisico. Possono essere presenti inoltre segni di interessamento multisistemico (es. cardiomiopatia, cataratta, atassia cerebellare, retinopatia, ipoacusia neurosensoriale), ed in tal caso si parla di PEO plus (Filosto & Mancuso 2007).

La PEO è dovuta a delezioni o mutazioni puntiformi nel mtDNA. L'ereditarietà è variabile. La forma dovuta a delezioni può essere sporadica (per delezioni singole nel mtDNA verificatesi durante l'oogenesi o l'embriogenesi precoce) o ad ereditarietà mendeliana (autosomica recessiva o dominante: rispettivamente arPEO e adPEO), per mutazioni in geni nucleari codificanti proteine necessarie per il mantenimento della stabilità e dell'integrità del mtDNA o per la replicazione di questo. Le forme mendeliane in genere si associano a delezioni multiple del mtDNA. In particolare arPEO e adPEO sono dovute a mutazioni nei seguenti geni nucleari noti: *ANT-1* (traslocatore del nucleotide adenina, il cui prodotto forma un canale omodimerico nella membrana mitocondriale interna, necessario per regolare la concentrazione di adenina nella matrice mitocondriale), *C10orf2* (che codifica l'elicasi mitocondriale Twinkle), *POLG-1* e *POLG-2* (codificanti la polimerasi- $\gamma$  mitocondriale, complesso enzimatico eterodimerico). Le forme adPEO sono spesso caratterizzate da un quadro clinico caratterizzato principalmente da interessamento del solo muscolo scheletrico, mentre le forme arPEO sono più spesso multisistemiche (Filosto & Mancuso 2007). La forma dovuta a mutazioni puntiformi nel mtDNA (in particolare nei geni codificanti tRNA) segue un modello di ereditarietà materna. Raramente sono stati descritti casi sporadici (Filosto & Mancuso 2007).

<p><u>Riarrangiamenti sporadici</u></p> <p>Sindrome di Kearns-Sayre</p> <p>Sindrome di Pearson</p> <p>Oftalmoplegia esterna progressiva (PEO) sporadica</p> <p>Tubulopatia sporadica</p> <p>Diabete e Sordità</p>
<p><u>Mutazioni puntiformi sporadiche</u></p> <p>PEO</p> <p>MELAS</p> <p>Intolleranza all'esercizio fisico</p> <p>Miopia</p>
<p><u>Mutazioni puntiformi ereditate per via matrilineare</u></p> <p><b>Mutazioni puntiformi in geni codificanti proteine strutturali</b></p> <p>Neuropatia ereditaria di Leber</p> <p>Sindrome con neuropatia, atassia e retinite pigmentosa (NARP)</p> <p>Sindrome di Leigh</p> <p><b>Mutazioni puntiformi in geni codificanti tRNA</b></p> <p>MELAS</p> <p>Epilessia mioclonica con fibre "ragged red" (MERRF)</p> <p>Cardiopia e/o miopia dell'adulto a trasmissione materna (MIMyCa)</p> <p>PEO</p> <p>Miopia</p> <p>Diabete e sordità</p> <p>Sordità neurosensoriale non sindromica</p> <p>Cardiomiopia ipertrofica</p> <p><b>Mutazioni puntiformi in geni codificanti rRNA</b></p> <p>Sordità non sindromica indotta dagli aminoglicosidi</p> <p>Cardiomiopia ipertrofica</p>

**Tabella 1. Classificazione genetica delle malattie mitocondriali da disordini del genoma mitocondriale.** MELAS, encefalomiopia mitocondriale con lattico acidosi ed episodi stroke-like; rRNA, RNA ribosomali; tRNA, RNA transfer.

<u>Difetti di geni nucleari codificanti componenti strutturali dei complessi della catena respiratoria</u> Sindrome di Leigh Cardiomiopatia Paraganglioma Sindromi multisistemiche
<u>Difetti di geni nucleari codificanti fattori coinvolti nell'assemblaggio dei complessi della catena respiratoria (“assembly genes”)</u> Sindrome di Leigh Sindromi multisistemiche
<u>Difetti di geni che alterano la stabilità del mtDNA (o difetti di comunicazione intergenomica)</u> PEO autosomica (arPEO e adPEO) MNGIE Sindromi da deplezione del mtDNA
<u>Deficit di Coenzima Q10</u>

**Tabella 2. Classificazione genetica delle malattie mitocondriali da disordini del genoma nucleare.** MNGIE, encefalomiopatia mitocondriale neurogastrointestinale; PEO, oftalmoplegia esterna progressiva.

## **2.5. Approccio diagnostico**

Come in tutta la patologia neuromuscolare, il processo diagnostico ha inizio con l'anamnesi personale e familiare e con l'esame obiettivo neurologico (DiMauro et al 2004). Le "red flags" che inducono a prendere in considerazione una diagnosi di malattia mitocondriale sono bassa statura, ipoacusia neurosensoriale, ptosi palpebrale, oftalmoplegia, neuropatia assonale, diabete mellito, miopatia, cardiomiopatia ipertrofica, emicrania. Queste manifestazioni devono essere ricercate nel paziente e nei familiari (DiMauro et al 2004). Abbiamo già fatto cenno al controllo genetico duale della ETC. Un'ereditarietà di tipo materno suggerisce mutazioni del mtDNA, mentre una di tipo mendeliano suggerisce alterazioni delle proteine codificate dal nDNA (DiMauro et al 2004).

Attualmente, la diagnosi richiede un complesso approccio: misurazioni ematiche del lattato, elettromiografia, risonanza magnetica spettroscopica (MRS), biopsia muscolare con studi istologici e biochimici, e analisi genetiche. La creatina chinasi (CK) ematica, comune marcatore di patologia muscolare, è quasi sempre normale. Un sintomo comune di MM è l'intolleranza all'esercizio con algie muscolari, dovuta alla deficitaria produzione di energia nel muscolo scheletrico. Questo porta ad un'aumentata produzione di lattato, deplezione di fosfocreatina (PCr), aumentata generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Per questi motivi, i test da sforzo rimangono uno strumento particolarmente utile nella diagnostica delle MM (Siciliano et al 2007).

### *2.5.1. Marcatori solubili a riposo*

Nelle MM si ha un'alterazione della fosforilazione ossidativa, che determina un metabolismo aerobio difettoso. Per questo motivo, il metabolismo del tessuto muscolare diventa prevalentemente anaerobio, con aumentata produzione di acido lattico. La lattico acidosi è un reperto comune nelle malattie mitocondriali, ma può essere anche assente. L'iperlattacidemia è presente anche nei disordini della gluconeogenesi, come il deficit di piruvato deidrogenasi. Per distinguere le malattie mitocondriali da questa condizione può essere utile il rapporto molare lattato/piruvato, che nelle malattie mitocondriali tende a essere  $> 25$  (Debray et al 2007). Anche il livello serico di alcuni aminoacidi può essere utile, per es. nella diagnostica differenziale del neonato ipototonico. L'alanina non è aumentata nel neonato con iperlattacidemia transitoria in seguito a moderata ipossia perinatale, mentre è un marker sensibile di disfunzione mitocondriale (Morava et al 2006). Inoltre, nei pazienti MELAS la concentrazione di citrullina è inferiore rispetto ai controlli (in modo inversamente proporzionale ai livelli di arginina) (Naini et al 2005). Il lattato urinario non è un utile marcatore di MM, mentre il fumarato e il malato potrebbero essere utili per distinguere i pazienti con malattia mitocondriale ed organico aciduria da altri soggetti (Barshop 2004). In alcuni casi di sindrome di Leigh è stata osservata una persistente escrezione urinaria di acido 3-metilglutaconico (Wortmann et al 2006). In rari casi, la sindrome infantile da deplezione di mtDNA può essere associate a metilmalonico aciduria (Yano et al 2003).

### 2.5.2. Test da sforzo

Nei pazienti con MM la prova da sforzo deve stimolare il metabolismo aerobico, quello prevalentemente alterato. Il test deve essere eseguito a digiuno, e generalmente viene effettuato su una pedana mobile o su un cicloergometro (Siciliano et al 1999; Siciliano et al 2007).

I test da sforzo sono anche utilizzati come misura di outcome negli studi di intervento (es. CoQ10, creatina, allenamento aerobico) (Taivassalo et al 1996, 2003; Siciliano et al 2000). L'allenamento aerobico sembra anche ridurre i livelli circolanti dei marcatori di stress ossidativo (es. lipoperossidi) nei pazienti affetti da MM. In questi pazienti i livelli medi di lipoperossidi sono indicativi di un moderato stress ossidativo. Durante l'esercizio incrementale i lipoperossidi non aumentano ulteriormente, ma rimangono significativamente più elevati rispetto ai controlli. È stato osservato che, dopo un programma di allenamento aerobico della durata di 10 settimane, i lipoperossidi diminuiscono del 13,7% a riposo ( $P < 0,01$ ) e del 13,1%, 11,0% e 10,4% rispettivamente al 40% della potenza massima teorica normale (pnPOMax), al carico massimo effettivo, e 20 minuti dopo la fine dell'esercizio ( $P < 0.05$ ) (Siciliano et al 2007).

Uno strumento semplice e poco invasivo di screening per le MM è il test aerobico all'avambraccio (Meulemans et al 2007), ma un recente studio su 41 soggetti normali, 15 pazienti con MM e 20 con altre miopatie ha mostrato una sensibilità di solo il 20% ed una specificità del 95% nei confronti dei controlli sani; la specificità nei confronti dei soggetti affetti da altre miopatie scendeva al 75% (Hanish et al 2006). Il test ischemico all'avambraccio è più sensibile per la diagnosi di MM (Tarnopolsky et al 2003), ma meno specifico.

### *2.5.3. Studi biomolecolari su cellule circolanti*

Gli studi genetici su cellule ematiche sono più utili nelle malattie associate ad alterazioni del nDNA. Le mutazioni del mtDNA sono più facili da reperire nel tessuto muscolare. Mentre la più comune mutazione “MERRF” (A8344G) è quasi sempre rinvenibile nel sangue, le altre mutazioni dei tRNA si ritrovano solo a livelli molto bassi nelle cellule circolanti (DiMauro et al 2004). Altri materiali facilmente accessibili per gli studi genetici sono il sedimento urinario, la mucosa orale, i follicoli piliferi, i fibroblasti dermici (DiMauro et al 2004).

### *2.5.4. Tecniche di imaging*

Soggetti con differenti malattie mitocondriali presentano reperti di risonanza magnetica caratteristici. Ad esempio, nella sindrome di Leigh si osserva bilateralmente un'iperintensità di segnale nei nuclei della base e nel tronco encefalico. Nella MELAS sono presenti lesioni simili a stroke, soprattutto nel lobo occipitale. Diffuse anomalie di segnale della sostanza bianca centrale sono caratteristiche della sindrome di Kearns-Sayre (KSS), e calcificazioni dei nuclei della base si ritrovano nella KSS e nella MELAS (DiMauro et al 2004; Bianchi et al 2007).

La <sup>1</sup>H MRS gioca un ruolo nel dimostrare l'alterazione del metabolismo ossidativo nell'encefalo, mostrando l'accumulo del lattato nel SNC (Bianchi et al 2007).

La <sup>31</sup>P MRS è in grado di misurare le fluttuazioni di PCr e Pi durante l'esercizio fisico, a livello del tessuto muscolare. I più utili indicatori di MM sono un basso

rapporto PCr/Pi a riposo e post-esercizio (Kuhl et al 1994) e un ritardato recupero dell'ADP (Argov 1998).

#### *2.5.5. Biopsia muscolare*

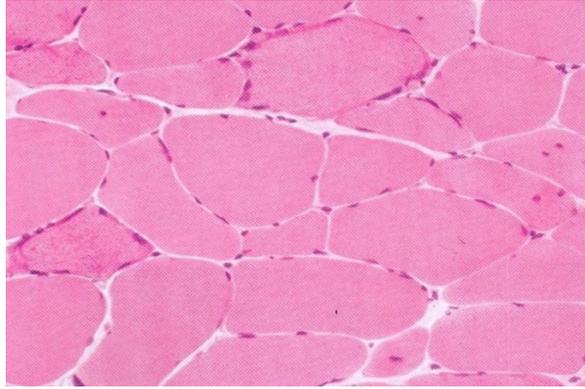
Il muscolo può essere l'unico tessuto affetto (a causa della sua elevata dipendenza dal metabolismo ossidativo), o può essere coinvolto come parte di una malattia multisistemica. Le principali caratteristiche di MM sono le fibre "ragged red" (RRF, fibre rosse stracciate), causate dall'accumulo di mitocondri strutturalmente alterati (Figura 3), e le fibre citocromo *c* ossidasi (COX) negative (Filosto et al 2007).

Sulle sezioni di muscolo, la tricromica di Gomori può mostrare la presenza di RRF (Figura 4), contenenti un carico mutazionale elevato ed una proliferazione patologica di mitocondri strutturalmente alterati (Filosto et al 2007). La colorazione per la succinato deidrogenasi (SDH) può dimostrare la presenza di accumuli subsarcolemmali o diffusi di mitocondri (fibre "ragged blue"). La colorazione COX può dimostrare la presenza di fibre COX-negative (Figura 5). Con l'utilizzo di anticorpi contro le diverse subunità della COX è possibile distinguere l'origine della disfunzione (nDNA o mtDNA) (Filosto et al 2007).

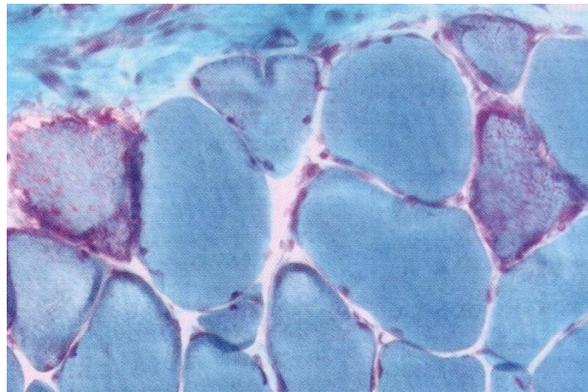
Alcuni pazienti affetti da MELAS (e raramente da MERRF) presentano un quadro istopatologico non indicativo, ma un difetto biochimico dei complessi respiratori; pertanto una biopsia muscolare normale non esclude una malattia mitocondriale, specialmente in pazienti con mutazioni del tRNA (McFarland et al 2002; Mancuso et al 2007b).

Oltre ai reperti istopatologici, la biopsia muscolare è la base per ulteriori studi biochimici e molecolari, che possono aggiungere importanti informazioni sul difetto responsabile del quadro clinico ed istopatologico.

In genere mutazioni nei geni strutturali portano a deficit nell'attività dell'enzima affetto, mentre mutazioni nei geni che controllano la sintesi proteica riducono l'attività di tutti i complessi respiratori (DiMauro & Schon 2003).



**Figura 3. Accumulo di mitocondri alterati in sede subsarcolemmale.** Sono osservabili due fibre patologiche, in alto al centro e in basso a sinistra. Colorazione ematossilina-eosina.



**Figura 4. Ragged red fibers (RRF).** Sono osservabili due RRF in alto a destra ed una in alto a sinistra. Tricromica di Gomori.



**Figura 5. Fibre citocromo c ossidasi (COX)-negative.** Numerose fibre muscolari negative (bianche) alla colorazione istochimica per la COX.

## 2.6. Approcci terapeutici

Ad oggi non esiste una strategia razionale di trattamento nel campo delle malattie mitocondriali. Supplementi vitaminici, agenti farmacologici, modificazioni dietetiche ed esercizio fisico sono stati usati in casi isolati e in piccoli studi clinici, ma l'efficacia di questi interventi rimane incerta. In particolare sono stati utilizzati agenti antiossidanti (CoQ10, idebenone, vitamina C, vitamina E, menadione), agenti che agiscono sulla lattico acidosi (dicloroacetato e dimetilglicina), agenti che correggono deficit biochimici secondari (carnitina, creatina), cofattori della catena respiratoria (nicotinamide, tiamina, riboflavina, succinato, CoQ10), ormoni (ormone della crescita e corticosteroidi) (Chinnery et al 2006). La maggior parte delle evidenze a favore dell'uso di specifici trattamenti deriva da singoli case reports.

Le opzioni terapeutiche sono state globalmente rivisitate da Chinnery et al (2006). Su 678 studi esaminati dagli autori, solo sei sono stati ritenuti accettabili per una revisione sistematica (studi randomizzati). Anche in questi lavori ritenuti accettabili, il numero dei soggetti partecipanti è molto basso (media 11, range 5-17), e l'eterogeneità clinica e genetica elevata. Due lavori hanno studiato gli effetti del CoQ10. Il primo di essi ha riportato un miglioramento soggettivo e un significativo aumento della forza muscolare (Chen et al 1997), il secondo non ha mostrato alcun beneficio del CoQ10 (Muller et al 1990). In due studi clinici è stata usata la creatina; uno di essi ha mostrato un aumento della forza muscolare ed una riduzione del lattato ematico post-esercizio (Tarnopolsky et al 1997), mentre il secondo non ha riportato benefici (Klopstock et al 2000). Uno studio con dicloroacetato ha mostrato un miglioramento dei soli parametri biochimici

(DeStefano et al 1995). L'ultimo studio valutato nella revisione sistematica (Chinnery et al 2006), con dimetilglicina, non ha ottenuto effetti significativi (Liet et al 2001). Pertanto, al momento attuale non sembra esserci una chiara evidenza a favore o contro i trattamenti comunemente utilizzati nelle MM (Chinnery et al 2006). Sono necessari ulteriori studi al fine di chiarire il ruolo dei diversi approcci terapeutici nel trattamento delle malattie mitocondriali.

## 2.7. Disfunzione mitocondriale, stress ossidativo e apoptosi

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo fisiologico necessario per l'organogenesi, per l'omeostasi tissutale e per l'eliminazione di cellule danneggiate o potenzialmente pericolose. Questo meccanismo è coinvolto in molti processi fisiologici e patologici. L'apoptosi è caratterizzata da coartazione della cellula, frammentazione del DNA, condensazione della cromatina e frammentazione nucleare (Krantik et al 2005). L'apoptosi può essere innescata dai recettori "di morte" situati sulla membrana cellulare (recettore Fas e recettore per il fattore di necrosi tumorale alfa, TNF- $\alpha$ ), oppure dal rilascio di *cyt c* e altre proteine nel citoplasma ("via mitocondriale"). Entrambe le vie portano infine all'attivazione di una famiglia di cisteina proteasi denominate caspasi, l'effettore intracellulare dell'apoptosi.

Lo spazio intermembrana mitocondriale sequestra alcuni fattori proapoptotici, fra cui il *cyt c*, Smac/DIABLO e l'endonucleasi G (vedi Figura 1). Diversi tipi di insulto mitocondriale sono in grado di aprire il poro di transizione di permeabilità mitocondriale e causare il rilascio di *cyt c* nel citoplasma. Il *cyt c* lega Apaf1 e la pro-caspasi 9, dando vita all'apoptosoma, ed innesca la cascata delle caspasi, che condurrà alla morte cellulare. La via mitocondriale è innescata dalla mancanza di fattori di crescita ed è regolata da proteine membri della famiglia di Bcl-2, come Bid, Bax e Bad (Krantik et al 2005). Esiste anche un meccanismo mitocondriale indipendente da caspasi, in cui AIF (fattore inducente l'apoptosi) è rilasciato dal mitocondrio e traslocato nel nucleo, dove attiva infine le DNA nucleasi (Krantik et al 2005). Durante l'apoptosi, la funzione mitocondriale viene alterata a causa

del clivaggio caspasi-mediato della subunità p75 del complesso I della ETC (Ricci et al 2004).

Il trasporto degli elettroni ad alta energia attraverso la ETC è necessario per la sintesi di ATP, ma è anche fonte della produzione di ROS (vedi Figura 1). A livello dei complessi I-III della catena respiratoria, gli elettroni ad alta energia possono reagire con l'O<sub>2</sub>, producendo il superossido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) (Genova et al 2004). Fino al 4-5% dell'O<sub>2</sub> consumato da mitocondri sani è convertito a superossido (Genova et al 2004), e questa quota aumenta nei mitocondri danneggiati o invecchiati. Quando la ETC è inibita, gli elettroni si accumulano ai livelli iniziali della catena respiratoria (complesso I e CoQ10), dai quali sono ceduti direttamente all'ossigeno molecolare, producendo l'anione superossido (Genova et al 2004). L'accumulo di ROS può potenzialmente danneggiare diverse biomolecole, fra cui lipidi, proteine ed acidi nucleici. Alcuni tessuti, come SNC e muscolo scheletrico, sono molto più vulnerabili allo stress ossidativo a causa del loro elevato consumo di O<sub>2</sub> (Mancuso et al 2006). Inoltre, rispetto ad altri tessuti, l'encefalo ha un'inferiore attività di enzimi antiossidanti come la glutazione perossidasi (GPX) e la catalasi, e contiene elevate concentrazioni di acidi grassi polinsaturi, altamente sensibili alla perossidazione (Mancuso et al 2006). Il superossido può reagire con l'ossido nitrico (NO), una molecola che nel SNC agisce da neurotrasmettitore, a formare il perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>), una specie molto dannosa per il DNA. Il danno ossidativo al DNA è ritenuto essere particolarmente deleterio nelle cellule post-mitotiche (come neuroni e miociti), non potendo essere rimpiazzato tramite meccanismi di divisione cellulare. Le cellule possiedono un complesso sistema di difesa (superossido dismutasi o SOD,

GPX e altre molecole) contro l'accumulo di ROS, e, in condizioni normali, sono in grado di farvi fronte. Il termine "stress ossidativo" descrive la condizione in cui i meccanismi di difesa antiossidanti della cellula sono insufficienti a mantenere i livelli di ROS sotto la soglia di tossicità.

Il mtDNA è particolarmente sensibile al danno ossidativo a causa della sua localizzazione a stretto contatto con la membrana mitocondriale interna (dove i ROS sono prodotti), e perché non è protetto da istoni ed è riparato in modo inefficiente. Poiché diversi dei geni del mtDNA codificano subunità della ETC, il danno ossidativo sul mtDNA, se non correttamente riparato, può risultare in mutazioni e delezioni che alterano la funzione dei geni coinvolti nella produzione di ATP, portando così a disfunzione respiratoria, aumentata produzione di ROS, ed infine a morte cellulare (Mancuso et al 2006). Per questi motivi, le modificazioni ossidative alle basi del mtDNA possono accentuare la disfunzione bioenergetica presente per definizione nelle malattie mitocondriali, e costituire un fattore di progressione in questo gruppo di malattie (Figura 6).

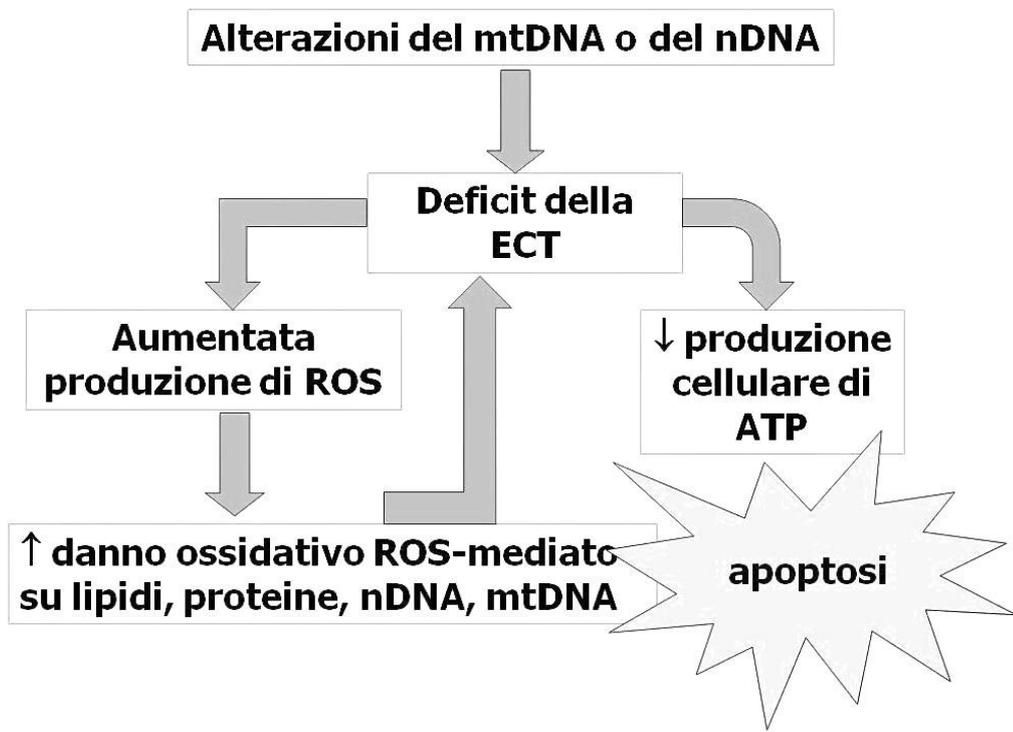
Linee cellulari portatrici di mutazioni puntiformi nel mtDNA dimostrano un'aumentata produzione di ROS (Vives-Bauza et al 2005). In accordo con quanto discusso finora, Migliore e collaboratori (2004) hanno osservato un maggior livello di danno ossidativo sul DNA in pazienti affetti da malattia mitocondriale rispetto a controlli sani. Due settimane di terapia con CoQ10 hanno ridotto il livello di danno ossidativo sul DNA (Migliore et al 2007). Inoltre, linfociti di pazienti affetti da malattie mitocondriali (in particolare la neuropatia ottica ereditaria di Leber) mostrano una maggior sensibilità all'apoptosi indotta da stress ossidativo (Battisti et al 2004).

Il glutatione (GSH), la più importante sostanza anti-ossidante non enzimatica, ha un duplice ruolo: quello di “spazzino” di ROS e prodotti di ossidazione potenzialmente tossici, e quello di substrato per gli enzimi detossificanti GPX e GSH reduttasi (Dringen et al 2000; Franco et al 2007). Molti studi hanno confermato il ruolo del GSH come regolatore dinamico dello stato ossidoriduttivo intracellulare (Klatt & Lamas 2000; Hall 1999), e la sua importanza per la sopravvivenza cellulare (Li et al 1997; Franco et al 2007).

Hargreaves e collaboratori (2005) hanno determinato il GSH in ventiquattro campioni di muscolo scheletrico prelevati da pazienti pediatrici affetti da malattia mitocondriale definita, comparandolo a quindici controlli appaiati per età ed affetti da miopatie di altro tipo. È stata osservata una concentrazione di GSH significativamente inferiore nei pazienti MM ( $7,7 \pm 0,9$  versus  $12,3 \pm 0,6$  nmol/mg di proteine;  $P < 0,001$ ) (Hargreaves et al 2005). In particolare, è stata osservata una netta riduzione dei livelli di GSH nei pazienti con deficit combinato dei complessi I, II e III (-66,6%), deficit isolato del complesso I (-60,2%), e deficit combinato dei complessi II, III e IV (-75,6%) (Hargreaves et al 2005). Età e sesso non influivano significativamente sulla concentrazione di GSH (Hargreaves et al 2005). In base a queste osservazioni, la concentrazione intracellulare di GSH sembra ridotta in modo specifico nelle MM, a causa della diminuita disponibilità di ATP (essendo la sintesi di GSH un processo energia-dipendente) o dell'aumentato stress ossidativo. È verosimile che entrambi i fattori citati concorrano nel determinare il deficit muscolare di GSH nelle malattie mitocondriali. Quest'ultimo può, a sua volta, rappresentare un fattore di progressione in questo gruppo di malattie. La diminuita capacità di contrastare lo

stress ossidativo potrebbe ulteriormente compromettere la struttura e la funzione del mtDNA e l'attività della ETC (secondo il circolo vizioso discusso in precedenza). Il ristoro del GSH intracellulare potrebbe pertanto avere una valenza terapeutica.

In conclusione, il circolo vizioso fra mutazioni del mtDNA, disfunzione della catena respiratoria e stress ossidativo (fattori che in ultima analisi innescano l'apoptosi; vedi Figura 6) potrebbe rappresentare un importante fattore di progressione non solo delle malattie mitocondriali propriamente dette, ma anche di altre condizioni associate a disfunzione mitocondriale come le malattie neurodegenerative e l'invecchiamento stesso (Mancuso et al 2007c). È auspicabile che questo circolo vizioso possa in futuro rappresentare un utile target farmacologico.



**Figura 6. Circolo vizioso fra disfunzione mitocondriale e stress ossidativo.** La disfunzione della catena respiratoria si associa a cessione diretta degli elettroni all' $O_2$ , con formazione di superossido e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS). A loro volta le ROS causano mutazioni e delezioni del mtDNA, che alterano la funzione dei geni coinvolti nella produzione di ATP, aggravando ulteriormente la disfunzione mitocondriale. Entrambi gli attori di questo circolo vizioso portano alla fine a morte cellulare.

### 3. OBIETTIVI E DISEGNO DELLO STUDIO

Obiettivi del presente studio sono: verificare l'ipotesi dello stress ossidativo nelle MM, anche in relazione alle condizioni cliniche basali dei pazienti; verificare l'efficacia, in termini di forza muscolare e qualità della vita, di un integratore proteico donatore di cisteina; valutare l'attività antiossidante di tale integratore nelle MM.

Il razionale per l'utilizzo di un simile integratore risiede nel fatto che la disponibilità intracellulare di cisteina è il principale fattore limitante la sintesi del GSH (l-gamma-glutamyl-l-cisteinil-glicina) (Franco et al 2007). Dalla cisteina e dal glutammato deriva la gamma-glutamyl-cisteina che, reagendo con la glicina, genera il GSH. Il GSH è un tripeptide che può, spontaneamente o mediante l'intervento della GPX, liberare gli idrogenioni necessari alla riduzione dei radicali liberi. In tal modo, il GSH svolge un ruolo fondamentale nei meccanismi di difesa antiossidanti intracellulari. Il gruppo attivo del GSH è rappresentato dal gruppo tiolico (-SH) della cisteina, che quando esplica la sua attività antiossidante viene ossidato a cisteina disolfito (Franco et al 2007). Abbiamo già discusso del circolo vizioso sostenuto da disfunzione mitocondriale e stress ossidativo (vedi Figura 6), che potrebbe rappresentare un fattore di progressione nelle MM. In particolare, nelle malattie mitocondriali è stata osservata una riduzione dei livelli tissutali (muscolo scheletrico) di GSH (Hargreaves et al 2006). Sebbene tale riduzione possa essere conseguenza dell'insufficiente produzione di energia sottoforma di ATP, non è da escludere la possibilità che i ridotti livelli di GSH

siano conseguenza dell'aumentato stress ossidativo che caratterizza le malattie mitocondriali (Chen et al 2003). In entrambi i casi, tale deficit può rappresentare un fattore di progressione e di ulteriore aggravamento dei livelli di stress ossidativo. Questa osservazione fornisce pertanto un interessante razionale all'utilizzo di composti donatori di cisteina nelle MM.

Le determinazioni che sono state effettuate comprendono:

1. determinazione del GSH totale su sangue intero;
2. determinazione, su sangue venoso, della capacità ferro riducente del plasma (FRAP). Questa metodica permette di valutare la capacità anti-ossidante di un dato liquido biologico, nella fattispecie del plasma, mediante riduzione dello ione ferrico in ione ferroso;
3. determinazione, su sangue venoso, della concentrazione dei prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP). Questa metodica è applicabile a campioni di qualsiasi liquido biologico (sangue, urina, liquor), e consente di stimare la quantità di proteine, in prevalenza albumina, che hanno subito un processo di ossidazione a livello di specifici residui aminoacidici;
4. determinazione, su sangue venoso, dell'acido lattico, quale marcatore di disfunzione del metabolismo aerobico mitocondriale.

Tutti i parametri sopra discussi sono stati correlati con le condizioni cliniche basali dei soggetti in studio, determinate tramite scale quantitative (es. qualità della vita, forza muscolare). La valutazione clinica ed i dosaggi ematici sono stati eseguiti da sperimentatori differenti, ciascuno "in cieco" rispetto all'altro.

E' stato effettuato uno studio clinico in doppio cieco e cross-over. Sono stati arruolati tredici pazienti (di cui undici hanno portato a termine lo studio), trattati con 10 g al giorno di integratore proteico donatore di cisteina o placebo (caseina) per 30 giorni. La caseina è quasi del tutto priva di cisteina. E' stata scelta la dose consigliata dal fornitore (10 g al giorno), in quanto è stato dimostrato essere sicura e ben tollerata. Dopo il primo mese, i due gruppi sono stati invertiti per i 30 giorni successivi. All'inizio, dopo il primo e dopo il secondo mese sono state effettuate le seguenti valutazioni: scala Medical Research Council (MRC, 1943) (forza muscolare); questionario sulla qualità della vita (SF-36); determinazione ematica dell'acido lattico e dei parametri relativi all'equilibrio proossidanti (AOPP)/antiossidanti (GSH, FRAP); AST, ALT, creatinina (per escludere l'esistenza di controindicazioni all'integratore). Otto degli undici pazienti sono stati, inoltre, sottoposti a test da sforzo aerobico incrementale su cicloergometro (con determinazione dell'acido lattico e dei parametri già citati di stress ossidativo), durante ognuna delle tre visite.

Obiettivo secondario dello studio è stata la conferma della tollerabilità clinica del prodotto alle dosi consigliate nella scheda tecnica, rilevata con dato anamnestico.