

Università di Pisa



Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Il coinvolgimento cardiaco nella malattia mitocondriale

Candidato:

Alberto Aimò

Relatore:

Prof. Michele Emdin

Anno Accademico 2014/2015

Indice

Indice	ii
Abstract	iii
Elenco delle figure	viii
Elenco delle tabelle	viii
Abbreviazioni e acronimi	ix
1 Aspetti genetici e clinici della patologia mitocondriale	1
1.1 Mitocondri: ultrastruttura e genoma	1
1.2 Genetica mitocondriale	4
1.3 Fisiologia mitocondriale	8
1.4 Patogenesi delle malattie mitocondriali	10
1.5 Presentazione clinica della patologia mitocondriale	13
1.6 Aspetti epidemiologici	21
1.7 Diagnosi di malattia mitocondriale	22
1.8 Attuali opzioni terapeutiche	24
1.9 Prognosi dei pazienti con mitocondriopatia	26
2 Cardiopatia mitocondriale: quadri clinici e patogenesi	28
2.1 Possibili quadri di cardiopatia mitocondriale	28
2.2 Epidemiologia, prognosi, opzioni terapeutiche	32
2.3 Algoritmo diagnostico attuale	32
2.4 Patogenesi del danno cardiaco: una visione "cardiocentrica"	34
2.5 Un approccio "sistemico" alla cardiopatia mitocondriale?	35
2.6 Ergoriflesso	38
2.7 La <i>heart hypothesis</i> di una miopatia?	41
Scopo della tesi	44

3 Metodi	45
3.1 Soggetti arruolati nello studio	45
3.2 Tecniche tradizionali di indagine	47
3.3 Ergoriflesso	48
3.4 Test ergometrico cardiopolmonare	48
3.5 Analisi della funzione respiratoria	49
3.6 Chemoriflesso, baroriflesso	49
3.7 Analisi della funzione autonoma	50
3.8 Valutazione biumorale	52
3.9 Analisi statistica	52
4 Risultati	54
4.1 Pazienti, soggetti di controllo	54
4.2 ECG, ecocolor-Doppler cardiaco, risonanza magnetica cardiaca	58
4.3 Test ergometrico cardiopolmonare	64
4.4 Valutazione respiratoria	66
4.5 Riflessi cardiorespiratori	70
4.6 Funzione autonoma	74
4.7 Caratterizzazione biumorale	79
Appendice: il <i>training</i> fisico	84
5 Discussione	88
5.1 Interessamento muscolare	89
5.2 Danno cardiaco subclinico	89
5.3 Iperattività dell'ergoriflesso	90
5.4 Ergoriflesso e limitazione della capacità di esercizio	91
5.5 Ergoriflesso e disautonomia	92
5.6 Biomarcatori di danno cardiaco e muscolare	93
Limitazioni dello studio	95
Conclusioni e prospettive	97
Ringraziamenti	99
Bibliografia	100

Abstract

Background: Le mutazioni che compromettono la funzione mitocondriale causano patologie solitamente sistemiche, con coinvolgimento preferenziale degli organi con maggiori richieste energetiche. La miopatia scheletrica è molto frequente, come riscontrabile mediante valutazioni cliniche, istologiche e immunoenzimatiche. L'impegno cardiaco si può manifestare sotto forma di cardiomiopatia (più frequentemente ipertrofica) e/o di anomalie dell'attività elettrica. La patogenesi del danno cardiaco è sostanzialmente sconosciuta. In tutti i pazienti con malattia mitocondriale viene effettuato uno screening cardiologico, composto da elettrocardiogramma (ECG), ecocolor-Doppler cardiaco e se possibile risonanza magnetica (RM) cardiaca con mezzo di contrasto (m.d.c.); ECG ed ecocolor-Doppler sono poi ripetuti a cadenza annuale o pluriennale.

Scopo della tesi: In questo studio abbiamo sottoposto pazienti con malattia mitocondriale e senza impegno cardiaco noto ad una valutazione cardiologica esaustiva. Ci siamo proposti di verificare la presenza di una cardiopatia morfologica e/o funzionale in questi pazienti e di ricercare l'attivazione di meccanismi sistemici caratterizzati nello scompenso cardiaco; tali meccanismi possono contribuire ai sintomi di dispnea da sforzo e affaticamento, nonché promuovere l'insorgenza e la progressione del danno cardiaco.

Metodi: Tra il gennaio 2014 e il maggio 2015 sono stati arruolati 25 pazienti con malattia mitocondriale. In base alla precedente caratterizzazione neurologica, un danno muscolare era un reperto pressoché costante in questa popolazione. La valutazione cardiologica ha previsto gli accertamenti di routine: ECG, ecocolor-Doppler, risonanza magnetica (RM) cardiaca con mezzo di contrasto (m.d.c.). I pazienti sono stati sottoposti a test ergometrico cardiopolmonare e misurazione delle massime pressioni respiratorie; è stata analizzata la funzione respiratoria ed è stato eseguito un monitoraggio cardiorespiratorio nelle 24 ore. La funzione autonoma è stata indagata mediante analisi spettrale dell'ECG dinamico secondo Holter, dosaggio delle catecolamine, misurazione della sensibilità barocettiva. Sono stati inoltre indagati l'ergoriflesso e il chemoriflesso.

Risultati: I pazienti erano per il 32% maschi; l'età media era 42 anni (39-54 anni); 4 pazienti soffrivano di ipoacusia (16%), 6 di ipertensione (24%), 6 di diabete (24%). Le alterazioni elettrocardiografiche sono risultate relativamente frequenti ma aspecifiche. All'ecocolor-Doppler, i volumi e la funzione delle camere cardiache sono risultate nei limiti in tutti i pazienti, tranne un caso di iniziale riduzione della frazione di eiezione (53%); due pazienti (8%) presentavano un'ipertrofia ventricolare, 6 (24%) un rimodellamento ipertrofico. La RM cardiaca con m.d.c. è stata eseguita in 18 pazienti (72%), col riscontro di ipertrofia in 2 pazienti (11%) e di *late gadolinium enhancement* (LGE, reperto indicativo di fibrosi) in 8 pazienti (32%). Al test cardiopolmonare, i pazienti presentavano una precoce interruzione dello sforzo (espressa in termini di lavoro massimo e consumo di ossigeno/kg al picco) a causa di dispnea e fatica muscolare. Si riscontravano inoltre evidenze di compromissione del metabolismo aerobico e riduzione dell'efficienza ventilatoria (espressa dalla slope ventilazione/produzione di anidride carbonica). Il lento incremento della frequenza cardiaca durante sforzo (incompetenza cronotropa) era riconducibile ad una disautonomia con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico. Confermavano la presenza di disautonomia la riduzione talora marcata della variabilità della frequenza cardiaca (valutata mediante ECG Holter) e la depressione del baroriflesso nei pazienti.

L'ergoriflesso è un meccanismo neurale che origina dal muscolo e che adatta la ventilazione e la funzione emodinamica all'intensità di esercizio. Nei pazienti, la sensibilità ergocettiva era nettamente maggiore rispetto ai controlli e risultava correlata con un indice di sovertimento strutturale del muscolo scheletrico (rapporto tessuto adiposo/acqua, valutato mediante spettroscopia RM con ^1H). La sensibilità ergocettiva era correlata con una precoce interruzione del test cardiopolmonare e con l'inefficienza ventilatoria. Il confronto fra sottogruppi (controlli *vs.* pazienti con ergoriflesso normale *vs.* pazienti con ergoriflesso attivato; pazienti con ergoriflesso normale *vs.* pazienti con ergoriflesso attivato) supportava un'influenza dell'ergoriflesso sulla funzione autonoma in questi pazienti.

La presenza di LGE alla RM cardiaca è stata associata con i livelli circolanti di norepinephrina e con quelli di galectina-3, un biomarcatore di fibrosi miocardica. Non è stata riscontrata un'associazione fra LGE e livelli di troponina T altamente sensibile (*high sensitivity*, HS), nonostante quest'ultima sia considerata un biomarcatore specifico di necrosi miocardica, il cui esito ultimo è la fibrosi. Nella nostra popolazione, i livelli di troponina T HS sono risultati superiori al *cut-off* nel 40% dei pazienti, mentre i livelli di troponina I erano normali in tutti i casi. Questi risultati suggerivano che, in questi pazienti miopatici, la troponina T HS fosse rilasciata dal muscolo scheletrico. Supportava questa ipotesi il riscontro di una forte correlazione fra i livelli di troponina T HS e quelli di vari indici di

danno muscolare: creatinfosfochinasi, latticodeidrogenasi, mioglobina.

Conclusioni: In questo studio preliminare su pazienti con malattia mitocondriale, la RM con m.d.c. ha rilevato la presenza di fibrosi e/o ipertrofia in una percentuale significativa di casi, nonostante l'anamnesi cardiologica fosse muta. Sono stati riscontrati una riduzione della sensibilità barocettiva, un aumento della sensibilità ergocettiva e un *imbalance* autonomico con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico. La troponina T HS si è dimostrata un biomarcatore accurato di danno muscolare scheletrico. Come sviluppo del presente lavoro, è stato intrapreso un programma di *training* fisico per influire positivamente sulle alterazioni sistemiche ascrivibili alla deplezione del muscolo scheletrico.

Elenco delle figure

1.1	Mitocondri e DNA mitocondriale	2
1.2	Il genoma mitocondriale	3
1.3	La rete mitocondriale	5
1.4	Omoplasma ed eteroplasma	5
1.5	Il collo di bottiglia mitocondriale	7
1.6	Possibili manifestazioni cliniche della patologia mitocondriale.	15
1.7	Fibre muscolari <i>ragged red</i>	18
1.8	Fibre muscolari positive e negative per la citocromo c ossidasi	19
2.1	Fenotipi cardiaci associati a mutazioni dell' mtDNA	29
2.2	Algoritmo proposto da Bates <i>et al.</i> per la diagnosi e il <i>follow-up</i> cardiologico dei pazienti con patologia mitocondriale.	33
2.3	La <i>muscle hypothesis</i> dello scompenso cardiaco	37
2.4	Metaboriflesso	40
2.5	Il danno muscolare come possibile determinante di cardiopatia	41
4.1	Fibrosi e sostituzione fibroadiposa	63
4.2	Analisi <i>T1-mapping</i>	63
4.3	Espansione del volume extracellulare nel miocardio e nel muscolo	64
4.4	Composizione del muscolo scheletrico analizzata mediante spettroscopia	66
4.5	Ridotta performance al test cardiopolmonare e compromissione del meta- bolismo ossidativo	67
4.6	Ipopnea ascrivibile a debolezza muscolare	69
4.7	Iperattività dell'ergoriflesso in pazienti con malattia mitocondriale	71
4.8	Sovvertimento strutturale del muscolo scheletrico e sensibilità ergocettiva	72
4.9	Correlazione fra composizione del muscolo scheletrico e sensibilità ergocettiva	72
4.10	Sensibilità ergocettiva e performance al test cardiopolmonare	73
4.11	Ergoriflesso e punteggi relativi a dispnea e fatica muscolare	74
4.12	Incompetenza cronotropa nei pazienti con malattia mitocondriale	75

4.13	Riduzione dell' <i>heart rate variability</i> in un paziente	76
4.14	Livelli di catecolamine in controlli e pazienti	77
4.15	Ergoriflesso e funzione autonoma	78
4.16	Sensibilità ergocettiva, sensibilità barocettiva e livelli di noradrenalina . . .	79
4.17	Noradrenalina, galectina-3 e fibrosi miocardica	79
4.18	Troponina T HS e fibrosi miocardica	80
4.19	Discrepanza fra i valori di troponina T HS e troponina I	81
4.20	Correlazione fra valori di troponina T HS e indici di danno muscolare . . .	82
4.21	Troponina T HS indicatore più sensibile di danno muscolare?	83
4.22	Schema del protocollo di <i>training</i>	87

Elenco delle tabelle

4.1	Principali caratteristiche genetiche e cliniche dei pazienti valutati	55
4.2	Dati principali emersi dall'anamnesi cardiologica	57
4.3	Controlli e pazienti	58
4.4	Reperti elettrocardiografici	59
4.5	Reperti ecocardiografici	60
4.6	Risultati della RM cardiaca	62
4.7	Differenze fra controlli e pazienti nei principali indicatori di performance al test cardiopolmonare	65
4.8	Analisi della funzione respiratoria	67
4.9	Monitoraggio cardiorespiratorio nelle 24 ore	68
4.10	Riflessi cardio-respiratori	71
4.11	ECG Holter	75
4.12	Effetti benefici di 6 mesi di <i>training</i>	86
4.13	Effetti benefici di 3 mesi di <i>training</i> con il nostro nuovo protocollo	86

Abbreviazioni e acronimi

Si è utilizzato l'acronimo inglese qualora questo sia invalso nell'uso e non esista un corrispettivo italiano; negli altri casi si è preferito l'acronimo italiano.

ADP: adenosina difosfato

AHI: *apnea/hypopnea index* (indice apnea-ipopnea)

ATP: adenosina trifosfato

AUC: *area under the curve* (area sotto la curva)

BAV: blocco atriventricolare

BBD: blocco di branca destra

BNP: *brain natriuretic peptide* (peptide natriuretico cerebrale)

CPK: creatinfosfochinasi

CMD: cardiomiopatia dilatativa

CMI: cardiomiopatia ipertrofica

CMR: cardiomiopatia restrittiva

COX: citocromo e ossidasi

CPEO: *chronic progressive external ophthalmoplegia* (oftalmoplegia esterna cronica progressiva)

ECG: elettrocardiogramma

ECV: volume extracellulare

FC: frequenza cardiaca

FTGM: Fondazione Toscana Gabriele Monasterio

Gal-3: galectina 3

GLS: *global longitudinal strain* (strain longitudinale globale)

HCVR: *hypercapnic ventilatory response* (risposta ventilatoria all'ipercapnia)

HF: *high frequency* (alta frequenza)

HS: *high sensitivity* (altamente sensibile)

HRV: *heart rate variability* (variabilità della frequenza cardiaca)

HVR: *hypoxic ventilatory response* (risposta ventilatoria all'ipossia)

LDH: lattico deidrogenasi

LF: *low frequency* (bassa frequenza)

LGE: *late gadolinium enhancement*

LHON: *Leber's hereditary optic neuropathy* (neuropatia ottica ereditaria di Leber)

LVMI: *left ventricular mass index* (massa ventricolare sinistra indicizzata)

MELAS: *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes* (encefalopatia mitocondriale, acidosi lattica, episodi simil-ictali)

MEP: *maximal expiratory pressure* (massima pressione espiratoria)

MERRF: *myoclonic epilepsy with ragged red fibers* (epilessia mioclonica con fibre *ragged red*)

MIP: *maximal inspiratory pressure* (massima pressione inspiratoria)

mt-DNA: DNA mitocondriale

NARP: neuropatia, atassia, retinite pigmentosa

NC: non compattazione

nDNA: DNA nucleare

NYHA: *New York Heart Association*

NT-proBNP: *N-terminal pro-brain natriuretic peptide* (porzione N-terminale del pro-BNP)

PETCO₂: pressione parziale di anidride carbonica di fine espirazione

pNN50: percentuale di successivi intervalli RR > 50 ms

POLG: polimerasi gamma

RM: risonanza magnetica

rMSSD: media delle radici quadrate delle differenze fra successivi intervalli RR

ROS: *reactive oxygen species* (specie reattive dell'ossigeno)

rRNA: RNA ribosomiale

RWT: *relative wall thickness* (spessore relativo di parete)

SaO₂: saturazione arteriosa in ossigeno

SD: deviazione standard degli intervalli fra battiti sinusali consecutivi

SDANN: deviazione standard dei valori medi fra battiti sinusali consecutivi in tutti i periodi di 5 minuti della registrazione

tRNA: RNA *transfer*

UCP: *uncoupling protein* (proteina disaccoppiante)

VCO₂: produzione di anidride carbonica

VE: ventilazione

VO₂: consumo di ossigeno

VS: ventricolo sinistro

W: carico di lavoro

Capitolo 1

Aspetti genetici e clinici della patologia mitocondriale

1.1 Mitochondri: ultrastruttura e genoma

I mitocondri sono organelli presenti in quasi tutte le cellule eucariotiche e deputati principalmente alla produzione di energia, mediante il processo definito fosforilazione ossidativa^{[1][2]}. Secondo la teoria endosimbiontica, i mitocondri, così come i cloroplasti, derivano da batteri incorporati in altre cellule circa 1,5 miliardi di anni fa^[3]. La teoria endosimbiontica fu formulata nel 1910 in seguito ad osservazioni sui cloroplasti^{[3][4]} ma l'attuale formulazione di questa teoria risale al 1967, quando Lynn Margulis pubblicò l'articolo *On the origin of mitosing cells*^[3]. La teoria endosimbiontica è supportata da varie similitudini fra i mitocondri e i batteri: possiamo citare la struttura e la composizione chimica della membrana mitocondriale, la presenza di DNA circolare, la divisione mediante scissione binaria, analogie dei ribosomi e degli RNA di trasporto^{[3][4]}. La produzione di energia mediante fosforilazione ossidativa, processo molto più efficiente rispetto alla glicolisi anaerobia, ha verosimilmente rappresentato il *primum movens* di questa simbiosi, da cui hanno avuto origine le cellule eucariotiche^[3].

Ogni cellula eucariotica contiene numerosi mitocondri; secondo stime recenti, il numero di mitocondri per cellula di mammifero va da 83 ± 17 a 677 ± 80 ed è all'incirca proporzionale alle necessità energetiche delle cellule^[5]. A livello della matrice, ogni mitocondrio contiene varie copie di DNA mitocondriale (mtDNA) (*Figura 1.1*). È stato stimato che ogni mitocondrio contenga in media 2.6 ± 0.3 copie di mtDNA; il numero di molecole di mtDNA per cellula di mammifero andrebbe da 220 ± 6.2 a 1720 ± 162 ^[6].

I mitocondri possiedono una membrana esterna e una membrana interna^[2]. La membrana esterna entra in contatto con il citosol; la membrana interna delimita la porzione

più interna del mitocondrio, detta matrice mitocondriale, e presenta invaginazioni dette creste, che ne ampliano la superficie^[2]. Nella membrana mitocondriale interna sono presenti quattro complessi proteici che costituiscono la catena di trasporto degli elettroni, più un quinto complesso che opera la fosforilazione ossidativa, cioè utilizza il gradiente elettrochimico creato dagli altri quattro complessi proteici per fosforilare l'adenosina difosfato (ADP) ad adenosina trifosfato(ATP)^[2]. I mitocondri svolgono anche altre funzioni, che verranno discusse nel paragrafo 1.3.

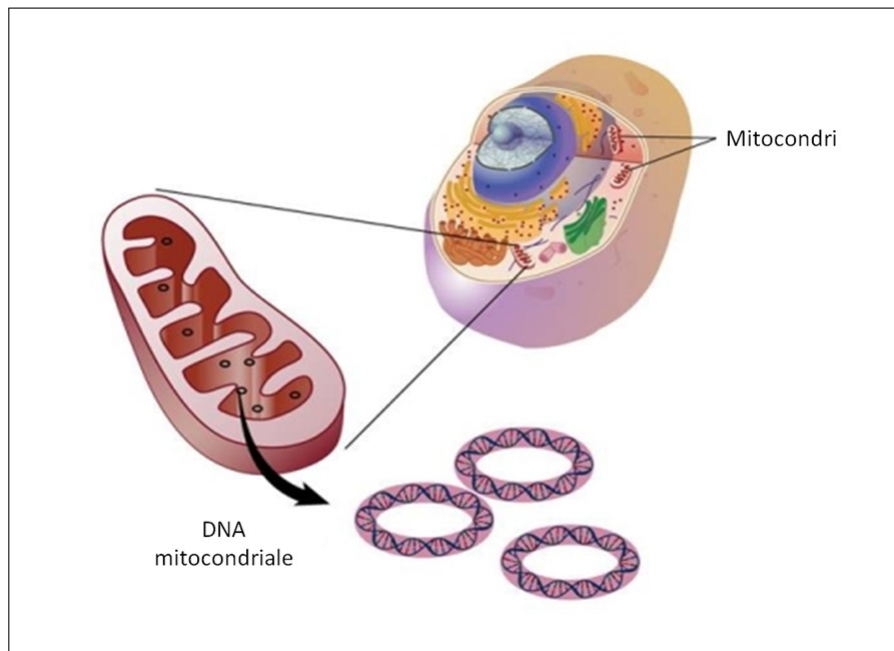


Figura 1.1: Mitocondri e DNA mitocondriale

Ogni cellula contiene numerosi mitocondri, che provvedono alle sue necessità energetiche e svolgono altri ruoli importanti per la cellula. Ciascun mitocondrio possiede numerose copie di DNA circolare a doppia elica. Adattata da <http://blog-epi.grants.cancer.gov/2012/05/01/a-tale-of-two-genomes-mitochondrial-genomics-and-cancer-risk/>

L' mtDNA è strutturato come una molecola circolare, a doppio filamento, lunga 16.569 bp nella specie umana^{[1][2][5]}. Si distinguono due filamenti, uno pesante (*heavy*, H) ricco di guanine e uno leggero (*light*, L) ricco di citosine^[1]. Sono presenti 28 geni sul filamento H e 9 geni sul filamento L, per un totale di 37 geni^{[1][5]}. Tredici di questi geni codificano per una subunità dei complessi proteici localizzati nella membrana mitocondriale interna, precisamente i complessi I, III, IV e l'ATP sintasi^{[1][6]}. I restanti 24 geni sono trascritti in RNA transfer (tRNA) o RNA ribosomiali (rRNA), quindi in molecole coinvolte nella sintesi proteica che si svolge nei mitocondri^[1] (Figura 1.2).

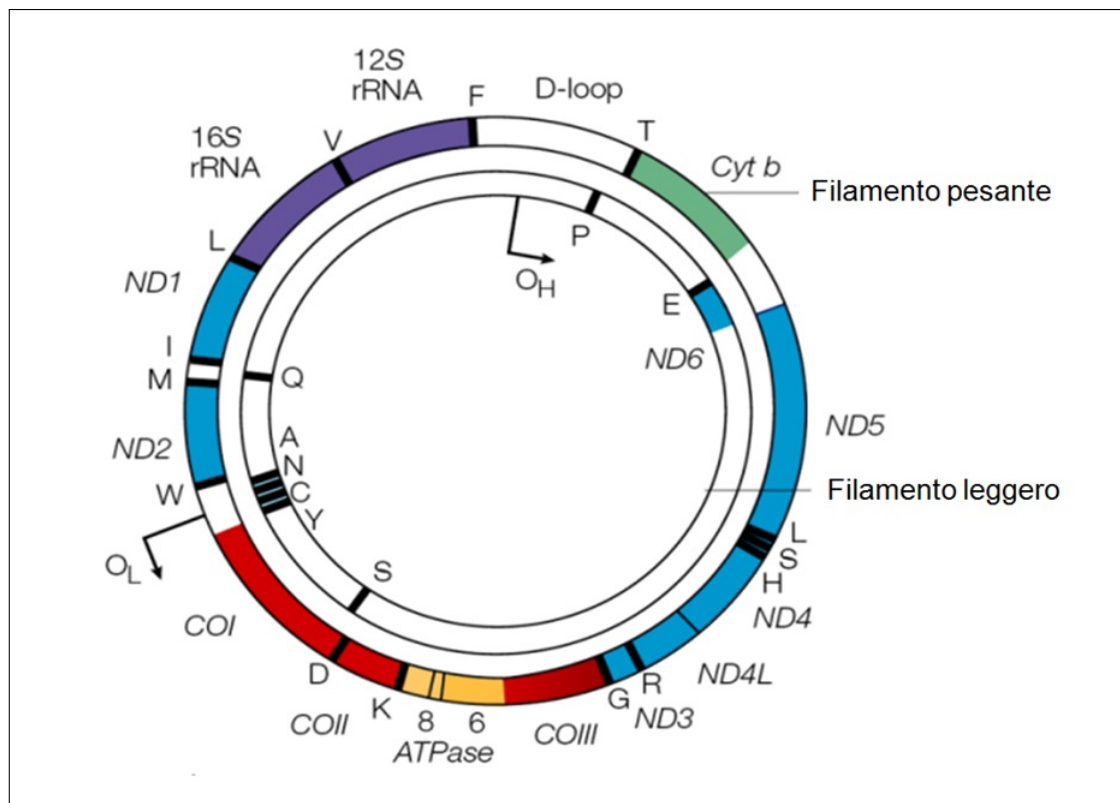


Figura 1.2: Il genoma mitocondriale.

Si riconoscono i due filamenti, pesante (H) e leggero (L). I geni codificanti per subunità del complesso I sono colorati in blu. Il gene del citocromo b (complesso III) è colorato in verde. I geni di proteine del complesso IV sono colorati in rosso. I geni codificanti per le subunità 6 e 8 dell'ATP sintasi sono colorati in giallo. I geni dei due rRNA mitocondriali sono colorati in viola. I 22 tRNA sono indicati con linee nere e con la lettera dell'aminoacido corrispondente. La D-loop (*displacement loop*) è una regione non codificante che funge da origine della replicazione dell'mtDNA. *Adattata da:* <http://www.nature.com/scitable/topicpage/mtdna-and-mitochondrial-diseases-903>

Nel complesso, il 93% dell' mtDNA è costituito da regioni codificanti, in contrasto con il DNA nucleare (in cui la percentuale di DNA codificante è molto inferiore) ma in analogia con il DNA batterico^{[1][4]}. È stato inoltre riscontrato che il codice genetico mitocondriale somiglia a quello batterico, che l' mtDNA è privo di introni e che molti geni sono parzialmente sovrapposti, come avviene nel DNA batterico^{[1][4]}. Tutte queste osservazioni depongono a favore della teoria endosimbiontica^{[1][4]}. Durante l'evoluzione contestuale dei mitocondri e delle cellule eucariotiche, un certo numero di geni essenziali per la funzione mitocondriale sembra essere passato dall' mtDNA al DNA nucleare. In effetti, la fosforilazione ossidativa richiede un numero di proteine codificate dal DNA nucleare superiore a quello delle proteine codificate dall' mtDNA (79 proteine contro 13)^[1]; inoltre, la replicazione del genoma mitocondriale, la sua riparazione e replicazione dipendono principalmente da proteine nucleari^{[1][4]}.

Le molecole di mtDNA si replicano indipendentemente dalla divisione cellulare^{[1][2]}. Anche i mitocondri si moltiplicano, con un processo analogo alla fissione batterica, senza alcun rapporto con le divisioni cellulari^[1]; nel corso della mitosi e della meiosi, i mitocondri sono ripartiti casualmente fra le cellule figlie^{[1][2]}. Esiste anche un processo di fusione mitocondriale, che consiste nella confluenza di mitocondri adiacenti^{[1][7]} e che si è sviluppata verosimilmente come un meccanismo di scambio di proteine e materiale genetico fra mitocondri^[1], ricapitolando ancora una volta il comportamento dei batteri. I processi di fusione e fissione sono controllati da proteine di sintesi nucleare^[1] e producono una sorta di "rete mitocondriale" che provvede alle necessità energetiche della cellula^[8] (*Figura 1.3*)

1.2 Genetica mitocondriale

In seguito alla fecondazione si costituisce uno zigote in cui le molecole di mtDNA derivano unicamente dalla cellula uovo^{[1][2]}. Il destino dell' mtDNA di origine paterna non è ancora stato definitivamente chiarito^[1]. È stato proposto che queste molecole di mtDNA vadano incontro a distruzione selettiva durante la maturazione degli spermatozoi^[9] o nelle prime fasi dell' embriogenesi^[10]. In alternativa, il numero di copie di mtDNA dello spermatozoo sarebbe tanto inferiore al numero di copie di mtDNA della cellula uovo che l' mtDNA di origine paterna non sarebbe più rilevabile con le tecniche tradizionali di sequenziamento^{[1][5]}^[10]. Qualunque sia l' esatto destino dell' mtDNA paterno, è ampiamente noto che le patologie dovute a mutazioni dell' mtDNA hanno una trasmissione strettamente matrilineare^{[1][2]}.

In ogni cellula, tutte le molecole di mtDNA possono essere uguali, cioè tutte normali o tutte mutate; questa condizione è nota come omoplasma. In alternativa, una certa percentuale dell' mtDNA può presentare una stessa mutazione; si parla in questo caso di

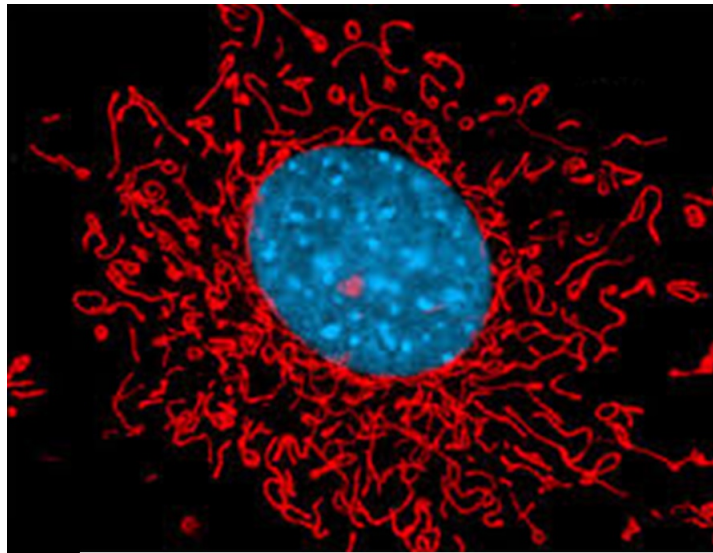


Figura 1.3: **La rete mitocondriale**

L'estesa rete mitocondriale e i suoi rapporti con il nucleo sono chiaramente visibili in questa immagine raffigurante fibroblasti di embrioni di topo, ottenuta utilizzando i traccianti fluorescenti MitoTracker Red CMXRos per visualizzare i mitocondri (colorati in rosso) e il 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) per visualizzare il nucleo (blu). *Fonte: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/galleries/static/cells/3t3.html>*

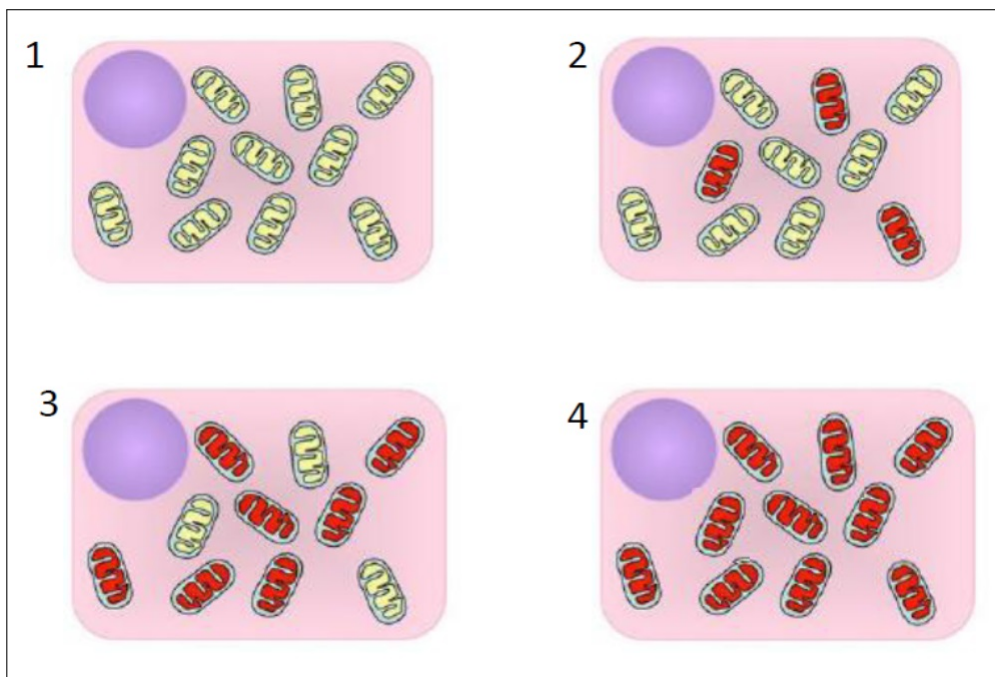


Figura 1.4: **Omoplasmia ed eteroplasmia**

Le immagini 1 e 4 corrispondono a condizioni di omoplasmia (presenza di solo mtDNA normale o mutato), le immagini 2 e 3 a condizioni di eteroplasmia (coesistenza di mtDNA normale e mutato). I concetti di omoplasmia ed eteroplasmia fanno riferimento alla percentuale di mtDNA mutato rispetto all'mtDNA totale e non alla percentuale di mitocondri mutati rispetto alla totalità dei mitocondri, come indurrebbero a credere queste rappresentazioni schematiche. *Adattata da Taylor et al., 2005^[12].*

eteroplasmia^[1] (Figura 1.4).

Le mutazioni dell'mtDNA possono essere ereditate per via matrilineare oppure possono insorgere *de novo*^{[1][2]}. La probabilità di mutazioni *de novo* è elevata per lo stress ossidativo dovuto alla presenza della catena respiratoria e dall'inefficienza dei meccanismi di riparazione dell'mtDNA^{[1][2][5]}. In quest'ottica, la presenza di innumerevoli copie di mtDNA in ogni cellula può essere interpretata come un sistema volto a minimizzare le possibili conseguenze di mutazioni *de novo* nel genoma mitocondriale, alternativo ad un potenziamento dei meccanismi di riparazione dell'mtDNA^{[1][5]}.

Si distinguono due tipi di mutazioni dell'mtDNA: le mutazioni puntiformi e le delezioni; queste ultime sono solitamente di grandi dimensioni^{[1][2]}. Per essere trasmessa, una mutazione dev'essere presente nella cellula uovo fecondata. La mutazione può essere stata trasmessa alla donna dalla propria madre, nel qual caso la mutazione è presente in tutte le cellule della donna, oppure può essere insorta *de novo* nella cellula uovo.

Nel prodotto del concepimento tutte le cellule contengono una certa percentuale di mtDNA mutato. Sono state riscontrate leggere variazioni di questa percentuale in diversi distretti dell'organismo, nonché nel contesto di un singolo organo o tessuto^[5]. Questa eterogeneità è ascrivibile ad una ripartizione casuale delle molecole di mtDNA durante le divisioni mitotiche e forse ad una diversa efficienza di replicazione fra mtDNA normale e mutato^{[2][5]}. È stato notato che la percentuale di mtDNA mutato in un distretto corporeo può variare nel corso del tempo, tendendo ad aumentare nei tessuti post-mitotici (ad esempio il tessuto nervoso, il muscolo scheletrico e il cuore) e a diminuire nei tessuti mitoticamente attivi (compreso il sangue)^[5].

In base a quanto detto in precedenza si possono dedurre agevolmente le caratteristiche principali delle patologie dovute a mutazioni dell'mtDNA. Queste patologie sono disordini generalmente sistemici a trasmissione matrilineare, che insorgono quando la percentuale media di mtDNA mutato supera una soglia critica, stimata pari al 60% nel caso delle delezioni e del 90% circa per le mutazioni puntiformi^[11]. È ragionevole ritenere che il tipo e la gravità delle manifestazioni cliniche dipendono dalla percentuale media di mtDNA mutato nell'organismo e nei singoli distretti corporei (si veda il paragrafo 1.4).

Un aspetto fondamentale della patologia mitocondriale è l'imprevedibilità della trasmissione matrilineare. Ad esempio, una donna asintomatica o paucisintomatica può generare un figlio gravemente affetto e in una fratria il fenotipo clinico può variare notevolmente.

L'ipotesi del "collo di bottiglia mitocondriale" (*mitochondrial bottleneck*) tenta di spiegare queste irregolarità nella trasmissione^{[1][5][12]}. Durante l'oogenesi le molecole di mtDNA si riducono drasticamente, poi le molecole residue si replicano. Il tipo di molecole di mtDNA selezionate da questo collo di bottiglia determina il fenotipo clinico

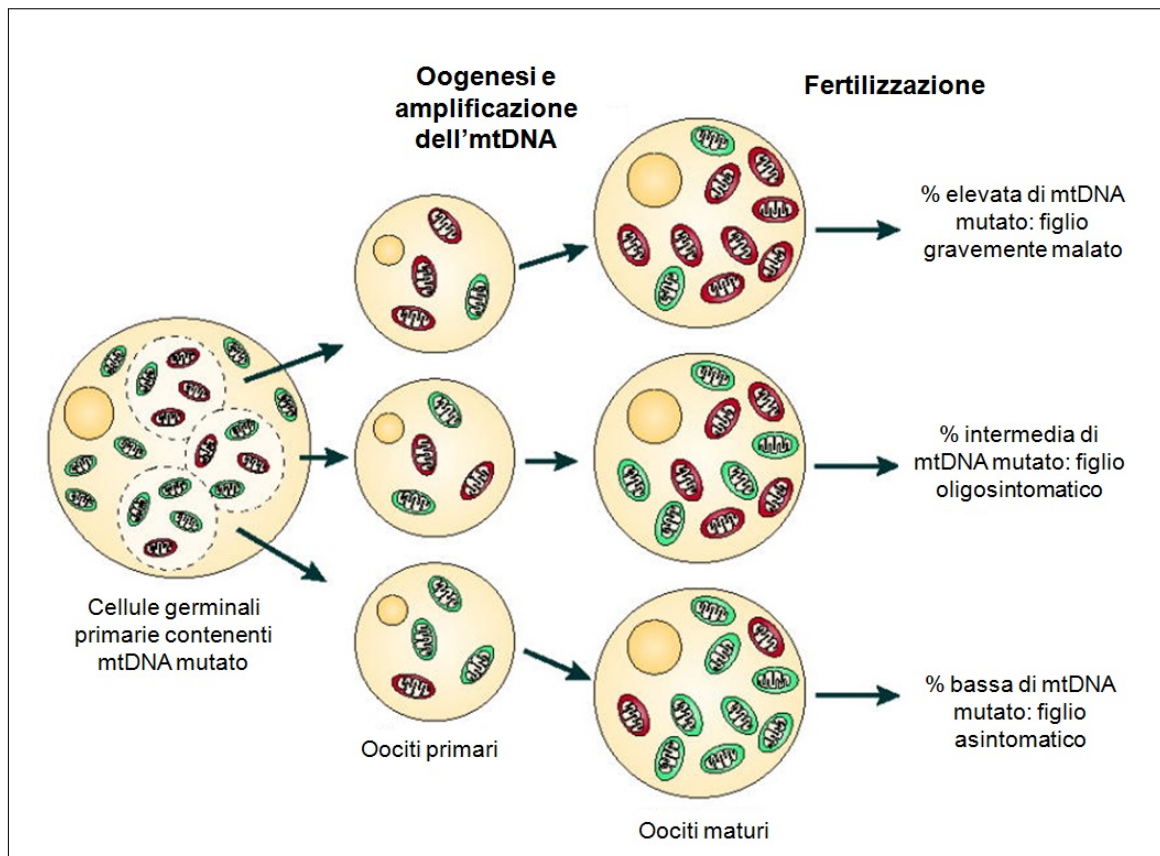


Figura 1.5: Il collo di bottiglia mitocondriale

Durante il passaggio da cellule germinali primarie (oogoni) ad oociti primari si verifica una drastica riduzione del numero di mitocondri. La maturazione degli oociti è associata ad una moltiplicazione di questi mitocondri. La combinazione di riduzione e amplificazione del numero di mitocondri (quindi dell' mtDNA) determina una variazione casuale del carico mutazionale fra le cellule germinali primarie e gli oociti maturi ed è responsabile dei livelli variabili di mtDNA riscontrabili nella progenie di donne con mutazioni dell' mtDNA. Nell'immagine, i mitocondri contenenti mtDNA mutato sono rappresentati in rosso, i mitocondri con mtDNA normale sono raffigurati in verde; i nuclei sono rappresentati in giallo. *Adattata da Taylor et al., 2005^[12].*

finale^{[1][14]} (Figura 1.5). L'ipotesi del collo di bottiglia mitocondriale è sostenuta da molte evidenze sperimentali^{[13][14][15]} ed è accettata da tutta la comunità scientifica.

La funzione mitocondriale dipende da numerose proteine di sintesi nucleare^{[1][2]}. Le mutazioni dei geni codificanti per queste proteine possono determinare una disfunzione mitocondriale e quadri di patologia sistemica; la trasmissione di questi disturbi può essere autosomica dominante, autosomica recessiva o legata al cromosoma X^[1].

Chinnery *et al.* distinguono le mutazioni patogenetiche dell' nDNA in quattro gruppi:

- mutazioni che riducono la stabilità dell' mtDNA;
- mutazioni in geni nucleari codificanti per proteine della catena respiratoria mitocondriale;

- mutazioni che alterano la traduzione di geni mitocondriali;
- mutazioni che alterano la divisione mitocondriale e la fusione mitocondriale^[1].

L'instabilità dell'mtDNA deriva principalmente da un'alterata replicazione del genoma mitocondriale^[1]. Il gene POLG, presente nel DNA nucleare (nDNA), codifica per la polimerasi γ , l'unica polimerasi attiva sull'mtDNA; le mutazioni del gene POLG costituiscono le cause di gran lunga più comuni di instabilità del genoma mitocondriale^{[1][16]}. Queste mutazioni possono infatti determinare mutazioni puntiformi o delezioni dell'mtDNA^{[1][17]}. Altre mutazioni che compromettono la stabilità dell'mtDNA riguardano un'elicasi mitocondriale, una traslocasi dei nucleotidi dell'adenina, una timidina fosforilasi, una timidina chinasi o una deossiguanosina chinasi^[1].

Proteine nucleari entrano nella costituzione di tutti i complessi della catena respiratoria^[18]. Nel caso del complesso I, ci sono almeno 46 subunità di sintesi nucleare e solo 7 codificate dall'mtDNA; mutazioni delle prime subunità determinano anomalie funzionali del complesso I che si traducono in quadri di patologia sistemica o in quadri sindromici definiti^[1]. Tutte le subunità del complesso II sono codificate dall'nDNA; mutazioni di queste proteine, così come delle subunità nucleari dei complessi III e IV, possono determinare vari quadri clinici a trasmissione mendeliana^[1]. Mutazioni nelle componenti nucleari del complesso V (ATP sintasi) sono state descritte ma sono molto rare^[1].

Varie mutazioni dell'nDNA alterano l'efficacia della sintesi proteica mitocondriale. Anche in questo caso sono state descritti vari quadri clinici, con diverse modalità di trasmissione^{[1][20]}. Infine, alcune proteine di sintesi nucleare regolano la fusione e la fissione dei mitocondri; la loro mutazione determina alterazioni funzionali dei mitocondri ed è stata associata a quadri di patologia sistemica^[1].

1.3 Fisiologia mitocondriale

I mitocondri sono coinvolti in numerosi processi fisiologici: produzione di ATP, sintesi e degradazione di macromolecole organiche (carboidrati, proteine, lipidi), termogenesi, regolazione dei livelli citoplasmatici di calcio, innesco dell'apoptosi, produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), sintesi del gruppo eme e di ormoni steroidei^{[19][20]}.

I mitocondri operano la sintesi e la degradazione di acidi grassi e proteine. Questi organelli sono anche la sede del ciclo di Krebs, nota come la via finale comune del metabolismo perché consente di convertire i prodotti del catabolismo di carboidrati, lipidi e proteine in molecole di anidride carbonica e acqua, con la contestuale riduzione di trasportatori di protoni ed elettroni: nicotinammide adenina dinucleotide (NAD) e flavin adenin dinucleotide (FAD). Le forme ridotte di questi cofattori (NADH e FADH₂) cedono protoni

ed elettroni alla catena respiratoria, localizzata nella membrana mitocondriale interna. I complessi I, III e IV della catena respiratoria ossidano NADH e FADH₂ e utilizzano l'energia così ottenuta per trasportare i protoni attraverso la membrana mitocondriale interna, creando un gradiente elettrochimico^[21]. Il gradiente protonico viene poi utilizzato per attivare l'enzima ATP sintasi (complesso V della catena respiratoria), che catalizza la sintesi di ATP, la principale fonte di energia per la cellula^{[20][21]}.

A livello mitocondriale avviene la produzione di calore per le reazioni chimiche che si verificano in questi organelli e per la presenza di proteine disaccoppianti (*Uncoupling Proteins*, UCP). Le UCP sono canali ionici che consentono di dissipare il gradiente protonico esistente a cavallo della membrana mitocondriale interna^{[19][22]}. L'espressione delle isoforme note (UCP1-5) è tessuto-specifica^[23].

I mitocondri regolano anche i livelli citoplasmatici di calcio^[24]. Non sono ancora stati completamente chiariti i meccanismi molecolari con cui i mitocondri internalizzano o rilasciano gli ioni calcio; si ritiene che esistano vari sistemi di regolazione delle dinamiche del calcio e che tessuti diversi utilizzino sistemi differenti^[24]. Fra i principali meccanismi caratterizzati si ricordano un trasportatore mitocondriale del calcio (*mitochondrial calcium uniporter*), uno scambiatore calcio-protoni e una proteina transmembrana nota con l'acronimo LETM1 (*leucine-zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1*); quest'ultima medierebbe anche la fuoriuscita del calcio dai mitocondri^[24].

Un accumulo eccessivo di calcio nei mitocondri sembra determinare l'apertura di un canale proteico a livello della membrana mitocondriale interna (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP), innescando in questo modo l'apoptosi^[25]. Si ritiene che questo meccanismo sia cruciale nel danno miocardico da ischemia e riperfusione, una condizione in cui si verifica un sovraccarico cellulare di calcio^[25].

Nel danno da ischemia e riperfusione è stata implicata anche un'eccessiva produzione di ROS^{[25][26]}. Le ROS sono prodotte normalmente a livelli molto bassi dalla catena respiratoria. In passato si riteneva che queste molecole fossero unicamente dannose per le cellule, dato che ad alte concentrazioni esse determinano un danno ossidativo e la morte cellulare^[26]. Tuttavia, è stato dimostrato che la produzione di livelli bassi-moderati di ROS è essenziale per la regolazione di vari processi cellulari (espressione genica, trasduzione del segnale, adattamento cellulare a condizioni di stress)^[27]. Una fine regolazione dei livelli cellulari di ROS è quindi essenziale e viene operata dai mitocondri mediante un equilibrio fra produzione e degradazione di queste molecole^[27]. Fra i principali enzimi deputati alla degradazione delle ROS ci sono la superossido dismutasi e la glutatione reduttasi, localizzate a livello mitocondriale, e la catalasi, che viene espressa in altri organelli cellulari, i perossisomi^{[26][27]}.

I mitocondri operano anche la sintesi del gruppo eme, localizzato in varie proteine, tra cui le principali sono emoglobina, mioglobina e alcune subunità della catena respiratoria^[28]. Infine, vari enzimi implicati nella sintesi degli ormoni steroidei si localizzano a livello mitocondriale^[29].

1.4 Patogenesi delle malattie mitocondriali

Numerose mutazioni sono state correlate con quadri patologici ascrivibili ad una disfunzione mitocondriale. Lo spettro delle mutazioni note è ampio ed è stato presentato, nelle sue linee generali, nel paragrafo 1.2. Il comune denominatore di queste mutazioni sembra essere la capacità di causare una disfunzione globale dei mitocondri, alterando processi come la sintesi proteica o la replicazione del genoma mitocondriale^[18]. È verosimile che l'alterazione delle varie funzioni in cui i mitocondri sono implicati possa contribuire alle eterogenee manifestazioni cliniche della malattia mitocondriale, discusse nel paragrafo 1.5. In effetti, nella patogenesi delle patologie mitocondriali sono state ipotizzate anomalie di tutti i processi descritti nel paragrafo 1.3.

Dato che i mitocondri costituiscono le sedi della produzione energetica cellulare e che gli organi con maggiore fabbisogno energetico costituiscono i bersagli privilegiati della malattia mitocondriale (si veda il paragrafo 1.5), l'alterazione della sintesi di ATP è stata la prima ipotesi patogenetica formulata^[18]. Questa alterazione è stata riscontrata *in vivo* mediante spettroscopia RM con ³¹P a livello cerebrale o muscolare scheletrico ed è stata ampiamente documentata in fibroblasti e cellule ematiche di pazienti con patologia mitocondriale^{[30][31]}.

È stato riportato che linfociti derivanti da pazienti con la mutazione m.8993T>G, associata con un fenotipo clinico severo, presentavano un grave deficit della sintesi di ATP, mentre un'altra mutazione nello stesso gene, m.8993T>C, responsabile di manifestazioni cliniche più lievi, determinava principalmente un'eccessiva produzione di ROS^{[18][32]}. Un aumento dei livelli cellulari di ROS è stato riscontrato anche in particolari linee cellulari (*cybrid cell lines*: cellule umane immortalizzate svuotate del loro mtDNA e riempite di mtDNA mutato derivante da pazienti umani)^{[33][34]}. Lo stress ossidativo sembra particolarmente marcato in presenza di mutazioni che alterano l'attività dei complessi I e III della catena respiratoria, i quali sono i principali produttori di ROS^[18]. È stata documentata una correlazione inversa fra l'attività residua del complesso I e l'entità della produzione di ROS^[35]; non sembra invece esistere alcuna correlazione fra l'entità della produzione di ROS e la gravità del fenotipo clinico^{[18][35]}. Una correlazione diretta fra gravità del difetto di sintesi di ATP e gravità delle manifestazioni cliniche è verosimile ma non è ancora

stata dimostrata definitivamente^[18]. Non è stata altresì verificata la suggestiva ipotesi di DiMauro *et al.*, secondo cui le mutazioni responsabili di severe manifestazioni cliniche determinano un grave deficit della sintesi di ATP e un modesto stress ossidativo, mentre le mutazioni che causano fenotipi clinici più lievi determinano principalmente un grave stress ossidativo^[18].

Alterazioni dell'omeostasi del calcio sono state documentate utilizzando il modello delle *cybrid cell lines*^[18]. Le cellule esprimenti mutazioni associate alle sindromi MELAS e MERRF (si veda il paragrafo 1.5) presentavano aumenti abnormi delle concentrazioni citoplasmatiche di calcio in seguito all'induzione del rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico liscio; questo fenomeno dimostrava una ridotta capacità dei mitocondri di internalizzare il calcio^{[36][37]}. Le concentrazioni citoplasmatiche di calcio sono rimaste sostanzialmente stabili in linee cellulari esprimenti la mutazione m.8993T>G^[36], che pure è responsabile di un fenotipo clinico grave (sindrome di Leigh; si veda il paragrafo 1.5). La presenza di alterazioni nelle dinamiche del calcio dovrebbe essere valutata in ulteriori studi, dato che queste alterazioni sono potenzialmente responsabili di apoptosi e di alterazioni dell'eccitabilità dei neuroni e dei cardiomiociti. Tra l'altro, l'aumentata suscettibilità all'apoptosi di cellule con alterazioni della funzione mitocondriale è verosimile ma non ancora dimostrata.

Per quanto riguarda il deficit nella termogenesi, è noto che alcuni pazienti con patologia mitocondriale presentano problemi di adattamento in ambienti freddi. La temperatura cerebrale (stimata a partire dai risultati della spettroscopia RM con ¹H) è risultata minore in 5 pazienti con mutazioni dell'mtDNA e senza impegno evidente del sistema nervoso centrale rispetto a controlli sani. È stata riscontrata anche una correlazione inversa fra carico mutazionale e riduzione della temperatura cerebrale, suggerendo che all'aggravarsi della disfunzione mitocondriale si associa una riduzione progressiva della produzione di calore. Ulteriori studi sono necessari per verificare questa ipotesi.

Infine, si può ipotizzare che la ridotta sintesi del gruppo eme sia responsabile del deficit midollare riscontrato nella sindrome di Pearson (si veda il paragrafo seguente) e che la diminuita sintesi degli ormoni steroidei determini l'ipogonadismo, un possibile quadro clinico della patologia mitocondriale (si veda il paragrafo seguente). Tuttavia, queste ipotesi non sono state finora valutate.

L'eterogeneità delle manifestazioni cliniche della malattia mitocondriale verrà discussa nel paragrafo 1.5. Fra le possibili cause di eterogeneità, DiMauro *et al.* elencano le seguenti:

1. Tipo di mutazione (associazione genotipo-fenotipo).
 - Mutazioni diverse causano fenotipi diversi: ad esempio, la maggior parte dei casi di MELAS e MERRF sono causate da singole mutazioni (si veda il paragrafo 1.5). Le delezioni singole dell' mtDNA causano prevalentemente tre quadri sindromici (sindrome di Kearns-Sayre, sindrome di Pearson, oftalmoplegia esterna cronica progressiva; si veda il paragrafo 1.5)^[18]. Mutazioni in geni nucleari che codificano per subunità del complesso I sono state associate principalmente con la sindrome di Leigh e con quadri di encefalomiopatia^[1] (si veda il paragrafo 1.5). Non è ancora stata fornita una spiegazione convincente di queste associazioni più o meno strette fra genotipo e fenotipo^{[1][18]}.
 - Mutazioni diverse in uno stesso gene possono causare manifestazioni cliniche differenti. Ne sono esempi emblematici due coppie di mutazioni nel gene di una subunità dell' ATP sintasi: m.8993T>G/m.8993T>C (che determina la sostituzione aminoacidica leucina > arginina) e m.9176T>G/m.9176T>C (che causa la sostituzione leucina > prolina). Le mutazioni m.8993T>G e m.9176T>G causano quadri clinici più gravi rispetto alle altre due mutazioni, forse per una maggiore compromissione della sintesi di ATP^[18].
2. Grado di eteroplasmia: questo punto riguarda solo le patologie da mutazione dell' mtDNA. È intuitivo che all'aumentare della percentuale di mtDNA mutato sull' mtDNA totale aumenti la gravità del quadro clinico^[18]. Questo concetto è ben esemplificato dalla mutazione m.8993T>G: quando il carico mutazionale è elevato (circa 90%) la malattia esordisce nell'infanzia come sindrome di Leigh, mentre quando il carico mutazionale è minore (circa 70%) compare un'encefalomiopatia ad insorgenza tardiva e di gravità moderata^[38].
3. Distribuzione eterogenea del carico mutazionale in sedi diverse: ad esempio, è stato dimostrato che la mutazione m.3243A>G è particolarmente abbondante nelle pareti delle arteriole cerebrali, il che potrebbe essere correlato in qualche modo con la frequente occorrenza di episodi simil-ictali nella sindrome MELAS^[39]. La mutazione m.8344A>G è molto espressa a livello cerebellare, in accordo con il comune riscontro di disturbi motori nella sindrome MERRF^[40]. Le mutazioni associate con la sindrome LHON si concentrano nelle cellule gangliari della retina^[41], mentre la mutazione del tRNA del glutammato si localizza pressoché unicamente nel muscolo scheletrico^[42]. Il motivo di quest'eterogenea distribuzione spaziale dell' mtDNA mutato non è nota^[18]; è verosimile che una determinata mutazione sia selezionata positivamente

in un certo distretto corporeo e quindi vi diventi più rappresentata, ma le cause ed i meccanismi di questa selezione sono sconosciuti^[18].

1.5 Presentazione clinica della patologia mitocondriale

La malattia mitocondriale può esordire a qualunque età e può avere una gravità molto variabile (da forme subcliniche a forme molto gravi e rapidamente letali). Si può riscontrare il coinvolgimento di un singolo organo o più frequentemente un quadro di patologia sistemica^[43]. Possono essere interessati quasi tutti gli organi e gli apparati, anche se quelli con maggiori richieste energetiche (sistema nervoso centrale, muscolo scheletrico, cuore, occhio e orecchio interno) sono più frequentemente coinvolti^[44].

Le principali manifestazioni di interessamento del sistema nervoso centrale sono: atassia, attacchi epilettici, episodi simil-ictali, disturbi del movimento, emicrania, disturbi cognitivi, encefalopatia^{[43][44]}.

L'atassia è solitamente di origine cerebellare; può costituire una manifestazione isolata, ma molto più frequentemente rientra in un quadro di patologia sistemica^{[43][44]}.

Gli attacchi epilettici possono essere segni precoci o tardivi di patologia mitocondriale, ma raramente sono isolati. I pazienti presentano spesso crisi focali con caratteristiche diverse e resistenti al trattamento; in alcuni casi si riscontrano quadri specifici, ad esempio l'encefalopatia epilettica ad esordio precoce, l'epilessia mioclonica progressiva, le sindromi di West o di Lennox-Gastaut. Non ci sono *pattern* elettroencefalografici caratteristici^[45].

Gli episodi simil-ictali sono caratterizzati da cefalea, encefalopatia, attacchi epilettici, alterazioni dello stato di coscienza, deficit focali, a volte vomito. Simulano eventi cerebrovascolari e vengono attribuiti ad alterazioni del metabolismo cerebrale. Questi episodi sono caratteristici della sindrome MELAS (si veda il seguito di questo paragrafo)^{[43][45]}.

Fra i disturbi del movimento riscontrabili ci sono il mioclono (breve e involontaria contrazione di un muscolo o di un gruppo di muscoli), la distonia (alterazione del tono muscolare), la coreoatetosi (associazione di movimenti a scatti, molto rapidi, e movimenti molto ampi e lenti), il parkinsonismo. Il mioclono è relativamente specifico della sindrome MERRF, la distonia della sindrome di Leigh; per una descrizione di queste sindromi si veda il seguito di questo paragrafo^{[43][45]}.

L'emicrania può essere con o senza aura; i fattori scatenanti sono solitamente quelli comuni (stanchezza, disidratazione, ipoalimentazione), ma la soglia sembra particolarmente bassa^[43].

I disturbi cognitivi si possono manifestare in età infantile, con ritardo psicomotorio, oppure nell'età adulta, con compromissione cognitiva e demenza. Infine, si può riscontrare

un'encefalopatia, con estesa compromissione psicomotoria^[43].

La compromissione del muscolo scheletrico è molto frequente e si manifesta con alterazioni della motilità oculare e ridotta tolleranza allo sforzo^[46].

La paresi della muscolatura oculare estrinseca determina limitazioni della motilità oculare e ptosi, quest'ultima molto frequente e talvolta isolata^[43].

La miopatia comincia di solito nell'adolescenza o nella prima età adulta, è lentamente ingravescente e simmetrica, con interessamento prevalente della muscolatura del tronco e di quella prossimale degli arti^[43]. Si riscontra una limitazione ingravescente della tolleranza allo sforzo, con crampi, mialgie, facile affaticabilità per sforzi di entità progressivamente minore^[43]. Viene compromessa progressivamente la muscolatura respiratoria, determinando talvolta una franca insufficienza respiratoria di tipo II (ipossica e ipercapnica). I livelli di creatina chinasi e di lattato possono essere incrementati basalmente oppure possono aumentare in modo abnorme in risposta all'esercizio^{[44][45]}. L'elettromiogramma può essere nei limiti oppure presentare alterazioni indicative di miopatia ma aspecifiche. La spettroscopia RM con ³¹P del muscolo scheletrico mostra tipicamente una riduzione dei livelli di ATP, mentre la spettroscopia RM con ¹H può rivelare un aumento del rapporto tessuto adiposo/acqua, correlato con l'espansione dell'interstizio muscolare riscontrata all'esame istologico^[43]. Altre alterazioni istologiche piuttosto caratteristiche sono le fibre *ragged red* e/o negative alla colorazione per la citocromo c ossidasi (si veda il seguito di questo paragrafo)^[43].

I possibili quadri di coinvolgimento cardiaco verranno discussi nel paragrafo 2.1.

Per quanto riguarda l'interessamento degli organi di senso, le principali manifestazioni oftalmologiche sono le limitazioni della motilità oculare, la retinopatia e l'atrofia ottica (vedi seguito); l'ipoacusia neurosensoriale è piuttosto frequente e può essere anche una manifestazione isolata, ad esempio nei pazienti con mutazione m.1555A>G.^{[43][44]}

Per una visione complessiva delle principali manifestazioni cliniche della patologia mitocondriale, si veda la *Figura 1.6*.

Sono state individuate varie sindromi ad eziologia mitocondriale, anche se soltanto una minoranza dei pazienti con patologia mitocondriale soddisfa i criteri diagnostici per una di queste sindromi^[43].

È stato proposto di distinguere le sindromi a insorgenza nell'infanzia dalle sindromi a insorgenza nell'adolescenza o nell'età adulta. Fra le sindromi ad insorgenza nell'infanzia ci sono la sindrome di Leigh, la sindrome di Kearns-Sayre e la sindrome di Pearson^[45].

La sindrome di Leigh è una malattia neurologica progressiva caratterizzata da una degenerazione progressiva del tronco encefalico e dei nuclei della base^[48]. La prevalenza alla nascita è di circa 1 su 36000. L'esordio dei sintomi avviene entro i primi dodici mesi ma,

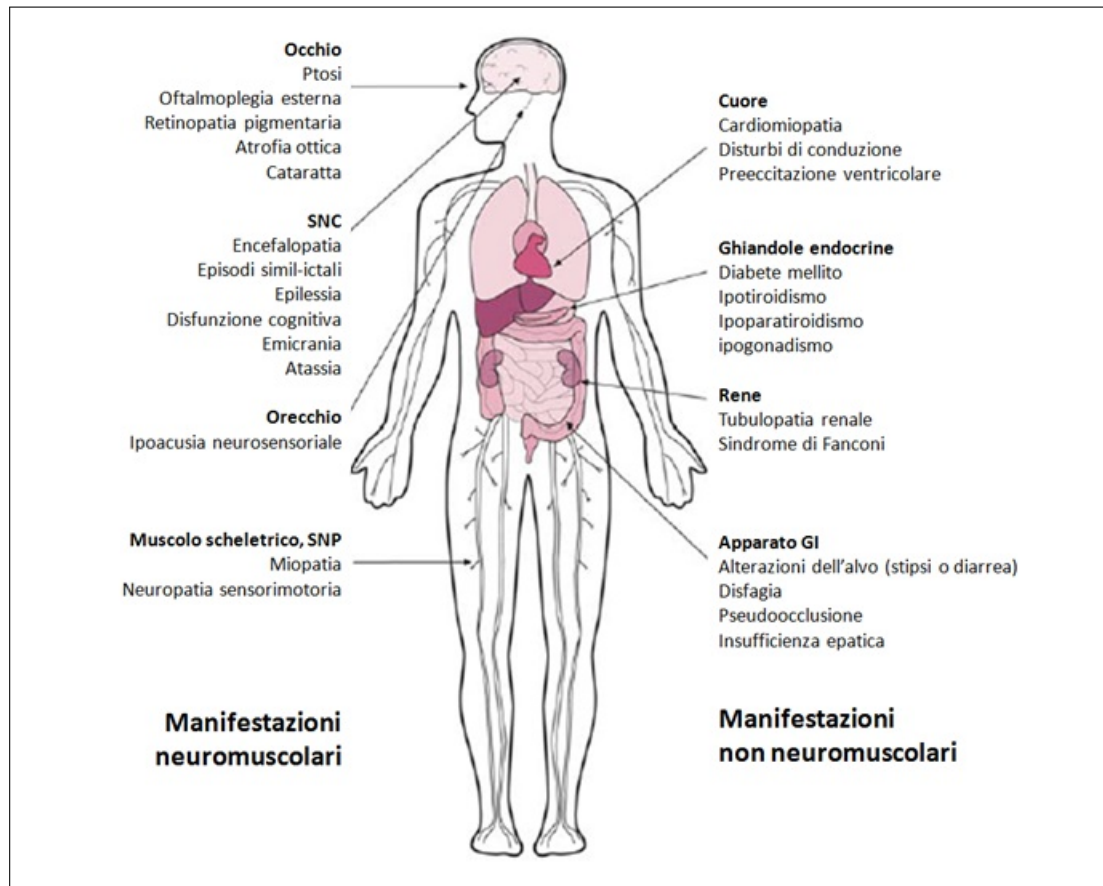


Figura 1.6: Possibili manifestazioni cliniche della patologia mitocondriale.

Vari organi e apparati possono essere bersaglio della malattia mitocondriale. I più frequenti quadri di impegno d'organo sono riassunti in questa immagine. Abbreviazioni: GI: gastrointestinale. SNC: sistema nervoso centrale. SNP: sistema nervoso periferico. *Adattata da Bates et al., 2012* ^[47].

in rari casi, la malattia si manifesta nel corso dell'adolescenza o nella prima età adulta^[48]. I primi sintomi più comuni sono la mancata acquisizione delle tappe dello sviluppo motorio, l'ipotonìa con incapacità di reggere il capo, il vomito ricorrente e i disturbi motori. Subentrano in seguito segni piramidali e extrapiramidali, nistagmo, disturbi del respiro, alterazioni della motilità oculare e neuropatia periferica^[49].

La maggior parte delle mutazioni si localizza nel genoma nucleare, principalmente nei geni codificanti per le subunità dei complessi I e II della catena respiratoria^[49]. La trasmissione è solitamente autosomica recessiva. Il 10-30% dei pazienti presenta mutazioni dell'mtDNA, spesso m.8993T>G o m.8993T>C, che alterano l'attività dell'ATP sintasi. Questi pazienti presentano un'elevata percentuale di mtDNA mutato nelle cellule^[49] (si veda il paragrafo 1.4). La presenza della mutazione in una percentuale più bassa si associa a un esordio più tardivo e un fenotipo più lieve, solitamente la sindrome neuropatia, atassia e neuropatia, atassia e retinite pigmentosa (si veda il seguito di questo paragrafo)^[49].

La diagnosi si basa sull'*imaging* cerebrale, che evidenzia la presenza di lesioni a carico del tronco encefalico e dei nuclei della base. I livelli del lattato sono aumentati nel liquor e spesso anche nel sangue^{[48][49]}.

Come per tutti i disturbi mitocondriali, la diagnosi eziologica si basa principalmente su analisi biochimiche e genetiche (si veda il paragrafo 1.7) e non è disponibile un trattamento specifico (si veda il paragrafo 1.8). La prognosi non è buona e l'aspettativa di vita è ridotta a pochi anni nella maggior parte dei casi^[49].

La sindrome di Kearns-Sayre è diagnosticata in presenza di ptosi e/o oftalmoparesi da delezione singola del mtDNA in associazione ad almeno una delle seguenti caratteristiche: retinopatia, atassia, difetti di conduzione cardiaci, ipoacusia, ritardo nella crescita, deficit cognitivo, cardiomiopatia^[50].

La prevalenza è stimata tra 1 e 3/100.000. La malattia ha un'evoluzione lenta, con la comparsa di nuovi sintomi e il lento peggioramento dei sintomi già presenti. Alcuni casi della sindrome di Pearson (si veda il seguito di questo paragrafo) evolvono nella sindrome di Kearns-Sayre^{[50][51]}.

La sindrome è dovuta ad una delezione di grandi dimensioni del DNA mitocondriale. I sintomi sono presenti solo se la percentuale del DNA mutato è significativa; la soglia corrisponde a circa il 60% nei muscoli scheletrici striati^[50]. La maggior parte dei casi di sindrome di Kearns-Sayre è sporadica, dato che le delezioni del DNA mitocondriale vengono trasmesse solo eccezionalmente (si veda il paragrafo 1.3).

La diagnosi differenziale si pone con le malattie che presentano quadri simili, come la sindrome di Pearson o l'oftalmoplegia cronica. Il trattamento è sintomatico. La prognosi dipende essenzialmente dal numero degli organi interessati; la malattia evolve lentamente,

nel corso di decenni^{[50][51]}.

La sindrome di Pearson è caratterizzata da alterazioni ematologiche e insufficienza pancreatica esocrina. Le alterazioni ematologiche compaiono generalmente nell'infanzia e comprendono l'anemia sideroblastica, talvolta associata a neutropenia e trombocitopenia. I pazienti presentano insufficienza pancreatica esocrina che causa malassorbimento e diarrea ^[52]. Nel corso della malattia possono comparire disturbi renali (tubulopatia), disturbi epatici (epatomegalia, colestasi), crisi metaboliche con acidosi lattica, in alcuni casi disturbi cardiaci e atrofia splenica^[52].

Sono stati descritti finora circa 60 casi. La sindrome di Pearson è sporadica ed è stata associata a varie delezioni del DNA mitocondriale^[52].

Il trattamento è sintomatico. L'evoluzione è spesso fatale prima dell'età di tre anni, a causa delle crisi metaboliche o dell'insufficienza epatocellulare. I pazienti che sopravvivono alla prima infanzia presentano tipicamente un'evoluzione fenotipica: i sintomi ematologici regrediscono spontaneamente, mentre compaiono e si aggravano i sintomi neurologici e miopatici. Alcuni sviluppano una sindrome di Keans-Sayre^{[43][52]}.

Fra le sindromi che insorgono nell'adolescenza o nell'età adulta ci sono le più note sindromi mitocondriali: encefalopatia mitocondriale, acidosi lattica, episodi simil-ictali (MELAS), oftalmoplegia esterna cronica progressiva (CPEO), neuropatia, atassia e retinite pigmentosa (NARP), neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON), epilessia mioclonica con fibre *ragged red* (MERRF)^[45].

La sindrome MELAS (encefalomiopatia mitocondriale con acidosi lattica e episodi simili a ictus) è una patologia progressiva caratterizzata da disturbi neurologici acuti suggestivi di eventi ischemici cerebrali^[53]. Gli episodi simil-ictali compaiono dall'infanzia o dalla prima adolescenza e si manifestano con cefalea, vomito, alterazioni focali (ad esempio, emiparesi ed emianopsia)^[54]. Fra le altre manifestazioni cliniche si ricordano deficit motori, ipoacusia, diabete mellito, cardiomiopatia, ritardo dello sviluppo, disturbi cognitivi^{[53][54]}.

La tomografia computerizzata o la risonanza magnetica dell'encefalo consentono di escludere lesioni a carico di singoli territori vascolari^[54]. La concentrazione anomala di lattato è frequente nel sangue e pressoché costante nel liquido cerebrospinale. La biopsia muscolare è anomala nell'85% dei pazienti, mostrando fibre *ragged red* (*Figura 1.7*) e negative per la citocromo c ossidasi (*Figura 1.8*).^[55]

L'80% dei casi è dovuto alla mutazione 3243A>G nel gene del tRNA della leucina (cosiddetta "mutazione MELAS")^[53]. Altre mutazioni nello stesso gene (ad es. m.3271T>C), in altri geni di tRNA (ad es. m.1642G>A) o in geni codificanti per polipeptidi (ad es. m.9957T>C, m.12770A>G, m.13045A>C, m.13513G>A, m.13514A>G) possono essere causa di MELAS^[56]. La mutazione è trasmessa per via matrilineare.

Il decorso della malattia è ingravescente e segnato dalla ricorrenza degli episodi simil-ictali, che possono essere anche gravi o fatali. Il beneficio della terapia è modesto^[57].

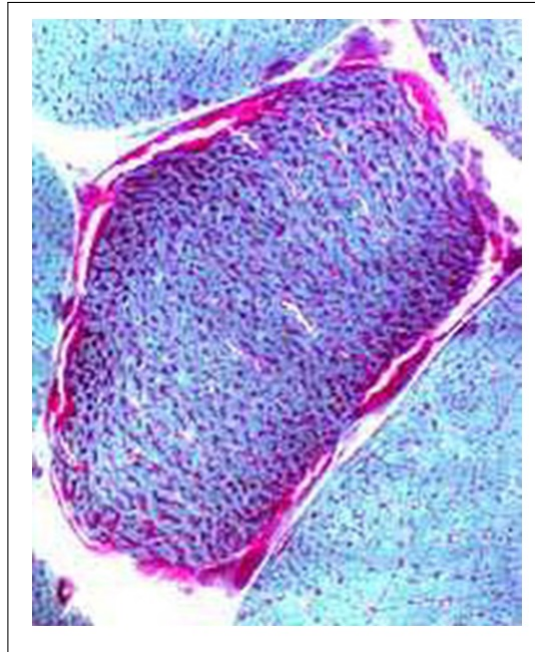


Figura 1.7: **Fibre muscolari ragged red.**

Questo aspetto caratteristico delle fibre muscolari striate è dovuto ad un accumulo di mitocondri anomali, prevalentemente al di sotto del sarcolemma. I mitocondri formano aggregati evidenziati in rosso con la colorazione di Gomori modificata. Gli aggregati di mitocondri rendono irregolare il sarcolemma, conferendo un aspetto "irto, frastagliato"(in inglese *ragged*) alle fibre. *Fonte:* <http://neuromuscular.wustl.edu/pathol/mitochondrial.htm>.

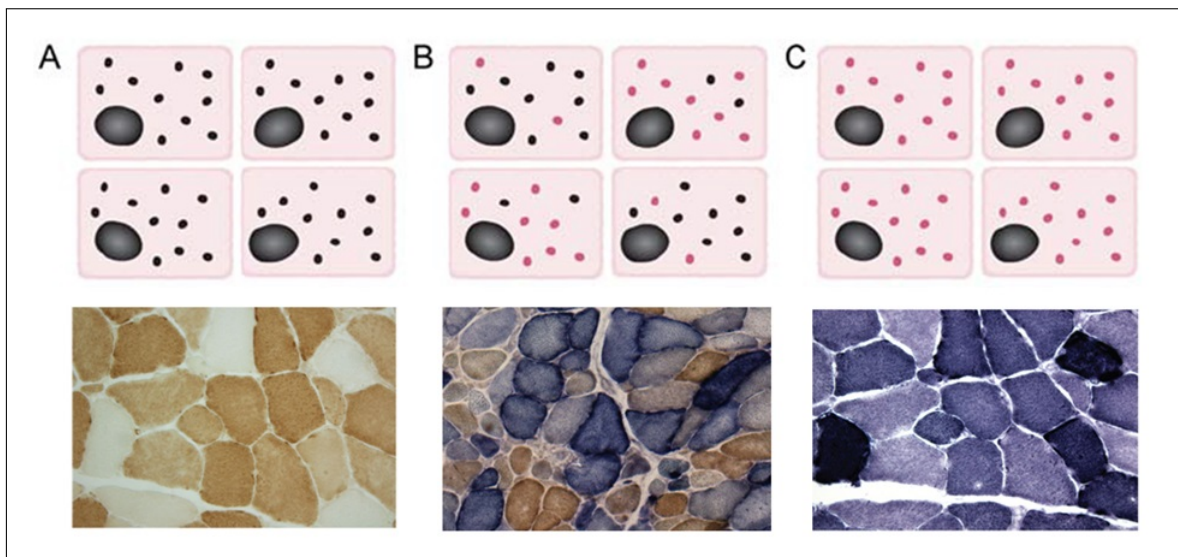


Figura 1.8: **Fibre muscolari positive e negative per la citocromo c ossidasi**

In una biopsia muscolare di un soggetto normale (pannello A), tutte le fibre presentano positività per la citocromo c ossidasi. Nella biopsia muscolare di un soggetto con mutazione dell'mtDNA in eteroplasmia (pannello B) si riscontra una commistione di fibre positive per la citocromo c ossidasi (gialle) e fibre negative (blu). Nella biopsia muscolare di un soggetto con una mutazione dell'mtDNA in omoplasmia (pannello C) si riscontra un'assenza di attività citocromo c ossidasi. *Adattata da Bates et al.*^[47], 2013, e da DiMauro et al., 2013.^[44]

La sindrome CPEO (oftalmoplegia esterna cronica progressiva) costituisce una delle più comuni presentazioni della patologia mitocondriale negli adulti^[58]. È caratterizzata da una debolezza ingravescente della muscolatura oculare estrinseca, con disturbi della motilità oculare e ptosi palpebrale. Il coinvolgimento oculare può essere isolato^[58]. Negli altri casi si riscontra una miopatia scheletrica, che coinvolge per lo più la muscolatura del tronco e quella prossimale degli arti. Altre possibili manifestazioni cliniche sono: neurologiche (difetti cerebellari, neuropatia periferica, ipoacusia neurosensoriale), endocrine (diabete, ipogonadismo, ipoparatiroidismo), renali (tubulopatia), cardiaci (cardiomiopatia, disturbi di conduzione)^[58].

La prevalenza è sconosciuta. La base genetica è eterogenea: sono state individuate mutazioni puntiformi, delezioni del DNA mitocondriale, mutazione di geni nucleari. La CPEO va in diagnosi differenziale con la sindrome di Kearns-Sayre ed ha generalmente una buona prognosi^[58].

La sindrome NARP (Neuropatia, Atassia e Retinite Pigmentosa) è caratterizzata tipicamente dalla combinazione di neuropatia sensoriale-motoria, atassia cerebellare e cecità notturna^[59]. La sindrome NARP è una malattia a eredità materna, dovuta alla mutazione m.8993T>G nel gene che codifica per la subunità 6 dell'ATPasi. Quando presente in percentuale elevata nelle cellule, questa mutazione determina la comparsa della sindrome di Leigh^[59].

La sindrome NARP di solito colpisce i giovani adulti, con prevalenza stimata pari a 1/12.000 nella popolazione generale. Il trattamento è sintomatico e la prognosi discreta^{[43][59]}.

La sindrome LHON (neuropatia ottica ereditaria di Leber) è caratterizzata da una degenerazione del nervo ottico, che determina la comparsa di uno scotoma centrale e una perdita progressiva della vista; vengono interessati entrambi gli occhi simultaneamente o sequenzialmente^[60]. All'esame oftalmoscopico si riscontrano rigonfiamento della testa del nervo ottico, tortuosità vascolare, microangiopatia. La tomografia a coerenza ottica conferma il rigonfiamento dello strato delle fibre nervose retiniche. L'esame del campo visivo rivela la presenza di scotomi centrali. L'acuità visiva è marcatamente ridotta^[60].

La LHON va in diagnosi differenziale con altre neuropatie ottiche su base genetica e la neurite ottica. La presenza di altri disturbi neurologici (deficit motori, distonia, tremore posturale, atassia cerebellare) può essere riscontrata nella LHON ma anche nella sclerosi multipla, una causa comune di neurite ottica^[60].

La prevalenza stimata della malattia va da 1/15.000 a 1/50.000. Oltre il 90% delle mutazioni si localizza nelle posizioni nucleotidiche 11778, 3460 o 14484. Tutte le mutazioni provocano alterazioni del complesso I della catena respiratoria^[60].

La LHON presenta una trasmissione matrilineare. La diagnosi si basa sulla valutazione oftalmologica e neurologica e sulle indagini genetiche. La prognosi è variabile: solitamente si riscontra una riduzione progressiva del visus, ma alcuni pazienti presentano una remissione parziale spontanea 1-2 anni dopo l'esordio della malattia^[60].

La sindrome MERRF (epilessia mioclonica con fibre *ragged red*) è un'encefalomiopatia caratterizzata da crisi epilettiche miocloniche^[61]. I pazienti di solito sviluppano epilessia mioclonica durante l'adolescenza o la prima età adulta, in associazione talvolta a sordità neurosensoriale, atrofia ottica, bassa statura o neuropatia periferica^[62]. In alcuni casi si riscontrano cardiomiopatia, retinite pigmentosa, oftalmoparesi e/o segni piramidali. La malattia è progressiva, con peggioramento dell'epilessia e comparsa di altri sintomi, come l'atassia, la sordità, la debolezza muscolare e la demenza^[63].

La sindrome MERRF è causata da mutazioni nel DNA mitocondriale. Più dell'80% dei pazienti presenta la mutazione m.8344A>G nel gene che codifica per il tRNA di trasporto della lisina. Sono state identificate anche altre mutazioni in altri geni che codificano per tRNA e nel gene MTND5^[62].

La diagnosi si basa sulla dimostrazione di un accumulo anomalo di lattato nel sangue o, più spesso, nel liquor e sui risultati della biopsia muscolare, che evidenzia la presenza di fibre muscolari negative alla citocromo c ossidasi e di fibre *ragged red*. La prevalenza è stata stimata in 0,9 su 100.000 nella popolazione generale^[63].

Non esistono trattamenti specifici. La prognosi in genere non è buona, a causa della progressione relativamente rapida della malattia. Tuttavia, la gravità varia considerevolmente a seconda dei casi^{[62][63]}.

1.6 Aspetti epidemiologici

Fino agli anni '80, le patologie mitocondriali erano considerate malattie eccezionalmente rare, la cui prevalenza stimata era di 1-2 casi su milione^[64]. Il sequenziamento del genoma mitocondriale umano^[65] e l'identificazione di mutazioni patogenetiche dell'mtDNA^{[66][67]} nei primi anni '90, hanno determinato un notevole interesse per la patologia mitocondriale ed hanno consentito i primi studi epidemiologici, secondo cui la prevalenza delle patologie mitocondriali è molto più comune di quanto ritenuto in precedenza; si ritiene attualmente che esse rientrino fra le più comuni malattie genetiche.

Gli studi epidemiologici sulla patologia mitocondriale pongono varie difficoltà, in termini di:

- selezione dei pazienti da sottoporre ad accertamenti diagnostici: complicata dal fatto che non esistono infatti segni o sintomi patognomonic di malattia mitocondriale e alcune manifestazioni cliniche (ad esempio la dispnea da sforzo) sono molto frequenti fra i pazienti mitocondriopatici, ma sono del tutto aspecifiche;
- esecuzione di test invasivi, come la biopsia muscolare: accettabile in pazienti con sospetto clinico di patologia mitocondriale, discutibile in familiari sani;
- interpretazione dei dati laboratoristici e genetici: talvolta difficoltosa^[64].

I primi studi epidemiologici hanno valutato singole mutazioni dell'mtDNA in pazienti con specifici fenotipi clinici^[64]. Ad esempio, la prevalenza della mutazione m.3243A>G è stata valutata in popolazioni di pazienti con diabete mellito^[68], ictus giovanile^[69], ipocusia neurosensoriale^[70] o altri disturbi^[60]. La prevalenza della mutazione m.3243A>G nel diabete mellito è stata stimata dallo 0,13% fino addirittura al 60%, a seconda della popolazione studiata e del disegno sperimentale^[64]. Studi con questa impostazione sono difficilmente confrontabili e forniscono dati di prevalenza relativi solo alla specifica popolazione in studio^[64].

Il primo studio di popolazione su una singola mutazione fu condotto in Finlandia da Majamaa *et al.*^[71]. Gli autori esaminarono database clinici per individuare pazienti con quadri clinici suggestivi di patologia mitocondriale, poi sottoposero questi pazienti ad indagini genetiche. La prevalenza stimata della mutazione m.3243A>G nella popolazione

generale era di almeno 16,3 casi/100.000^[67]. La prevalenza era particolarmente elevata in alcuni gruppi di pazienti, tra cui quelli con ipoacusia neurosensoriale (7,4%), ictus occipitale (6,9%), oftalmoplegia (13%), cardiomiopatia ipertrofica (14%)^[67]. Il primo studio di popolazione sulla patologia mitocondriale da mutazione dell'mtDNA fu condotto nell'Inghilterra nord-orientale^[72]. Valutando i pazienti indirizzati ad un centro di riferimento nell'arco di 15 anni ed eseguendo accertamenti diagnostici mirati, si individuò una prevalenza minima di 6,57/100.000; si stimò che circa 1 soggetto su 8.000 abitanti della regione avesse una patologia mitocondriale da mutazione dell'mtDNA o fosse a rischio di svilupparla^[68]. In base ai dati più recenti, questa prevalenza è pari ad almeno 1:5.000 nella popolazione generale^[47]. Si stima che la prevalenza di mutazioni patogenetiche dell'mtDNA, a carichi mutazionali relativamente bassi e non tali da determinare manifestazioni cliniche, sia relativamente elevata, circa pari a 1 su 200 nella popolazione generale^[47]. La prevalenza delle mutazioni patogenetiche nell'nDNA e delle relative manifestazioni cliniche non è ancora stata definitivamente chiarita.

1.7 Diagnosi di malattia mitocondriale

Lo spettro di manifestazioni cliniche della patologia mitocondriale è estremamente ampio. La presentazione clinica può orientare verso un disturbo mitocondriale, tuttavia la diagnosi richiede ulteriori indagini: la misurazione di indicatori del metabolismo ossidativo (ad esempio, livelli circolanti di lattato e rapporto lattato/piruvato nel sangue), la ricerca di anomalie numeriche o strutturali dei mitocondri nelle biopsie tissutali, analisi genetiche, valutazioni istochimiche ed analisi dei singoli complessi della catena respiratoria^{[73][74]}. In alcuni casi queste indagini forniscono risultati decisamente anomali, ma in molti casi l'interpretazione dei risultati è dubbia^{[73][74]}. La diagnosi di patologia mitocondriale è complicata ulteriormente dalla mancanza di criteri diagnostici standardizzati. I criteri proposti da Bernier *et al.* nel 2002^[73] non hanno trovato grande diffusione, probabilmente perché troppo complessi per essere utilizzati nella pratica clinica. In ogni caso, la loro presentazione può essere utile come inquadramento generale della diagnosi della patologia mitocondriale.

1. Criteri diagnostici maggiori

- Clinici: quadro sindromico tipico (ad es. MELAS, MERRF, sindrome di Leigh, sindrome di Pearson, sindrome di Kearns-Sayre, neuropatia ottica ereditaria di Leber)

oppure

quadro clinico sistemico senza altra spiegazione, con almeno 3 delle seguenti

manifestazioni (disturbi neurologici, miopatia, coinvolgimento cardiaco, danno renale, disturbi gastrointestinali, disfunzione epatica, patologia endocrina, ematologica, otologica, oftalmologica, dermatologica), *più* un decorso clinico progressivo oppure un'anamnesi familiare fortemente indicativa di una trasmissione matrilineare, *più* l'esclusione di altri disturbi metabolici o non metabolici.

- Istologici: >2% di fibre *ragged red* nella biopsia muscolare scheletrica.
- Enzimatici: >2% di fibre negative alla colorazione immunoistochimica per la citocromo c ossidasi (COX), <50 anni di età; >5% di fibre negative per la COX >50 anni; <20% di attività di un qualunque complesso della catena respiratoria in un tessuto; <30% di attività di un qualunque complesso della catena respiratoria in una linea cellulare; <30% di attività di uno stesso complesso della catena respiratoria in 2 o più tessuti.
- Funzionali: tasso di sintesi di ATP nei fibroblasti >3 deviazioni standard sotto la media.
- Molecolari: identificazione di una mutazione sicuramente patogenetica nell'nDNA o nell'mtDNA.

2. Criteri diagnostici minori

- Clinici: sintomi compatibili con un difetto della catena respiratoria.
- Istologici: 1-2% di fibre *ragged red* fra 30 e 50 anni, presenza di qualunque fibra *ragged red* <30 anni, accumulo subsarcolemmale di mitocondri in >2% delle fibre in pazienti con <16 anni, anomalie ultrastrutturali diffuse in qualunque tessuto.
- Enzimatici: dimostrazione mediante tecnica immunoistochimica di un deficit di espressione di un complesso della catena respiratoria (20-30% di espressione di un qualunque complesso in un tessuto, 30-40% in una linea cellulare, 30-40% di uno stesso complesso in 2 o più tessuti).
- Funzionali: tassi di sintesi di ATP 2-3 deviazioni standard sotto la media in fibroblasti, fibroblasti incapaci di crescere in terreni di coltura in cui il glucosio è stato sostituito con galattosio.
- Molecolari: identificazione di una mutazione dell'mtDNA o dell'nDNA di probabile patogenicità.
- Metabolici: uno o più indicatori metabolici di compromissione della funzione della catena respiratoria.

La diagnosi è considerata *certa* in presenza di due criteri diagnostici maggiori o un criterio maggiore e due minori. L'evidenza di disfunzione mitocondriale con almeno due tipi indipendenti di indagine (ad esempio, clinico, istologico, biochimico o molecolare) è richiesta per porre una diagnosi certa. La diagnosi è *probabile* in presenza di un criterio maggiore e un criterio minore o almeno tre criteri minori. La diagnosi è *possibile* in presenza di un singolo criterio maggiore o due minori (dei quali uno dev'essere clinico)^[73].

I criteri proposti da Bernier *et al.* sono utili per comprendere la molteplicità di approcci diagnostici alla patologia mitocondriale. La riduzione dei tempi e dei costi del sequenziamento e l'aumento delle conoscenze sulle mutazioni patogenetiche stanno incrementando progressivamente l'importanza dell'analisi genetica^{[44][74]}. L'approccio diagnostico utilizzato abitualmente può essere riassunto come segue:

1. sospetto clinico di patologia mitocondriale, sulla base dell'anamnesi personale e familiare;
2. valutazione istologica ed enzimatica, ricercando evidenze di disfunzione mitocondriale;
3. indagine genetica guidata dal sospetto clinico e da criteri epidemiologici (frequenza delle varie mutazioni).

L'individuazione di una mutazione patogenetica nota in una percentuale significativa del DNA mitocondriale è dirimente per la diagnosi di patologia mitocondriale.

1.8 Attuali opzioni terapeutiche

Le opzioni terapeutiche per le patologie mitocondriali sono molto limitate^[18]. Esse consistono negli approcci tradizionali alle singole manifestazioni cliniche oppure sono trattamenti specifici, frutto di considerazioni teoriche sulla funzione mitocondriale^[18]. Il beneficio clinico delle varie strategie è incostante e, con la parziale eccezione del coenzima Q10, non è stato dimostrato chiaramente; mancano inoltre le evidenze di un impatto positivo sulla prognosi^[18].

L'approccio terapeutico alle patologie mitocondriali può essere schematizzato in questo modo:

- utilizzo delle terapie *standard* per specifiche manifestazioni cliniche della patologia mitocondriale (ad esempio, antidiabetici per il diabete mellito, antimicotici per l'epilessia);
- somministrazione di cofattori e vitamine;

- accorgimenti dietetici;
- fisioterapia.

Per quanto riguarda singole manifestazioni cliniche, in molti casi si utilizzano le terapie standard. Esistono però casi specifici. Ad esempio, la metformina è relativamente controindicata nei pazienti con patologia mitocondriale per più probabile insorgenza di acidosi lattica^[75]. L'acido valproico presenta una controindicazione assoluta nei pazienti con mutazioni di POLG e in quelli con sindrome MERRF, in cui può comparire un'insufficienza epatica^{[75][76]}. Alternative al trattamento classico delle manifestazioni epilettiche in pazienti con patologia mitocondriale includono la somministrazione di L-arginina o piruvato, come potenziatori della funzione mitocondriale, oppure una dieta chetogenica (con rapporto lipidi: carboidrati di 3:1), perché i corpi chetonici riducono lo stress ossidativo e l'eccitabilità neuronale^{[18][77]}.

La somministrazione di cofattori e vitamine viene effettuata di routine. I cofattori e le vitamine più frequentemente impiegati sono il coenzima Q10, la vitamina K, la vitamina C, il succinato, la creatina, la carnitina, le vitamine del gruppo B (tiamina, riboflavina, niacinamide)^[18].

Il coenzima Q10 è la variante di coenzima Q più rappresentata nella catena respiratoria nell'uomo^{[78][79]}. Il coenzima Q10 e la vitamina K vengono somministrati come *carrier* di elettroni attraverso la catena respiratoria; tutte queste molecole sono anche dotate di un'attività antiossidante, quindi dovrebbero ridurre lo stress ossidativo conseguente alla disfunzione mitocondriale^[80]. La vitamina C funge anch'essa da antiossidante, mentre il succinato è un donatore di protoni per la riduzione del coenzima Q^[80].

La creatina viene somministrata nell'ottica di aumentare la sintesi di fosfocreatina, una molecola che funge da riserva energetica, così come l'ATP^[80]. La carnitina è un *carrier* degli acidi grassi attraverso la membrana mitocondriale interna; viene somministrata come possibile potenziatore della funzione mitocondriale^[80].

La tiamina (vitamina B1) un cofattore del ciclo di Krebs; la riboflavina (vitamina B2) è coinvolta nella decarbossilazione ossidativa del piruvato, ossidazione di acidi grassi ed aminoacidi, trasporto degli elettroni durante la fosforilazione ossidativa; la niacinamide (vitamina B3) entra nella costituzione di NADH e NADPH, due fonti di elettroni per la catena respiratoria^{[80][81]}.

In generale, esistono i presupposti teorici per cui cofattori e vitamine debbano potenziare la funzione mitocondriale, anche se le evidenze cliniche sono molto modeste.

L'utilizzo di vitamine e cofattori è stato valutato in uno studio su leucociti di 12 pazienti con patologia mitocondriale: dopo 12 mesi di terapia con coenzima Q10, carnitina,

vitamine del complesso B, vitamina C e vitamina K, la sintesi di ATP nei leucociti è risultata significativamente aumentata, anche se nessuno dei pazienti ha presentato un miglioramento clinico^[82]. Ulteriori esperimenti suggerivano che il coenzima Q10 fosse il principale responsabile del miglioramento biochimico riscontrato^{[78][79]}.

Il coenzima Q10 nelle sue varie formulazioni è il farmaco più utilizzato per il trattamento della patologia mitocondriale^{[78][79]}. Nel 1985 furono riportati per la prima volta una riduzione dei livelli circolanti di lattato, un miglioramento della funzione cardiaca e dei movimenti oculari in un paziente con malattia mitocondriale in seguito alla somministrazione di coenzima Q10^[83]. Studi di spettroscopia RM con ³¹P a livello cerebrale e muscolare hanno dimostrato che l'assunzione di questa molecola potenzia la fosforilazione ossidativa^[84]. Studi clinici su piccole popolazioni di pazienti hanno riscontrato un miglioramento in vari *outcome* (funzione neurologica globale, atassia, intolleranza allo sforzo, crampi e rigidità muscolare)^{[78][79]}. Alcuni studi non hanno però riscontrato un beneficio significativo, a livello biochimico e/o clinico, in seguito alla somministrazione di coenzima Q10^[85], verosimilmente per i differenti protocolli sperimentali, in termini di posologia e durata della supplementazione^[78].

Per quanto concerne gli accorgimenti dietetici, si consiglia a questi pazienti di fare pasti frequenti, evitare il digiuno, prediligere cibi ricchi di lipidi a quelli ricchi di carboidrati^[86]. Queste raccomandazioni scaturiscono comunque da considerazioni teoriche più che dal riscontro di un beneficio clinico.

La fisioterapia viene raccomandata allo scopo di alleviare i dolori muscolari e la debolezza e di preservare la capacità di movimento^[86]; alcuni studi clinici hanno suggerito la sicurezza e l'efficacia di programmi di *training* fisico^{[87][88][89]}, ma questo approccio non viene ancora utilizzato di routine.

1.9 Prognosi dei pazienti con mitocondriopatia

La patologia mitocondriale presenta una notevole eterogeneità anche per quanto riguarda la prognosi. Come principali fattori prognostici sfavorevoli si possono indicare l'esordio delle manifestazioni cliniche in età pediatrica e un grave interessamento del sistema nervoso centrale o del cuore^{[46][90]}. L'encefalopatia è probabilmente la causa principale di morte per questi pazienti, seguita dalla cardiopatia^[90].

Come si afferma in una *review* recente, "Come in molte altre condizioni patologiche, specialmente quelle a decorso progressivo, vale il principio che quanto prima si diagnostica una complicanza, tanto meglio la si tratta e tanto migliore sarà la prognosi. Questo è particolarmente vero nel caso del coinvolgimento cardiaco"^[90]. Tale concetto è in con-

trasto con la sensibilità probabilmente modesta dell'attuale algoritmo diagnostico della cardiopatia mitocondriale (si veda il capitolo 2).

Capitolo 2

Cardiopatía mitocondriale: quadri clinici e patogenesi

2.1 Possibili quadri di cardiopatía mitocondriale

La cardiopatía mitocondriale può essere definita come una compromissione della struttura e/o della funzione cardiaca riconducibile alla patologia mitocondriale; la diagnosi richiede quindi l'esclusione di altre eziologie, ad esempio la patologia coronarica, ipertensiva, valvolare o congenita^[91].

L'impegno cardiaco si può presentare sotto forma di cardiomiopatia e/o di alterazioni dell'attività elettrica^[47]. Come illustrato nella *Figura 2.1* relativamente alla patologia da mutazione dell'mtDNA, ogni forma di interessamento cardiaco si può associare a varie mutazioni e viceversa ogni singola mutazione può causare vari tipi di cardiopatía.

La cardiomiopatia ipertrofica (CMI) è il quadro più frequente di cardiomiopatia, sviluppandosi in una percentuale stimata fino al 40% dei pazienti con malattia mitocondriale^{[92][93]}. L'eziologia mitocondriale dovrebbe essere considerata nei pazienti con CMI, soprattutto in caso di patologia sistemica e/o di ereditarietà matrilineare^[47]. Bisogna tuttavia ricordare che la CMI mitocondriale può essere anche sporadica e può costituire l'unica manifestazione di malattia^[47].

La CMI è spesso legata a mutazioni puntiformi in geni codificanti per mt-tRNA. In studi ecocardiografici, la CMI è stata diagnosticata nel 38-56% dei pazienti con la mutazione m.3243A>G ("mutazione MELAS"), con una discreta correlazione fra il carico mutazionale nel muscolo scheletrico e la massa ventricolare sinistra indicizzata^{[94][95]}. In uno studio di risonanza magnetica (RM) cardiaca su 22 pazienti con mutazione MELAS e senza impegno cardiaco noto, la massa ventricolare sinistra risultava correlata con il carico mutazionale nel sedimento urinario e con la gravità del quadro clinico complessivo (espressa dal punteg-

Gene	mtDNA mutation	Electropathy		Cardiomyopathy				
		Ventricular pre-excitation	Conduction disease	Hypertrophic	Dilated	Restrictive	Left ventricular non-compaction	Histiocytoid
Common								
<i>MTTL1</i>	m.3243A>G	++	+	++	+	+	+	-
<i>MTII</i>	m.4300A>G	-	-	++	+	-	-	-
<i>MTTK</i>	m.8344A>G	++	+	++	++	-	-	+
<i>MTND4</i>	m.11778G>A	++	-	+	-	-	-	-
	single, large-scale mtDNA deletion	-	++	-	+	-	-	-
Rare								
<i>MTRNR1</i>	m.1555A>G	-	-	-	-	+	-	-
<i>MTIV</i>	m.1624C>T	-	-	+	+	-	-	-
<i>MTTL1</i>	m.3252T>C	-	+	-	+	-	-	-
	m.3260A>G	+	-	+	+	-	-	-
	m.3303T>C	-	+	+	+	-	-	-
<i>MTND1</i>	m.3337G>A	-	-	+	+	-	-	-
	m.3460G>A	+	-	+	-	-	+	-
<i>MTII</i>	m.4269A>G	-	-	-	+	-	-	-
	m.4277T>C	-	-	+	-	-	-	-
	m.4284G>A	-	+	+	+	-	-	-
	m.4317A>G	-	-	+	+	-	-	-
	m.4320C>T	-	-	+	-	-	-	-
<i>MTTK</i>	m.8363G>A	-	-	+	+	-	-	-
<i>MTATP8</i>	m.8528T>C	-	-	+	-	-	-	-
<i>MTATP6</i>	m.8529G>A	-	-	+	-	-	-	-
<i>MTATP6</i>	m.8993T>G	-	-	+	-	-	-	-
<i>MTTG</i>	m.9997T>C	-	-	+	-	-	-	-
<i>MTND4</i>	m.11778A>G	-	-	-	+	-	-	-
<i>MTTL2</i>	m.12297T>C	-	-	-	+	-	-	-
<i>MTND5</i>	m.13513G>A	+	+	-	-	-	-	-
<i>MTND6</i>	m.14484T>C	-	-	-	+	-	-	-
<i>MTCYB</i>	m.14849T>C	-	-	+	-	-	-	-
	m.15498G>A	-	-	-	-	-	-	+

Figura 2.1: Fenotipi cardiaci associati a mutazioni dell'mtDNA

Ogni quadro di interessamento cardiaco può essere associato a varie mutazioni e ogni mutazione può dare vari quadri di interessamento cardiaco. *Adattata da: Bates et al., 2012.*^[47]

gio *Newcastle Mitochondrial Disease Adult Scale*); questi parametri erano correlati anche con le alterazioni della cinesi valutate mediante *cardiac tagging* (riduzione dello *strain* circonferenziale), mentre non erano correlate con le alterazioni del metabolismo miocardico, espresse dal rapporto fosfocreatina/adenosina trifosfato alla spettroscopia RM del cuore con ³¹P.^[96]

La CMI si può associare ad altre mutazioni di geni dell'mt-tRNA, ad esempio la mutazione MERRF m.8344A>G, le mutazioni m.4269A>G, m.4317A>G, m.4300A>G^{[97][98][99]}. Quest'ultima mutazione è stata identificata, in condizioni di omoplasma, in alcune famiglie con CMI isolata^[100]

La CMI si associa meno frequentemente a mutazioni di geni dell'mt-rRNA o di geni mitocondriali che codificano per polipeptidi^{[97][99]}. La sua prevalenza fra i pazienti con mutazioni dell'nDNA non è nota^[91].

L'ipertrofia è di tipo concentrico oppure interessa piuttosto selettivamente la regione settale; l'ostruzione del tratto di efflusso viene riscontrata raramente nella CMI mitocondriale, mentre la tendenza alla dilatazione ventricolare è più spiccata rispetto alla più frequente CMI da mutazione di geni del sarcomero^{[47][95]}. L'evoluzione verso la dilatazione ventricolare è stata riportata in pazienti con le mutazioni MERRF^[101] e MELAS^[102].

La cardiomiopatia dilatativa (CMD) può costituire il quadro iniziale di coinvolgimento

cardiaco, presentandosi anche come dilatazione ventricolare acuta^[103]. Più comunemente essa rappresenta l'evoluzione dilatativa di una CMI^{[104][105]}.

Una CMD "primitiva" è stata riscontrata in 1/17 pazienti con malattia mitocondriale^[106] e nel 22% di 18 pazienti con la mutazione m.8344A>G^[101]. La CMD è più rara rispetto alla CMI nei pazienti con la mutazione MELAS e con altre mutazioni di geni dell'mt-tRNA^[47].

La storia naturale della CMD non è nota con precisione. Si ritiene che spesso la progressione sia lenta e che la disfunzione sistolica possa rimanere silente per anni per le limitazioni motorie di questi pazienti^{[47][91]}. È stato riportato che la CMD risponde bene alle terapie tradizionali dello scompenso cardiaco^[103].

La cardiomiopatia restrittiva (CMR) è stata riportata in associazione con la mutazione m.3243A>G^[107] e con la mutazione m.1555A>G^[108]; nel secondo caso l'attribuzione era imprecisa, trattandosi in realtà di CMI con disfunzione diastolica a *pattern* restrittivo.

La non compattazione del ventricolo sinistro (NC) è causata da un'anomala compattazione delle miofibrille durante lo sviluppo cardiaco, che esita nella progressiva dilatazione ventricolare e nella disfunzione sistolica. Accanto alle forme più comuni da mutazione di geni sarcomerici o di canali ionici, sono state individuate forme da mutazione di geni mitocondriali (ad esempio, m.3398T>C)^[109]. La NC a eziologia mitocondriale è rara e la sua storia naturale è poco nota.

La cardiomiopatia istiocitoide è un'altra rara forma di cardiomiopatia caratterizzata da cellule patognomiche, simil-macrofagiche, in sede subendocardica. Queste cellule sono cardiomiociti di lavoro o cellule di Purkinje ripiene di mitocondri anomali^[110]. La cardiomiopatia istiocitoide è una forma a insorgenza nell'età pediatrica, con prognosi infuusta per l'elevata incidenza di morte improvvisa^[111].

Come discusso più approfonditamente nel paragrafo 2.4, l'aumento del numero e delle dimensioni dei mitocondri nel citoplasma delle cellule miocardiche è stato documentato frequentemente all'analisi ultrastrutturale di biopsie miocardiche o di cuori espantati, soprattutto in casi di CMI^[112]. Da queste analisi sembra emergere che le alterazioni dei mitocondri costituiscono il fattore determinante dell'ipertrofia dei cardiomiociti, quindi della CMI in toto. In effetti non è mai stata riportata un'espansione delle strutture sarcomeriche, la cui funzione contrattile sembra anzi compromessa dalle alterazioni dei mitocondri. Analisi istologiche di biopsie miocardiche hanno confermato la presenza di anomalie dei mitocondri e hanno rivelato la presenza di *disarray* dei cardiomiociti e di fibrosi interstiziale^{[112][113]}.

L'analisi *T1-mapping*, che consente di analizzare il volume dello spazio extracellulare cardiaco, non è stata probabilmente mai effettuata in pazienti con malattia mitocondriale.

Zone di *late gadolinium enhancement* (LGE), indice di fibrosi alla RM cardiaca con mezzo di contrasto, sono di riscontro relativamente comune. In una casistica recente su 64 pazienti con varie forme di malattia mitocondriale, 21 (33%) presentavano aree di LGE e 19 (30%) un *pattern* non ischemico di LGE, cioè una distribuzione prevalentemente intramurale o subepicardica della fibrosi^[114]. Nei pazienti con CPEO o sindrome di Kearns-Sayre l'LGE sarebbe localizzato più frequentemente nella regione infero-laterale del ventricolo sinistro, mentre nei pazienti con MELAS la distribuzione dell'LGE sarebbe stata più eterogenea. Nei pazienti con MELAS e MERRF, gli autori riportavano un'associazione fra LGE e livelli circolanti di troponina T HS e/o NT-proBNP, nonché fra LGE ed alterazioni dell'ECG. Nella totalità dei pazienti, queste alterazioni erano rappresentate da blocco di branca destra (n=5), blocco di branca sinistra (n=1), onde Q patologiche (n=4), evidenze di ipertrofia ventricolare sinistra (n=1), alterazioni aspecifiche della ripolarizzazione (n=11). In questa casistica non si faceva menzione di extrasistoli ventricolari^[114]. In generale, sembrano mancare evidenze in letteratura di un'aumentata incidenza di extrasistolia ventricolare in questa popolazione di pazienti, verosimilmente perché l'ECG dinamico secondo Holter non è mai stato utilizzato su larga scala in questi soggetti.

Le alterazioni dell'attività elettrica riportate in pazienti con malattia mitocondriale sono il blocco atrio-ventricolare, le anomalie della conduzione intraventricolare, la pre-eccitazione ventricolare, la tachicardia sopraventricolare e ventricolare^[47].

Il blocco atrio-ventricolare (BAV) rientra fra i criteri diagnostici della sindrome di Kearns-Sayre^[115]; in questa condizione, il BAV viene riscontrato in una percentuale che arriva fino all'84% dei casi e la sua incidenza aumenta con l'età^[116]. La progressione verso un BAV di alto grado è imprevedibile, il che promuove un intervento precoce in presenza di BAV di basso grado^[117].

Il BAV e disturbi della conduzione intraventricolare, più frequentemente blocco di branca destra (BBD) o anomalie aspecifiche della ripolarizzazione ventricolare, sono stati riscontrati nel 5-10% di pazienti con le mutazioni MELAS e MERRF. L'evoluzione di queste alterazioni non è nota^[47].

La sindrome di Wolff-Parkinson-White e altre forme di pre-eccitazione ventricolare sono più comuni fra i pazienti con mutazioni dell'mtDNA che nella popolazione generale^{[47][91]}. La pre-eccitazione ventricolare è stata descritta per la prima volta in associazione con la sindrome LHON^[118] ed è stata in seguito riportata nel 3-27% dei pazienti con le mutazioni MELAS e MERRF^[119]. La storia naturale e le modalità ottimali di gestione rimangono incerte, tuttavia pazienti sintomatici sono stati trattati efficacemente con ablazione a radiofrequenze delle vie accessorie^[47].

Sono stati riportati alcuni casi di tachicardia sopraventricolare e di tachicardia ventrico-

lare in pazienti con mutazioni dell' mtDNA^{[47][120]}. A questo proposito, possiamo ricordare un caso di sindrome di Kearns-Sayre caratterizzato da prolungamento del QT e da episodi di torsione di punta^[121].

2.2 Cardiopatia mitocondriale: epidemiologia, prognosi, opzioni terapeutiche

La prevalenza della cardiopatia legata a mutazioni dell' mtDNA è stimata pari a 1 caso:10-15.000 nella popolazione generale; non ci sono dati di prevalenza relativamente alle mutazioni dell' nDNA, che sembrano essere più frequenti rispetto alle mutazioni dell' mtDNA^[47].

La prognosi sembra essere radicalmente diversa nei casi a insorgenza nell' età pediatrica e in quelli che vengono diagnosticati nell' età adulta^{[47][91]}. In una casistica di pazienti in età pediatrica, un impegno cardiaco veniva riscontrato in 17 pazienti su 101 e costituiva un fattore prognostico decisamente sfavorevole, dato che 11 dei 17 pazienti erano morti prima dei 30 anni in seguito a scompenso cardiaco (8 pazienti), morte improvvisa (2 pazienti) oppure dopo trapianto di cuore (1 paziente). Viceversa, degli 84 pazienti senza impegno cardiaco solo 22 erano morti prima dei 30 anni^[122]. In età adulta la prognosi è decisamente più favorevole. In una popolazione di 32 pazienti con diagnosi di malattia mitocondriale, il 25% era affetto da una cardiomiopatia (rappresentata in larga misura dalla CMI) e vari pazienti presentavano alterazioni dell' attività elettrica. Durante un *follow-up* di 5 anni sono stati riscontrati un decesso per causa cardiaca e un trapianto di cuore; due pazienti hanno sviluppato una CMI ed un paziente è andato incontro a dilatazione ventricolare^[92].

Le opzioni terapeutiche per l' impegno cardiaco sono limitate:

- somministrazione di potenziatori della funzione mitocondriale^{[47][91]}: coenzima Q10 e altre molecole elencate nel paragrafo 1.8. Il Bendavia, un farmaco che potenzia la funzione mitocondriale, è attualmente valutato con interesse in ambito cardiovascolare ma non è mai stato valutato nell' ambito della cardiopatia mitocondriale^{[123][124]};
- trattamento tradizionale per condizioni di danno cardiaco stabilizzato: terapia farmacologica dello scompenso cardiaco, impianto di *pacemaker* e/o defibrillatore, trapianto cardiaco^{[47][91]}.

2.3 Algoritmo diagnostico attuale

Esiste un accordo generale sul fatto che tutti i soggetti con diagnosi certa o probabile di malattia mitocondriale debbano effettuare periodici accertamenti cardiologici^[47]. L' unico

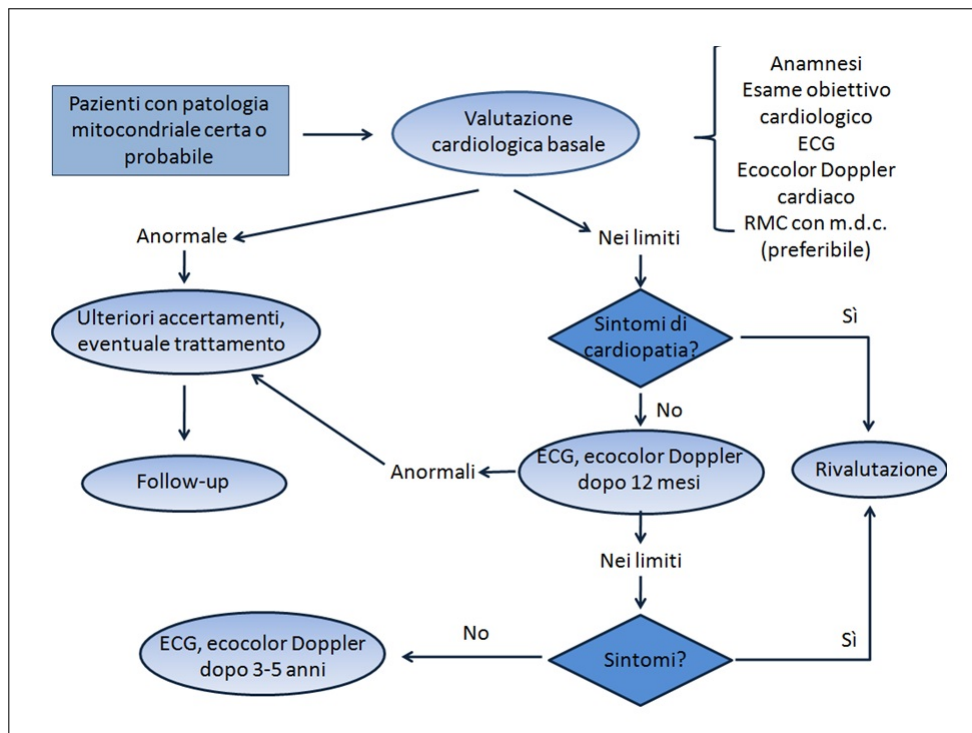


Figura 2.2: Algoritmo proposto da Bates *et al.* per la diagnosi e il *follow-up* cardiologico dei pazienti con patologia mitocondriale. Adattata da Bates *et al.*, 2012 [47].

algoritmo finora proposto per la diagnosi e il *follow-up* di questi pazienti è quello di Bates *et al.* (2012). Esso prevede una valutazione basale comprensiva di anamnesi, esame obiettivo cardiologico, elettrocardiogramma (ECG), ecocolor-Doppler cardiaco e, qualora disponibile, risonanza magnetica (RM) cardiaca con mezzo di contrasto. Se i risultati di questi esami sono nella norma e il paziente rimane asintomatico, si ripetono ECG ed ecocolor-Doppler a distanza di 12 mesi. Se i risultati continuano ad essere nei limiti e il paziente non presenta sintomi di pertinenza cardiologica, l'intervallo fra le valutazioni successive può essere esteso fino a 3-5 anni^[47] (Figura 2.2).

La biopsia miocardica non ha un ruolo ben definito nell'iter diagnostico della cardiomiopatia mitocondriale. Dato che i reperti biopatici non sono fondamentali per la diagnosi, Bates *et al.* propongono l'esecuzione della biopsia solo quando il paziente debba essere sottoposto a procedure invasive, quali coronarografia o impianto di *pacemaker* - defibrillatore^[47].

Questo algoritmo è facilmente applicabile nella pratica clinica quotidiana e rispecchia le modalità di gestione cardiologica di questi pazienti. Tuttavia, la sua sensibilità nell'individuazione di un danno cardiaco è probabilmente limitata. Nel presente studio abbiamo quindi definito un protocollo diagnostico molto più articolato, con cui valutare pazienti mitocondriopatici non selezionati. Gli obiettivi che ci siamo preposti sono stati quelli di verificare la sensibilità dell'algoritmo di Bates *et al.* e se possibile di individuare alcuni

meccanismi sistemici di danno cardiaco, che potessero rappresentare bersagli terapeutici.

2.4 Patogenesi del danno cardiaco: una visione "cardiocentrica"

La cardiopatia mitocondriale è sempre stata ricondotta unicamente alla disfunzione dei mitocondri presenti a livello miocardico. Gli esatti meccanismi del danno cardiaco non sono mai stati chiariti. Per spiegare la scarsità di conoscenze in questo campo sono state chiamate in causa la relativa rarità della cardiopatia mitocondriale, l'accesso limitato a tessuto cardiaco umano, l'assenza di un modello animale attendibile, la sostanziale mancanza di correlazioni genotipo-fenotipo (cioè di associazioni fra specifiche mutazioni e quadri di impegno cardiaco).

A prescindere dai motivi, la patogenesi del danno cardiaco è praticamente sconosciuta, per cui nel seguito di questo paragrafo verranno formulate alcune ipotesi sui possibili meccanismi che dalla disfunzione mitocondriale possono condurre a quadri di cardiopatia.

È stato ipotizzato che l'ipertrofia ventricolare costituisca un cambiamento adattativo alla disfunzione mitocondriale. Tuttavia, come anticipato nel paragrafo 2.1, le analisi ultrastrutturali non hanno mai riscontrato evidenze di espansione delle strutture sarcomeriche, mentre hanno mostrato frequentemente un aumento marcato del numero e delle dimensioni dei mitocondri, che determinano un ingrandimento dei cardiomiociti. I mitocondri abnormi sembrano alterare la disposizione dei sarcomeri e ostacolare meccanicamente l'attività contrattile. È anche plausibile che questi mitocondri disfunzionanti producano grandi quantità di ROS, causando un notevole stress ossidativo. Altre possibili conseguenze della disfunzione mitocondriale sono lo stress ossidativo, il sovraccarico citoplasmatico di calcio (con alterazioni conseguenti dell'eccitabilità dei cardiomiociti), le anomalie nell'utilizzo di substrati energetici, una maggiore tendenza all'apoptosi^{[47][91]}. Gli esiti ultimi di queste alterazioni sarebbero l'ipocinesia e la dilatazione ventricolare, la comparsa di aree di fibrosi e le anomalie dell'attività elettrica cardiaca.

Tutte queste ipotesi sono plausibili ed è ragionevole ritenere che il danno cardiaco dipenda da una combinazione di questi meccanismi. Tuttavia, questo approccio "cardiocentrico" alla patogenesi apre scarse possibilità terapeutiche; in effetti, queste si limitano alla somministrazione di potenziatori della funzione mitocondriale (coenzima Q10 e analoghi) oppure al trattamento di condizioni di cardiopatia conclamata (si veda il paragrafo 2.2).

È interessante notare che non sono mai stati ricercati meccanismi sistemici di danno cardiaco, nonostante la malattia mitocondriale coinvolga tipicamente vari organi e appa-

rati. L'approccio "sistemico" è particolarmente interessante perché potrebbe dischiudere nuove prospettive terapeutiche, come avvenuto in passato nello scompenso cardiaco.

2.5 Un approccio "sistemico" alla cardiopatia mitocondriale? Il modello dello scompenso cardiaco

Lo scompenso cardiaco veniva interpretato inizialmente come un problema di eccessiva ritenzione idrosalina, causato da anomalie della perfusione renale ("modello cardiorenale")^[125]. In seguito venne posto l'accento sulla vasocostrizione periferica di significato compensatorio ("modello cardiocircolatorio o emodinamico")^[125]. Entrambi i modelli potevano giustificare la ritenzione idrosalina, ma non riuscivano a spiegare adeguatamente il progressivo deterioramento della funzione cardiaca sperimentato dai pazienti scompensati. Il modello cardiorenale forniva una base concettuale per l'utilizzo di diuretici per il controllo del volume circolante, mentre il modello cardiocircolatorio giustificava l'utilizzo di inotropi e vasodilatatori per aumentare la gittata cardiaca e ridurre le resistenze periferiche; tuttavia, queste strategie terapeutiche non prevenivano la progressione dello scompenso cardiaco né miglioravano la prognosi di pazienti con scompenso cardiaco di grado moderato-severo^{[125][126]}.

Tra la fine degli anni '80 e i primi anni '90, comparirono evidenze che altri tipi di terapia medica (inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensinogeno e beta-bloccanti) potevano avere un effetto benefico sulla storia naturale dello scompenso cardiaco^{[127][128][129]}. Dati provenienti da modelli sperimentali e *trial* clinici suggerirono che entrambe queste terapie potevano prevenire la progressione della disfunzione di pompa che caratterizza la storia naturale dello scompenso cardiaco. Si sviluppò parallelamente il "modello neuroormonale"^{[125][130]}, secondo cui lo scompenso cardiaco progredisce come risultato dell'iperpressione di molecole biologicamente attive capaci di esercitare effetti deleteri sul cuore e sulla circolazione.

La riduzione della gittata cardiaca e il deficit di perfusione dei tessuti periferici determinano una reazione adattativa simile a quella messa in atto in caso di emorragia o stress fisico. I meccanismi compensatori agiscono cronicamente sostenendo la funzione cardiaca per un tempo variabile (fase preclinica o paucisintomatica)^{[130][131]}. L'aumento del precarico incrementa la contrattilità in virtù della legge di Frank-Starling. Un riassetto dei sistemi di *feedback* (con depressione del baroriflesso e iperattività del chemoriflesso) determina un aumento del tono simpatico e una riduzione del tono parasimpatico; questo si traduce in un effetto cronotropo e inotropo positivo ed in un aumento delle resistenze periferiche^[131]. In tempi più lunghi (giorni-settimane), la pressione viene sostenuta dal-

l'aumento dei livelli circolanti di angiotensina-II, aldosterone, endotelina e vasopressina.

Questi meccanismi si rivelano deleteri sul lungo periodo. L'ipertono simpatico cronico determina ipertrofia cardiaca, fenomeni di necrosi e apoptosi, fibrosi interstiziale, induzione di geni fetali, aumentata incidenza di aritmie, vasocostrizione miocardica^[132]; sul lungo periodo, l'ipertono adrenergico è una delle principali cause di riduzione dell'efficienza cardiaca, come evidenziato dal valore prognostico sfavorevole di elevati livelli circolanti di noradrenalina nello scompenso cardiaco^[133].

La ritenzione idrosalina è legata a vari meccanismi: vasocostrizione delle arteriole glomerulari efferenti, aumento della velocità di filtrazione glomerulare, riassorbimento di sodio nel tubulo prossimale e nel tubulo distale, stimolo della sete e riduzione della *clearance* dell'acqua libera^[134]. Anche questi fenomeni sono efficaci sul breve periodo, ma in seguito determinano congestione polmonare ed edema periferico, anche per la relativa inefficienza del sistema dei peptidi natriuretici^{[133][134]}. Inoltre, l'angiotensina II e l'aldosterone promuovono il rimodellamento della matrice extracellulare miocardica e la fibrosi cardiaca^{[135][136]}.

Un altro possibile circolo vizioso attivato dalla disfunzione cardiaca coinvolge il muscolo scheletrico. I pazienti con scompenso cardiaco sviluppano spesso una deplezione muscolare, che si può configurare come sarcopenia o addirittura come cachessia^[137]. Tra i possibili meccanismi di danno muscolare si ricordano i seguenti: alterata funzione mitocondriale, stato proinfiammatorio sistemico, limitazione dell'attività fisica per intolleranza allo sforzo, congestione dell'intestino tenue con diminuzione dell'assorbimento, resistenza o riduzione dei livelli circolanti di ormoni anabolizzanti, aumento dei livelli circolanti di miostatina (proteina che riduce la massa muscolare), ipoperfusione tissutale^{[137][138]}. Secondo la cosiddetta *muscle hypothesis* dello scompenso cardiaco, la miopatia scheletrica può esacerbare la sintomatologia dello scompenso cardiaco e contribuire alla progressione di questo. Il meccanismo ipotizzato è l'aumentata sensibilità di un riflesso cardio-respiratorio a partenza dal muscolo scheletrico, l'ergoriflesso^{[139][140]} (*Figura 2.4*).

Una presentazione generale dell'ergoriflesso verrà fornita nel paragrafo 2.5. In questa sede ci si può limitare ad affermare che l'ergoriflesso è un meccanismo neurale che adatta la ventilazione e l'attivazione adrenergica all'intensità dell'esercizio fisico. Secondo la *muscle hypothesis*, la miopatia scheletrica secondaria allo scompenso cardiaco aumenta la sensibilità dell'ergoriflesso; questo contribuisce alla dispnea da sforzo e alla disautonomia, che sono elementi di frequente riscontro nei pazienti con scompenso cardiaco. L'ipertono simpatico aumenta le resistenze all'eiezione ventricolare^{[139][140]}; si può aggiungere che la stimolazione adrenergica cronica può agire direttamente sul cuore determinando le modificazioni elencate all'inizio di questo paragrafo.

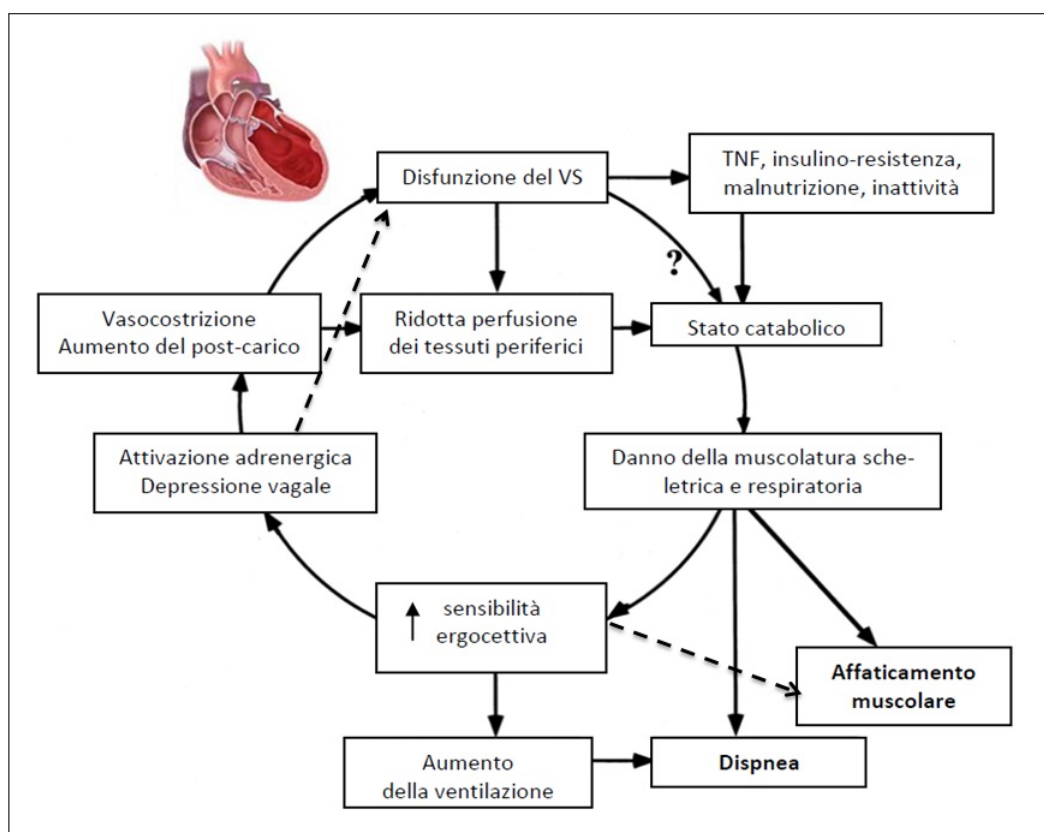


Figura 2.3: : La *muscle hypothesis* dello scompenso cardiaco

Una compromissione del ventricolo sinistro (VS) determinerebbe una miopatia scheletrica tramite vari meccanismi (stato infiammatorio e catabolico, malnutrizione, inattività, insulino-resistenza). Questo si tradurrebbe in una sensibilizzazione dei recettori muscolari che mediano l'ergoriflesso, determinando dispnea da sforzo ed *imbalance* simpato-vagale con attivazione adrenergica e depressione vagale. Le modificazioni emodinamiche (vasocostrizione e aumento del postcarico) e l'ipertono simpatico potrebbero aggravare la disfunzione cardiaca. *Adattata da Piepoli et al., 1996^[140]*

La *muscle hypothesis* fu formulata nel 1994 dal gruppo di Piepoli e Coats come possibile meccanismo della dispnea da sforzo nei pazienti con scompenso cardiaco^[139]. Questa ipotesi fu dimostrata nel 1996, quando venne documentata un'iperattività dell'ergoriflesso in una popolazione di 12 pazienti con scompenso cardiaco. Rispetto a 10 controlli sani e sedentari, i pazienti presentavano una maggiore sensibilità ergocettiva, espressa in termini di aumento di ventilazione (86.5% contro 54.5%), pressione diastolica (97.8% contro 53.5%) e resistenze vascolari degli arti inferiori (108.1% contro 48.9%) durante stimolazione selettiva dell'ergoriflesso^[140]. Per il protocollo di studio utilizzato dagli autori e nel presente studio si rimanda al paragrafo 3.4.

Fra la fine degli anni '90 e i primi anni 2000, il gruppo di Piepoli e Coats ha studiato estesamente la sensibilità ergocettiva in pazienti con scompenso cardiaco; più precisamente, gli autori hanno valutato la componente dell'ergoriflesso chiamata metaboriflesso e hanno analizzato la sensibilità metabocettiva quasi esclusivamente in termini di risposta ventilatoria.

2.6 Ergoriflesso

L'esistenza di un riflesso evocato dall'attività muscolare (ergoriflesso) fu proposta per la prima volta da Alam e Smirk nel 1937^[141]. Questi autori valutarono volontari sani, facendo eseguire loro un esercizio dinamico con entrambi gli arti inferiori o con un arto superiore. L'occlusione circolatoria di entrambi gli arti inferiori o dell'arto superiore che aveva compiuto l'esercizio manteneva l'aumento pressorio raggiunto durante l'esercizio; la rimozione dell'occlusione vascolare determinava una rapida caduta della pressione^[141]. Questo fenomeno fu attribuito dagli autori ad un intrappolamento dei metaboliti nei muscoli che avevano eseguito l'esercizio. Il rialzo pressorio durante occlusione circolatoria non poteva essere attribuito al comando centrale, dato che l'esercizio era finito, e non era considerabile una conseguenza del dolore ischemico, poiché questo diventava intenso solo verso la fine del periodo di arresto circolatorio^[141].

Questo studio suggeriva l'esistenza di un riflesso attivato dall'accumulo di metaboliti a livello muscolare e capace di regolare la funzione emodinamica. In seguito, questo riflesso fu definito "metaboriflesso" e venne individuato il suo ruolo nel controllo ventilatorio^[142].

Negli anni '80, esperimenti su animali rivelarono che la stimolazione meccanica di muscoli e tendini può evocare risposte cardiovascolari, precisamente aumenti della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa. Questo riflesso fu chiamato "meccanoriflesso"^[143]; il suo effetto sulla ventilazione non è ancora stato definito^[144]. Nel complesso, il metaboriflesso e il meccanoriflesso costituiscono l'ergoriflesso, meccanismo neurale che adatta la

funzione cardiovascolare e la ventilazione all'intensità di esercizio^[142].

Tra le molecole che potrebbero attivare il metaboriflesso, si ricordano l'acido lattico, i protoni e gli ioni potassio, la bradichinina e l'adenosina^{[145][146][147]}. L'accumulo di queste molecole verrebbe rilevato da recettori localizzati su terminazioni nervose libere nell'interstizio, determinando la generazione di potenziali d'azione^{[142][148]}.

Le informazioni relative all'accumulo di metaboliti nel muscolo sono convogliate da un gruppo di fibre di tipo IV^[142]. Il braccio afferente del mecano riflesso è costituito da fibre di tipo III che terminano liberamente nell'interstizio muscolare; queste terminazioni rispondono alla stimolazione meccanica e cominciano a scaricare all'inizio dell'attività muscolare^[142]. Le afferenze giungono al corno dorsale del midollo spinale. I circuiti neurali attivati dall'ergoriflesso nel sistema nervoso centrale non sono ancora stati completamente definiti^[142]. Durante stimolazione metabocettiva è stata individuata un'attivazione di varie regioni bulbari, che sono in parte le stesse regioni che rispondono a stimoli chemocettivi.

L'aumento pressorio durante stimolazione metabocettiva è stato attribuito ad un aumento delle resistenze periferiche, mediato dal simpatico^{[149][150]}. L'effetto sulla gittata sistolica sembra essere variabile a seconda della modalità di evocazione del metaboriflesso; in soggetti sani, non è stato riscontrato alcun effetto significativo sulla frequenza cardiaca^[142].

Come riportato per la prima volta nel 1992 da Piepoli e Coats, l'attivazione del metaboriflesso determina anche un aumento della ventilazione in soggetti sani^[151]. Questo fenomeno costituisce una risposta funzionale all'esigenza di aumentare la perfusione e l'ossigenazione delle masse muscolari. La ventilazione può essere misurata facilmente e il suo andamento durante stimolazione metabocettiva è più riproducibile rispetto a quello di parametri emodinamici^[152]. Nei loro studi su pazienti con scompenso cardiaco, Piepoli e Coats hanno valutato l'attivazione metabocettiva quasi esclusivamente in termini di risposta ventilatoria^[153]; il loro protocollo è stato utilizzato anche nel presente lavoro perché già validato da questi autori e di semplice impiego. Tale protocollo è descritto nel paragrafo 3.4. Per una visione generale delle funzioni fisiologiche del metaboriflesso si veda la *Figura 2.5*.

Per quanto riguarda il mecanoriflesso, esso determinerebbe un aumento pressorio mediante un incremento delle resistenze vascolari periferiche e un aumento della frequenza cardiaca^[142]. Piepoli e Coats non hanno riscontrato un effetto della stimolazione mecano-cettiva (mobilitazione passiva) sulla ventilazione^[144].

La valutazione della funzione fisiologica del mecanoriflesso è ostacolata dalla sostanziale impossibilità di evocare selettivamente questo riflesso^[142]. Come ammesso dagli autori

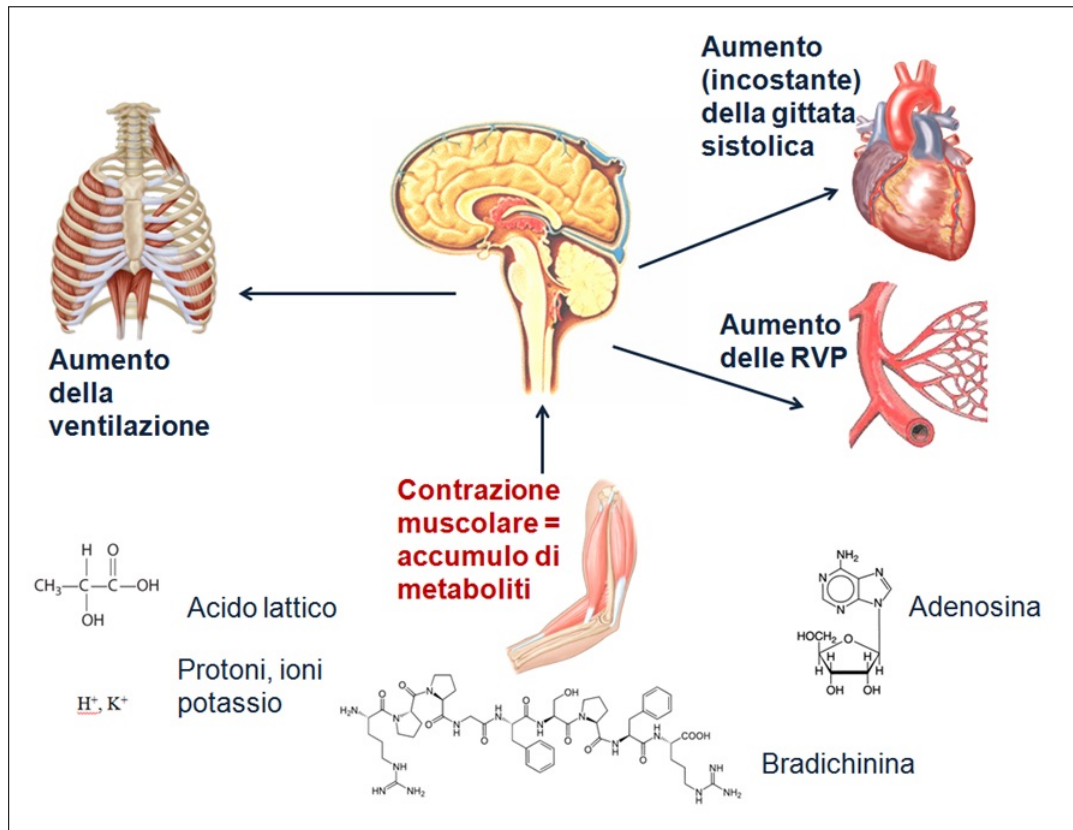


Figura 2.4: **Metaboriflesso**

Il metaboriflesso è la componente dell'ergoriflesso attivata dall'accumulo di metaboliti nel muscolo scheletrico, principalmente acido lattico, protoni, ioni potassio, bradichinina e adenosina. Il metaboriflesso causa un aumento della ventilazione, determina un incremento delle resistenze vascolari periferiche (RVP) e, a seconda delle modalità di evocazione di questo riflesso, può determinare o meno un incremento della gittata sistolica (GS).

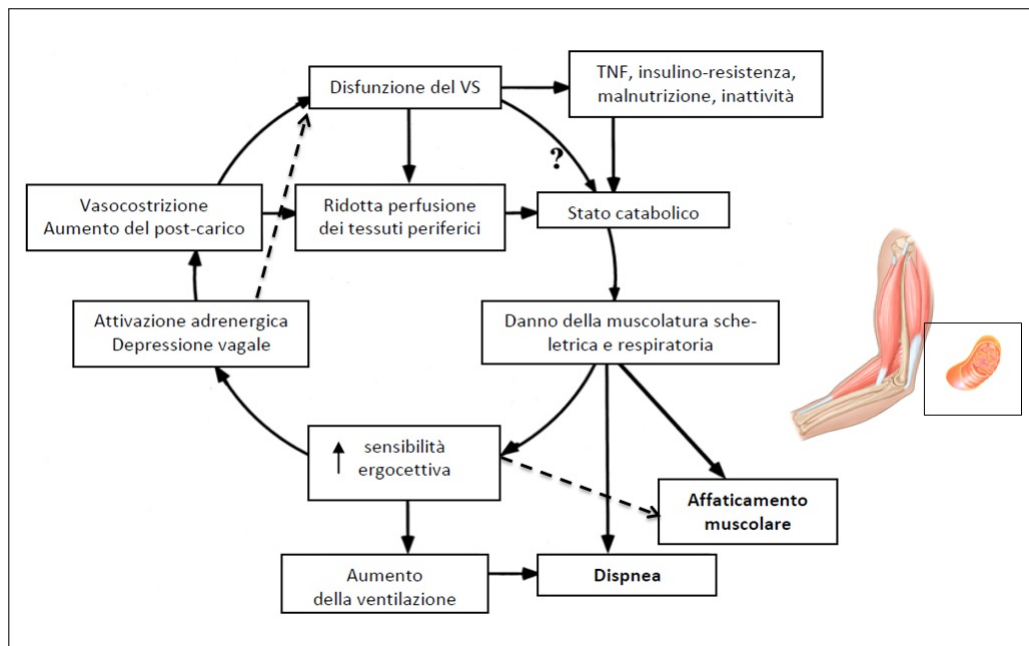


Figura 2.5: Il danno muscolare come possibile determinante di cardiopatia

Una deplezione primitiva del muscolo scheletrico potrebbe aumentare la sensibilità ergocettiva, contribuendo alla dispnea da sforzo, alla disautonomia e in ultima analisi al danno cardiaco. *Adattata da Piepoli et al., 1996^[140]*

che maggiormente hanno studiato il meccanoriflesso (Sinoway e Middlekauff), non esistono protocolli ottimali di valutazione: in effetti, la contrazione muscolare volontaria si associa sia ad un comando centrale che all'attivazione del metaboriflesso, la contrazione involontaria (mediante stimolazione elettrica) è dolorosa, la mobilizzazione passiva può causare una risposta di *arousal* con attivazione adrenergica^[154]. Per questi motivi, nel presente studio è stato valutato solo il metaboriflesso.

Prima del 2014, l'ergoriflesso era stato indagato solo nell'ambito dello scompenso cardiaco, anche se alcuni autori avevano ipotizzato che la sensibilità ergocettiva potesse aumentare anche in patologie neuromuscolari, quali le distrofie muscolari e la malattia mitocondriale.

2.7 La heart hypothesis di una miopatia?

Dato che, nello scompenso cardiaco, la disfunzione cardiaca può causare un danno muscolare e quest'ultimo può aggravare la disfunzione cardiaca, è ragionevole ipotizzare che anche una patologia muscolare primitiva possa avere ripercussioni negative sul cuore (*Figura 2.6*).

Il muscolo scheletrico è un bersaglio privilegiato della malattia mitocondriale.

La miopatia è documentabile mediante:

- valutazione clinica: riduzione della capacità di movimento e della tolleranza allo sforzo;
- tecniche istologiche e immunoenzimatiche: alterazioni delle fibre muscolari (atrofia, *ragged red fibers*), ridotta espressione di enzimi del metabolismo ossidativo (citocromo c ossidasi);
- elettromiografia: *pattern* di scarica di tipo miopatico;
- dosaggio di biomarcatori: aumento dei livelli basali e/o durante esercizio di creatin-fosfochinasi (CPK), lattico deidrogenasi (LDH), mioglobina, acido lattico;
- tecniche di *imaging*: *T1-mapping* del muscolo, spettroscopia RM con ^1H (per documentare la sostituzione fibroadiposa a livello muscolare).

Quando ricercata a tutti questi livelli, la miopatia scheletrica risulta pressoché costante in pazienti con malattia mitocondriale, anche se può assumere gravità variabile a seconda dei casi^{[43][44]}.

È ragionevole ritenere che il danno della muscolatura scheletrica, che coinvolge anche i muscoli respiratori, determini i sintomi di dispnea da sforzo e facile affaticamento muscolare, anche se la natura di questa relazione di causa-effetto va indagata nel dettaglio.

A nostra conoscenza, non è stata riportata in letteratura la prevalenza di dispnea e affaticamento in pazienti con malattia mitocondriale. Viceversa, l'analisi di pazienti con dispnea e affaticamento *sine materia* può condurre alla diagnosi di malattia mitocondriale^[155] e in una casistica di un centro di riferimento per la dispnea, 28 su 331 pazienti con dispnea inspiegata (8,5%) presentava una patologia mitocondriale; includendo i pazienti con diagnosi possibile ma non suffragata da un'indagine genetica, la prevalenza arrivava al 10,6%^[156]. La malattia mitocondriale dovrebbe quindi essere considerata nella diagnosi differenziale in caso di dispnea da sforzo e facile affaticamento.

Come riportato nella *Figura 2.6*, questi due sintomi potrebbero essere conseguenza diretta del danno muscolare, ma potrebbero anche essere mediati da un aumento della sensibilità ergocettiva, conseguente alla miopatia. In effetti, l'ergoriflesso regola la ventilazione e la sua iperattività può causare dispnea da sforzo, nonché, probabilmente, un'aumentata percezione di fatica muscolare.

Un aumento della sensibilità ergocettiva potrebbe causare anche una disautonomia, con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico.

La disautonomia può essere dimostrata mediante:

- analisi del segnale ECG (preferibilmente Holter) nel dominio del tempo e, in modo meno attendibile, nel dominio delle frequenze;
- dosaggio dei livelli basali di catecolamine.

A nostra conoscenza, la presenza di disautonomia in pazienti con malattia mitocondriale era stata suggerita solo da due studi su piccole popolazioni di pazienti^{[87][157]}. I dettagli di questi studi verranno presentati nella *Discussione*, alla luce dei risultati emersi nel presente studio.

Un ipertono simpatico è stato molto più ampiamente documentato in pazienti con varie forme di distrofia muscolare^[158]. Per spiegare questo reperto, nel 2014 Smith *et al.* hanno proposto che l'ergoriflesso sia iperattivo in questi pazienti miopatici^[158]. Più precisamente, questi autori hanno ipotizzato un aumento della sensibilità meccanocettiva, dato che la risposta alla stimolazione meccanocettiva è stata studiata essenzialmente in termini di risposta neurovascolare, mentre gli studi sul metaboriflesso si sono concentrati sulla risposta ventilatoria (si veda il paragrafo 2.6). Per questo motivo, in uno dei due studi sulla disautonomia nei pazienti mitocondriopatici, Bates *et al.* hanno ipotizzato un aumento della sensibilità meccanocettiva. Al contrario, Heinicke *et al.* ^[159]e Taivassalo *et al.*^[160] si sono concentrati sulla dispnea da sforzo e hanno proposto un aumento della sensibilità metabocettiva come possibile determinante.

Scopo della tesi

In questo studio abbiamo sottoposto pazienti con malattia mitocondriale e senza impegno cardiaco noto ad una valutazione cardiologica esaustiva. Ci siamo proposti di verificare la presenza di una cardiopatia morfologica e/o funzionale in questi pazienti e di ricercare l'attivazione di meccanismi sistemici caratterizzati nello scompenso cardiaco; tali meccanismi possono contribuire ai sintomi di dispnea da sforzo e affaticamento, nonché promuovere l'insorgenza e la progressione del danno cardiaco.

Capitolo 3

Metodi

3.1 Soggetti arruolati nello studio

Tra il gennaio 2014 e il maggio 2015 sono stati arruolati 25 pazienti segnalati dalla Clinica Neurologica di Pisa, uno dei centri di riferimento italiani per la patologia mitocondriale.

I pazienti arruolati rispondevano ai seguenti requisiti:

- diagnosi certa o probabile di malattia mitocondriale;
- nessuna patologia cardiaca nota.

Per i dettagli della valutazione neurologica si rimanda ad una pubblicazione dedicata^[161].

In sintesi, questi pazienti erano stati sottoposti a:

- valutazione clinica;
- test ischemico con dosaggio dell'acido lattico (tutti i pazienti collaboranti);
- elettromiogramma, per verificare la presenza di un *pattern* miopatico (circa 1/3 dei pazienti).
- biopsia muscolare con valutazione istologica e immunoenzimatica (tranne alcuni casi in cui la diagnosi genetica era stata posta in tempi brevi);
- ricerca di mutazioni patogenetiche a livello di muscolo scheletrico, leucociti circolanti, sedimento urinario (tutti i pazienti);
- RM dell'encefalo con m.d.c. (tutti i pazienti senza controindicazioni alla RM).

Ventuno pazienti avevano ricevuto una diagnosi di certezza di malattia mitocondriale, in seguito all'individuazione di una mutazione di sicuro significato patogenetico. Nel caso degli altri 4 pazienti la diagnosi di malattia mitocondriale era considerata probabile alla

luce dei reperti clinici, istologici e immunoenzimatici, ma l'analisi genetica non aveva ancora fornito risultati conclusivi al momento dell'arruolamento nel nostro studio.

Tredici pazienti avevano già eseguito accertamenti cardiologici (valutazione clinica, ECG, ecocolor-Doppler cardiaco); nessun paziente era stato sottoposto a RM cardiaca con m.d.c. né aveva una patologia cardiaca nota.

La valutazione cardiologica si è svolta presso la Fondazione Toscana Gabriele Monasterio (FTGM), in regime di *Day Service* per i pazienti residenti in Toscana, di ricovero ordinario per i pazienti residenti in altre regioni. Tutti i pazienti hanno fornito il consenso informato. Il protocollo di studio era conforme alla dichiarazione di Helsinki del 1975. La valutazione si è svolta nel corso di tre giorni.

Preliminarmente alla valutazione e d'accordo con i neurologi di riferimento, i pazienti sono stati suddivisi in base a:

1. Stato psicofisico:

- Gruppo A: pazienti in buone condizioni psicofisiche, che avrebbero potuto fornire una *compliance* adeguata anche alle prove più impegnative (test ergometrico cardiopolmonare, prove di funzionalità respiratoria e misurazione delle massime pressioni respiratorie, analisi dei riflessi cardio-respiratori);
- Gruppo B: pazienti in discrete condizioni psicofisiche, per cui erano prevedibili difficoltà ad eseguire le suddette prove;
- Gruppo C: pazienti che potevano essere sottoposti soltanto agli accertamenti diagnostici non richiedenti la loro attiva partecipazione.

2. Mutazione genetica:

- Gruppo 1: mutazione dell'mtDNA
- Gruppo 2: mutazione dell'nDNA
- Gruppo 3: non mutazione patogenetica nota.

Tutti i pazienti di gruppo A sono stati associati per sesso ed età a soggetti di controllo appartenenti alla FTGM o alla Scuola Superiore Sant'Anna. Questi soggetti erano sedentari, non presentavano patologie a carico dei sistemi cardiovascolare, respiratorio, neuromuscolare, né assumevano farmaci attivi su questi sistemi. I soggetti di controllo sono stati sottoposti a test ergometrico cardiopolmonare, analisi dei riflessi cardio-respiratori, ECG dinamico secondo Holter; un sottogruppo ha eseguito anche la spettroscopia RM del muscolo scheletrico con ^1H . Per i dettagli di queste prove si rimanda al seguito di questo capitolo.

3.2 Tecniche tradizionali di indagine: ECG, ecocolor-Doppler cardiaco, risonanza magnetica cardiaca

In seguito ad anamnesi ed esame obiettivo cardiologico, tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ECG standard a 12 derivazioni. Gli esami sono stati refertati da uno cardiologo, che ha analizzato i seguenti dati: ritmo, frequenza cardiaca (FC), durata degli intervalli PR, QRS, QT, QT corretto (QTc), orientamento dell'asse elettrico, presenza di extrasistoli sopraventricolari o ventricolari, presenza di alterazioni morfologiche aspecifiche (ad esempio, onda T piatta in aVL) o di anomalie ben definite (ad esempio, blocco di branca destra).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a ecocolor-Doppler cardiaco. Tutti gli ecocardiogrammi sono stati eseguiti e refertati dalla stessa sonografa, che non era a conoscenza dei risultati di tutti gli altri test. L'apparecchiatura utilizzata è stata l'ecografo Philips IE33 *Ultrasound machine (Philips Medical Systems, Palo Alto, California, USA)*. Gli spessori, le dimensioni e l'analisi della cinetica regionale e globale del ventricolo sinistro sono stati misurati utilizzando le procedure standard codificate dalle linee guida dell'*American Society of Echocardiography e dell'European Association of Cardiovascular Imaging*^[162].

Il software TomTec (4D *LV-Analysis*©, *TomTec Imaging Systems*) è stato utilizzato per analizzare la cinesi globale e regionale del ventricolo sinistro a partire dall'acquisizione tridimensionale.

Tutti i pazienti senza controindicazioni sono stati sottoposti a RM cardiaca con m.d.c. (1.5 T *total body scan, General Electric Healthcare, Milwaukee, Wisconsin*). Sono stati utilizzati protocolli standard per la valutazione dei volumi e della funzione delle camere cardiache e per l'individuazione della fibrosi miocardica; per i dettagli tecnici, si rimanda ad una pubblicazione dedicata^[163]. Sono state effettuate le seguenti acquisizioni aggiuntive:

- *cardiac tagging*: sovrapposizione di una griglia all'immagine del ventricolo sinistro e analisi della sua deformazione per valutare la cinesi ventricolare regionale e globale;
- analisi *T1-mapping* del cuore: valutazione del segnale T1 a livello di singolo pixel, durante e dopo somministrazione di m.d.c., per stimare il volume del tessuto extracellulare a livello cardiaco;
- analisi *T1-mapping* del muscolo scheletrico: procedura analoga, che consente di quantificare il volume del tessuto extracellulare nel muscolo scheletrico (braccio destro);
- spettroscopia RM con ¹H del muscolo scheletrico (braccio destro): valutazione della composizione del muscolo (rapporto tessuto adiposo/acqua).

Per l'analisi dei risultati sono stati utilizzati software realizzati presso l'FTGM. Gli esami sono stati refertati indipendentemente da due cardiologi esperti in RM cardiaca, non a conoscenza di tutti gli altri risultati.

3.3 Ergoriflesso

L'ergoriflesso è stato esaminato in tutti i pazienti di gruppo A e di gruppo B, tranne singoli casi di intolleranza al boccaglio. È stato utilizzato il protocollo definito da Piepoli e Coats, che consente di analizzare il metaboriflesso^{[164][216]}. Sono state eseguite due prove separate da un intervallo di 30 minuti; l'ordine fra le due prove è stato casuale. I soggetti dovevano eseguire un esercizio con l'arto superiore non dominante. Una prova consisteva nella presa ritmica di un dinamometro alla metà della forza massimale predeterminata, alla frequenza di 40 prese al minuto per 3 minuti. Dopo l'esercizio si effettuava una registrazione di 3 minuti. L'altra prova era identica alla precedente fatto salvo il rigonfiamento di un bracciale di sfigmomanometro, a partire dalla fine della presa ritmica; la pressione nel bracciale era portata a 30 mmHg al di sopra della pressione sistolica misurata alla fine della presa ritmica. Lo scopo era quello di intrappolare i metaboliti nei muscoli che avevano eseguito l'esercizio.

Durante le due prove sono stati registrati di continuo segnale ECG, ventilazione e saturazione in ossigeno del sangue arterioso (mediante saturimetro). In base al protocollo definito da Piepoli *et al.*, la sensibilità metabocettiva è stata calcolata come la percentuale della risposta ventilatoria all'esercizio mantenuta dall'occlusione circolatoria, al terzo minuto del recupero, confrontata con il recupero senza occlusione circolatoria.

3.4 Test ergometrico cardiopolmonare

Tutti i pazienti dei gruppi A e B ed i soggetti di controllo hanno eseguito un test ergometrico cardiopolmonare su cicloergometro, utilizzando un protocollo di incremento del carico di lavoro pari a 10 W/min. Sono stati misurati in continuo il consumo di ossigeno (VO_2), la produzione di anidride carbonica (VCO_2) e la ventilazione/minuto utilizzando l'analizzatore Vmax (*Sensormedics, Conshohocken, Pennsylvania*). Sono stati determinati anche la *slope* ventilazione/produzione di CO_2 , come indice di efficienza ventilatoria, e altri indici di risposta cardio-respiratoria allo sforzo; per i dettagli si rimanda ad una pubblicazione dedicata^[165].

Al termine della prova, è stato richiesto ai soggetti di assegnare un punteggio da 1 a 10 all'affaticamento muscolare agli arti inferiori e alla dispnea da sforzo (scala di Borg)^[166].

3.5 Analisi della funzione respiratoria

Tutti i pazienti di gruppo A e B hanno eseguito le prove di funzionalità respiratoria, la valutazione della capacità di diffusione del monossido di carbonio, la misurazione delle massime pressioni inspiratoria ed espiratoria. Per i dettagli tecnici si rimanda ad una pubblicazione dedicata^[168].

I pazienti sono stati sottoposti anche a radiografia del torace in due proiezioni ed emogasanalisi.

Ventiquattro pazienti hanno eseguito un monitoraggio cardiorespiratorio a lungo termine denominato Somtè (*Compumedics, Abbotsford, Australia*), che registra in modo continuo i seguenti segnali: flusso nasale mediante un trasduttore di pressione, ECG, movimenti addominali e toracici mediante due fasce che utilizzano la pletismografia a induttanza e la saturazione di ossigeno (SaO_2) mediante un saturimetro. Questo sistema permette di effettuare un monitoraggio del respiro fino a una durata massima di 24 ore.

Un tecnico del sonno, non a conoscenza dei risultati di tutti gli altri test, ha analizzato tutte le registrazioni poligrafiche. In base alla nomenclatura tradizionale, si definisce apnea la cessazione del flusso respiratorio per almeno 10 secondi e l'ipopnea come una riduzione di oltre il 50% del flusso respiratorio con una durata di almeno 10 secondi, accompagnata da una riduzione della SaO_2 di almeno 4 punti percentuali. Il grado di severità del periodo è indicato dal numero di apnee-ipopnee/ora (*apnea-hypopnea index, AHI*)^[169].

La simultanea assenza del flusso respiratorio e dei movimenti respiratori cardioracici indica la presenza di un'apnea centrale. L'apnea viene comunemente definita "ostruttiva" in caso di assenza del flusso aereo in concomitanza con movimenti toracici e addominali^[169]. Nel presente studio, le apnee ostruttive sono state distinte in base alla loro lunghezza; in effetti, le apnee ostruttive "tradizionali", dovute ad un collasso delle vie aeree e riscontrabili nella sindrome delle apnee ostruttive del sonno (*obstructive sleep apnea syndrome*), hanno una durata media di $16,5 \pm 3,9$ s^[170], mentre in base alla nostra esperienza le apnee ostruttive ascrivibili ad una debolezza della muscolatura respiratoria presentano tipicamente una durata maggiore. Come *cut-off* fra i due tipi di apnea ostruttiva è stato scelto il *cut-off* di 30 s (oltre 3 deviazioni standard oltre la durata media sopra indicata)^[170].

3.6 Chemoriflesso, baroriflesso

Il chemoriflesso è stato valutato utilizzando la tecnica del *rebreathing*, come descritto precedentemente^[171]. L'ECG, il flusso aereo e i gas respiratori sono stati misurati in continuo attraverso un analizzatore di gas respiratori (*Vmax, Sensormedics, Yorba Linda, CA, USA*) e la SaO_2 mediante un pulsossimetro (*Masimo SET Radical*). Tutti i segnali sono

stati digitalizzati on-line (*National Instruments, USA*, frequenza di campionamento 500 Hz) e analizzati utilizzando un software realizzato presso l'FTGM (*Pulse Viewer*) per derivare in continuo frequenza respiratoria, volume corrente, ventilazione/minuto (VE), SaO₂ e pressione di fine espirazione di CO₂ (PETCO₂). Dopo cinque minuti di registrazione basale, eseguita durante respiro spontaneo, sono state effettuate in ordine casuale le prove ipossica-normocapnica e normossica-iperapnica. Durante la prova ipossica-normocapnica, il soggetto sviluppa progressivamente una condizione di ipossia mediante il consumo dell'aria presente all'interno di un circuito chiuso, fino a raggiungere valori di saturazione al termine della prova fra il 70 e l'80%, a seconda della tolleranza individuale; nel corso di questa prova la concentrazione di CO₂ viene mantenuta costante (utilizzando come riferimento il valore basale del paziente) facendo passare l'aria espirata attraverso un assorbitore contenente calce prima di raggiungere il contenitore di *rebreathing*. Durante la prova ipercapnico-ipossica, il paziente va incontro ad un incremento progressivo dei valori di CO₂, che si accumula nel circuito chiuso per produzione da parte del soggetto, fino a raggiungere valori di PETCO₂ di 50 mmHg o un aumento di almeno 10 mmHg dal valore basale, in relazione alla tolleranza individuale; durante questa manovra, la pressione parziale di O₂ viene mantenuta costante aggiungendo O₂ al circuito.

In seguito all'esecuzione delle manovre, attraverso il software dedicato, è possibile calcolare la risposta ventilatoria all'ipossia (HVR) come il coefficiente angolare della retta di regressione tra VE e la SaO₂ calcolata durante la prova ipossica-normocapnica. Analogamente, la risposta ventilatoria all'iperapnia (HCVR) viene espressa come il coefficiente angolare della retta di regressione tra VE e PETCO₂ calcolata durante la prova normossica-iperapnica^[171].

Il baroriflesso è stato esaminato in tutti i pazienti con tecnica non invasiva, codificata da Bernardi *et al.*^[172] e validata da Mirizzi *et al.* nei pazienti con scompenso cardiaco^[173]. Il segnale ECG e la pressione arteriosa sono stati registrati in continuo per 10 min, mentre il paziente era supino e a riposo; è stato poi calcolato il rapporto fra la deviazione standard dell'intervallo RR e la deviazione standard della pressione sistolica.

3.7 Analisi della funzione autonoma

L'incompetenza cronotropa è definita come un aumento della frequenza cardiaca inappropriatamente basso in proporzione al carico di lavoro, durante test cardiopolmonare. L'incompetenza cronotropa può essere espressione di una patologia del nodo senoatriale oppure può esprimere una disautonomia con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico^[174].

La presenza di incompetenza cronotropa è stata valutata nel corso del test cardiopolmonare mediante il calcolo del *chronotropic response index*, secondo Lauer *et al.*:

$$\text{Chronotropic response index}(CRI) = \frac{FC_{picco} - FC_{riposo}}{220 - \text{età} - FC_{riposo}} \times 100$$

Si parla di incompetenza cronotropa quando il valore di CRI è $<0,80$ ^[174].

La registrazione elettrocardiografica nelle 24 ore è stata ottenuta per mezzo di un dispositivo digitale Holter (*ELA Medical, Sorin, Arvada, CO, USA*) con la registrazione di tre derivazioni ECG (precordiale, posteriore, inferiore). Nei pazienti in ritmo sinusale, oltre all'analisi Holter standard è stata analizzata anche la variabilità circadiana della frequenza cardiaca, mediante un'analisi del segnale nel dominio del tempo e nel dominio delle frequenze.

Per quanto riguarda l'analisi nel dominio del tempo, sono state calcolate la deviazione standard di tutti gli intervalli RR (SD), la deviazione standard dei valori medi degli intervalli RR in tutti i periodi di 5 min della registrazione (SDANN), la radice quadrata della media della somma dei quadrati delle differenze tra intervalli RR adiacenti (rMSSD) e la percentuale di intervalli RR che differiscono per oltre 50 s sul totale degli intervalli RR (pNN50).

Durante l'analisi nel dominio delle frequenze, sono stati ricavati i seguenti parametri sull'intera durata della registrazione, nelle ore diurne e nelle ore notturne:

- potenza della componente a bassa frequenza (LF) del segnale, che dipende dal tono simpatico e in misura di almeno il 25% dal tono parasimpatico;
- potenza della componente ad alta frequenza (HF) del segnale, che dipende in misura del 90% circa dal tono parasimpatico e del 10% circa da fattori emodinamici;
- rapporto fra la potenza delle due componenti (LF/HF *ratio*): indice approssimativo del bilancio fra tono simpatico e tono parasimpatico.

La funzione autonoma è stata esaminata anche mediante l'analisi della sensibilità barocettiva (si veda il paragrafo 3.6) e con il dosaggio delle catecolamine (noradrenalina, adrenalina); il prelievo è stato eseguito alle ore 8.00, a digiuno e dopo 20 minuti di riposo in clinostatismo.

3.8 Valutazione biumorale

Con le stesse modalità del dosaggio delle catecolamine, sono stati eseguiti i dosaggi delle seguenti molecole:

- troponina T e troponina I;
- galectina-3;
- peptidi natriuretici: BNP e NT-proBNP;
- attività reninica plasmatica, aldosterone;
- CPK, mioglobina, LDH;
- acido lattico;
- esame emocromocitometrico, ormoni tiroidei.

La troponina T è stata dosata con tecnica altamente sensibile (*Roche Diagnostics, fourth-generation assay*; limite di rivelabilità 3 ng/L, 99° percentile <14 ng/L). In seguito ad uno studio che ha messo in dubbio la specificità della troponina T come marcatore di danno cardiaco in pazienti miopatici, è stata dosata la troponina I con due metodi:

- Abbott Diagnostics Architect STAT: limite di rilevabilità 1,1-1,9 ng/L, 99° percentile 15,6 ng/L (donne), 34,2 ng/L (uomini)^[175];
- Beckman Coulter Access AccuTnI: limite di rivelabilità 2,6 ng/L, 99° percentile 34 ng/L^[176].

La Gal-3 è stata dosata con tecnica ELISA (Abbott ARCHITECT *immunoassay*). Come limite superiore dell'intervallo di riferimento è stato scelto il 75° percentile della distribuzione dei valori di Gal-3 in una popolazione sana (14,1 ng/mL)^{[177][178]}.

Per i dettagli tecnici dei dosaggi delle altre molecole si rimanda a pubblicazioni ^{[179][180]} dedicate.

3.9 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma SPSS 21.0 (1989-2012, *LEAD technologies Inc., USA*). In relazione alla numerosità limitata del campione in esame, si è deciso di esprimere la distribuzione delle variabili in modo uniforme come mediana e *range* interquartile, indipendentemente dal tipo di distribuzione della variabile (normale o non normale). Le differenze medie tra 2 gruppi sono state valutate attraverso il test T

di Student o il test di Mann-Whitney U, quando appropriato, mentre nel caso di comparazioni multiple è stata effettuata una analisi della varianza (ANOVA) con correzione di Bonferroni, o un test di Kruskal e Wallis tra più gruppi indipendenti, e test di Dunn, quando appropriato. Le variabili discrete sono state confrontate con il test del chi-quadro con correzione di Yates o il test di Fisher. La correlazione di Spearman è stata utilizzata per determinare il rapporto diretto fra le diverse variabili numeriche. Il *cut-off* di due parametri (noradrenalina e galectina-3) è stato calcolato ricavando la curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*). Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato significativo.

Capitolo 4

Risultati

4.1 Pazienti, soggetti di controllo

In questo studio sono stati valutati 25 pazienti senza cardiopatia nota. Le caratteristiche principali di questa popolazione sono riassunte nella *Tabella 4.1*.

Il 60% dei pazienti presentava una mutazione patogenetica nel DNA mitocondriale (mtDNA), il 24% una mutazione nel DNA nucleare (nDNA), mentre nel 16% dei pazienti non era ancora stata individuata una mutazione patogenetica nonostante l'insieme dei dati clinici, istologici e immunoenzimatici fosse indicativo di malattia mitocondriale. L'inclusione di tutti questi pazienti in un unico gruppo era giustificata dal fatto che l'esito comune delle varie mutazioni è una generica disfunzione mitocondriale.

Come in tutte le coorti di pazienti con malattia mitocondriale, questi pazienti presentavano un ampio spettro di manifestazioni cliniche. In 11 pazienti (44%) era stata diagnosticata una sindrome specifica (MELAS, 2 pazienti; sindrome di Kearns-Sayre, 2 pazienti; CPEO, 7 pazienti). In questi pazienti risultava pressoché costante il coinvolgimento del muscolo scheletrico, oggettivabile mediante il riscontro di anomalie di uno o più dei seguenti esami: test ischemico con dosaggio dell'acido lattico, biopsia muscolare (valutazione istologica e immunoenzimatica), EMG. Quattordici pazienti (56%) presentavano quadri non sindromici: le principali manifestazioni cliniche erano l'encefalomiopatia (8 pazienti, 32%), la miopatia isolata (4 pazienti, 16%), il diabete mellito (4 pazienti, 16%), l'ipoacusia neurosensoriale (3 pazienti, 12%).

Un danno muscolare scheletrico era stato ricercato, in ambito neurologico, mediante:

- valutazione clinica: limitazione della capacità di movimento e della tolleranza allo sforzo;
- test ischemico con dosaggio dell'acido lattico: aumento abnorme dei livelli di acido lattico durante esercizio e/o lento ritorno dell'acido lattico ai valori basali;

Iniziali pazienti	Sesso	Età	Quadro clinico	Test lattato anormale	EMG miopatico	Biopsia miopatia	Mutazione	Genoma
CMG	F	39	MELAS	Negativo	Positivo	Positivo	A3243G	mtDNA
PR	M	45	Encefalo- miopatia	-	Positivo	-	A3243G	mtDNA
PM	F	40	Dispnea da sforzo	-	-	-	A3243G	mtDNA
DFA	F	30	Miopatia	Positivo	Positivo	-	A3251G	mtDNA
PI	F	28	Miopatia	Negativo	Positivo	-	G11778A, A5814G	mtDNA
GG	M	41	CPEO	Positivo	Positivo	Positivo	Delezione singola	mtDNA
EA	F	16	Kearns- Sayre	-	Positivo	Positivo	Delezione singola	mtDNA
FG	M	41	CPEO, miopatia	Positivo	-	Positivo	Delezione singola	mtDNA
AM	M	41	Encefalo- miopatia diabete ipoacusia neurosen- soriale	Positivo	Positivo	Positivo	Delezione singola	mtDNA
AEN	F	44	CPEO, miopatia	Positivo	Positivo	Positivo	Delezione singola	mtDNA
DS	F	45	ipoacusia neurosen- soriale, miopatia	-	-	Positivo	A1555G	mtDNA
CS	M	61	Encefalo- miopatia	Positivo	-	Positivo	A3251G	mtDNA
CAM	F	75	CPEO, miopatia	-	-	Positivo	Delezione singola	mtDNA
HE	F	22	MELAS	-	Positivo	Positivo	G15092A	mtDNA
BA	F	59	Encefalo- miopatia	Positivo	-	Positivo	A1555G	mtDNA
VP	F	50	Kearns- Sayre	Negativo	-	Negativo	Mutazione gene Twinkle	nDNA
TG	M	55	CPEO, miopatia	Positivo	Positivo	Positivo	Mutazione gene Twinkle	nDNA
CA	M	66	Miopatia, diabete	Positivo	-	Positivo	Mutazione gene POLG	nDNA
CE	F	26	Encefalo- miopatia	Negativo	Negativo	Positivo	Mutazione gene AARS	nDNA
BG	F	61	Encefalo- miopatia	Positivo	-	Positivo	Mutazione gene AARS	nDNA
GS	M	67	Encefalo- miopatia	Positivo	Negativo	Negativo	Mutazione gene POLG	nDNA
GML	F	46	CPEO, miopatia	Positivo	Positivo	Positivo	Analisi genetica in corso	Analisi genetica in corso
OC	F	56	CPEO, miopatia, diabete	Positivo	-	Positivo	Analisi genetica in corso	Analisi genetica in corso
FP	F	55	Miopatia	Positivo	Positivo	Positivo	Analisi genetica in corso	Analisi genetica in corso
FG	F	65	Encefalo- miopatia, ipoacusia neurosen- soriale, diabete	Positivo	Positivo	Positivo	Analisi genetica in corso	Analisi genetica in corso

Tabella 4.1: Principali caratteristiche genetiche e cliniche dei pazienti valutati

L'ordine dei pazienti riflette la suddivisione genetica (gruppi 1, 2, 3). Sono riportati tre accertamenti neurologici: test ischemico con dosaggio seriato dell'acido lattico, elettromiogramma (EMG), biopsia muscolare. Abbreviazioni: CPEO, *chronic external progressive ophthalmoplegia* (oftalmoplegia esterna cronica progressiva); MELAS, *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes* (encefalopatia mitocondriale, acidosi lattica, episodi simil-ictali); mtDNA, DNA mitocondriale; nDNA, DNA nucleare; POLG, polimerasi gamma.

- elettromiogramma (EMG): *pattern* di scarica di tipo miopatico (potenziali più piccoli e ampi);
- biopsia muscolare: valutazione istologica (atrofia, fibrosi interstiziale, accumulo di mitocondri anomali in sede subsarcolemmale) e immunoenzimatica (deficit dell'enzima della catena respiratoria citocromo c reduttasi).

Per quanto concerne la valutazione clinica, in molti casi risultava compromesso lo sviluppo di forza e/o si riscontrava un precoce esaurimento muscolare. Come nelle altre patologie neuromuscolari, si riscontrava un coinvolgimento preferenziale della muscolatura del tronco e di quella prossimale degli arti. Questi dati non sono stati riportati nella *Tabella 4.1* in quanto non quantificabili e riportati solo occasionalmente nei referti.

La caratterizzazione “oggettiva” del danno muscolare è risultata eterogenea (*Tabella 4.1*), in quanto solo 9/25 pazienti (36%) hanno eseguito tutti e tre gli accertamenti. Negli altri casi era stata individuata in tempi relativamente rapidi una mutazione di sicuro significato patogenetico, per cui era stata posta una diagnosi di malattia mitocondriale; a quel punto l'esecuzione di esami quali l'EMG o la biopsia muscolare era stata rimandata, considerando prioritari accertamenti in ambito cardiologico. Questo era ad esempio il caso della paziente PM, in cui era stata individuata recentemente la mutazione m.3243A>G in seguito ad uno *screening* familiare.

Tranne PM, tutti i pazienti arruolati avevano eseguito almeno uno dei tre accertamenti. In tutti i casi almeno uno degli esami effettuati aveva mostrato alterazioni di tipo miopatico. Per quanto riguarda il tipo di esame, al test ischemico con dosaggio dell'acido lattico la risposta risultava anomala in 9 pazienti su 16 (80%); 13 su 15 pazienti (87%) presentavano un *pattern* miopatico all'EMG e in 19 su 21 pazienti (90%) erano riscontrabili anomalie istologiche e/o immunoenzimatiche alla biopsia muscolare.

Nel contesto del presente studio, abbiamo cercato di caratterizzare ulteriormente il danno muscolare mediante la spettroscopia RM con ^1H e l'analisi *T1-mapping* del muscolo scheletrico (si veda il paragrafo 4.2).

La *Tabella 4.2* riporta i dati salienti dell'anamnesi cardiologica.

I fattori di rischio cardiovascolare più frequenti sono risultati fumo e diabete mellito (entrambi 6/25 pazienti, 24%). Sono stati riscontrati 6 casi (24%) di ipertensione in trattamento. Per quanto riguarda la terapia, 2/25 pazienti (8%) assumevano un β -bloccante e 5/25 pazienti (20%) un ACE-inibitore o un sartano.

I 13 pazienti di gruppo A, cioè in migliori condizioni psicofisiche e capaci di fornire la migliore *compliance* a tutte le prove, sono stati associati ad altrettanti controlli di pari sesso ed età. Nella *Tabella 4.3* vengono presentate le principali caratteristiche dei soggetti

Iniziali paziente	Divisione genetica	Divisione psicofisica	Precedente valutazione cardiologica	Dispnea da sforzo (NYHA II-III)	Fattori di rischio CV	Farmaci attivi sul sistema CV
CMG	1	A	Sì	Sì	Diabete ipertensione	Olmesartan 10 mg/die
PR	1	A	Sì	Sì	No	No
PM	1	A	No	Sì	Fumo	No
DFA	1	A	No	Sì	No	No
PI	1	A	No	Sì	Fumo	No
GG	1	A	No	No	No	No
EA	1	A	Sì	No	No	No
FG	1	A	Sì	Sì	Sovrappeso, ipertensione	Ramipril 2,5mg/die
AM	1	A	Sì	Sì	Diabete	No
AEN	1	A	No	No	No	No
DS	1	B	No	No	No	No
CS	1	B	No	No	No	No
CAM	1	B	Sì	Sì	Diabete, fumo, ipertensione	Bisoprololo 2,5 mg/die Perindopril 4 mg/die
HE	1	C	No	No	No	No
BA	1	C	Sì	No	Diabete, fumo	No
VP	2	A	No	No	No	No
TG	2	A	Sì	No	Ipertensione	Ramipril/HCT 5+25 mg/die
CA	2	B	Sì	No	Ipertensione	Diltiazem 60 mg 3/die Valsartan 160 mg/die
CE	2	C	Sì	No	No	No
BG	2	C	No	No	Fumo	No
GS	2	C	No	No	No	No
GML	3	A	No	Sì	No	No
OC	3	B	No	Sì	Diabete, fumo	No
FP	3	B	Sì	Sì	Ipertensione	Nadololo 20 mg/die
FG	3	B	Sì	Sì	No	No

Tabella 4.2: Dati principali emersi dall'anamnesi cardiologica

Nessun paziente aveva una cardiopatia nota, nonostante 12 avessero già eseguito accertamenti cardiologici.

Si riportano i dati relativi a dispnea da sforzo, fattori di rischio cardiovascolare e farmaci assunti

	Controlli (n=13)	Pazienti gruppo A (n=13)	Pazienti gruppo B (n=8)	Pazienti gruppo C (n=4)	Tutti i pazienti (n=25)
Maschi (%)	5 (38%)	5 (38%)	2 (25%)	1 (25%)	8 (32%)
Età (anni)	41 (35-50)	41 (35-48)	59 (52-66)	49 (27-60)	42 (39-54)
Peso (kg)	65 (61-70)	62 (56-79)	68 (62-78)	64 (55-68)	62 (56-74)
Altezza (cm)	170 (166-174)	167 (164-173)	165 (159-170)	168 (164-170)	167 (162-170)
BMI (kg*m ⁻²)	23,2 (21,2-24,2)	21,6 (20,0-26,5)	24,6 (23,7-26,6)	23,8 (22,2-24,7)	23,5 (20,4-25,6)
Emoglobina (g/dL)	-	13,4 (12,9-14,6)	14,2 (12,9-14,5)	13,4 (12,4-14,4)	13,9 (13,1-14,5)
TSH (μUI/mL)	-	2,32 (1,47-2,76)	1,74 (1,49-2,75)	2,23 (1,87-2,76)	2,22 (1,49-2,75)
Creatinina (mg/dL)	-	0,55 (0,48-0,71)	0,67 (0,45-0,86)	0,46 (0,31-0,47)	0,6 (0,5-0,7)
ALT (IU/L)	-	24 (16-40)	24 (14-34)	14 (11-34)	21 (15-32)
AST (IU/L)	-	21 (17-28)	18 (14-37)	15 (14-26)	22 (14-38)
GGT (IU/L)	-	14 (9-36)	17 (10-19)	30 (13-63)	17 (10-33)
Ipertensione	1 (7%)	3 (23%)	4 (50%)	1 (25%)	6 (24%)
Diabete mellito	0 (0%)	2 (15%)	3 (38%)	1 (25%)	6 (24%)
Dispnea da sforzo	0 (0%)	8 (62%)	4 (50%)	0 (0%)	12 (48%)

Tabella 4.3: Controlli e pazienti

Non si è ritenuto opportuno valutare emocromo, funzione tiroidea, renale ed epatica nei controlli.

Abbreviazioni: ALT, alanina aminotransferasi; AST, aspartato aminotransferasi; BMI, *body mass index*; GGT, gamma glutamil transpeptidasi; NYHA, *New York Heart Association*; TSH, ormone tireostimolante; VFG, velocità di filtrazione glomerulare.

di controllo, confrontati con la totalità dei pazienti.

Ad eccezione di tre pazienti con lieve anemia iposideremica, non sono stati riscontrati casi di anemia. La funzione tiroidea, renale ed epatica è risultata nei limiti della norma in tutti i casi.

I pazienti di gruppo A sono stati associati per sesso, età e livello di attività fisica a soggetti di controllo. I controlli non presentavano patologie a carico dei sistemi cardiovascolare, respiratorio, neuromuscolare, né assumevano farmaci attivi su questi sistemi. L'unica eccezione è stata rappresentata da un controllo affetto da ipertensione diastolica di grado lieve, per cui assumeva un ACE inibitore (ramipril 2,5 mg/die).

4.2 ECG, ecocolor-Doppler cardiaco, risonanza magnetica cardiaca

La caratterizzazione cardiologica è cominciata con l'esecuzione degli esami di *routine*, seguendo l'algoritmo di Bates *et al.*: ECG, ecocolor-Doppler cardiaco, risonanza magnetica cardiaca con m.d.c.

I principali risultati emersi dalla valutazione dell'ECG sono riportati nella *Tabella 4.4*.

	Pazienti (n=25)
Ritmo sinusale	25/25 (100%)
FC (b.p.m.)	76 (65-85)
FC >80 b.p.m.	7/25 (28%)
Durata PR (ms)	150 (140-170)
Preeccitazione ventricolare	0/25 (0%)
BAV I grado	1/25 (4%)
Durata QRS (ms)	108 (100-114)
BBS	1/25 (4%)
Deviazione assiale sinistra	3/25 (12%)
BBD	1/25 (4%)
Deviazione assiale destra	1/25 (4%)
Disturbo di conduzione destro	2/25 (8%)
Alterazioni aspecifiche della ripolarizzazione	5/25 (20%)
Durata QTc (ms)	418 (411-436)
QTc >430 ms (maschi) o 450 ms (femmine)	5/25 (25%)
EV	1/25 (4%)
ESV	0/25 (0%)

Tabella 4.4: **Reperti elettrocardiografici**

Abbreviazioni: BAV, blocco atrioventricolare; BBD, blocco di branca destra; BBS, blocco di branca sinistra; ESV, extrasistoli sopraventricolari; EV, extrasistoli ventricolari; FC, frequenza cardiaca; QTc, QT corretto.

Nel complesso, i reperti più frequenti sono stati i seguenti:

- una frequenza cardiaca elevata (>80 b.p.m.);
- alterazioni di incerto significato, quali deviazione assiale sinistra, disturbo di conduzione intraventricolare destro, anomalie aspecifiche della ripolarizzazione.
- cinque pazienti presentavano un intervallo QT corretto superiore ai valori di riferimento;
- un solo paziente presentava extrasistoli ventricolari isolate; nessun paziente presentava extrasistolia ventricolare o sopraventricolare in forma ripetitiva.

Anche l'ecocolor-Doppler cardiaco ha fornito relativamente poche informazioni (Tabella 4.5).

I volumi e la funzione sistolica del ventricolo sinistro sono risultati nella norma in tutti i pazienti, tranne un caso in cui la frazione di eiezione risultava ai limiti bassi della norma (53%).

Due pazienti (non ipertesi) soddisfacevano i criteri ecocardiografici per ipertrofia ventri-

Parametro	Valori di riferimento	Pazienti (n=25)
Diametro telediastolico VS (mL)	39-53 42-59 M, 39-53 F	45 (42-47) 47 (45-53) M, 43 (40-46) F
Diametro telediastolico VS indicizzato (mL/m ²)	24-32 22-31 M, 24-32 F	25 (24-27) 26 (21-27) M, 25 (24-27) F
Diametro telesistolico VS (mL)	-	29 (27-31) 32 (29-34) M, 27 (26-30) F
Diametro telesistolico VS indicizzato (mL/m ²)	-	17 (15-18) 17 (14-18) M, 17 (15-18) F
Spessore setto IV (mm)	<=11	9 (8-11)
Spessore parete infero-laterale (mm)	<=10	8 (8-10)
LVMi (g/m ²)	43-95 <115 M, <95 F	78 (66-85) 104 (87-116) M, 75 (59-85) F
Ipertrofia VS	-	2/25 (8%)
Rimodellamento ipertrofico	-	6/25 (24%)
Ipertrofia settale isolata	-	1/25 (4%)
GLS (%)	-20,3±3,2%	14,5 (-17,4 -13,2)
FE VS (%)	55-75%	64 (60-67)
E/A	1,5±0,4 (21-40 anni), 1,3±0,3 (41-60 anni)	1,1 (0,9-1,3)
DecT	166±14 (21-40 anni), 181±19 (41-60 anni)	187 (176-238)
E/E' medio	-	7 (6-9)
Disfunzione diastolica grado I	-	8/25 (32%)
Disfunzione diastolica di grado II-III	-	0/25 (0%)
Stenosi/insufficienza moderato-grave di una qualunque valvola	-	0/25 (0%)
PAPs (mmHg)	<30	27 (20-28)

Tabella 4.5: Reperti ecocardiografici

Per i valori di riferimento si rimanda a pubblicazioni dedicate^{[162][181]}.

Abbreviazioni: DecT, *deceleration time* (tempo di decelerazione del piano valvolare mitralico); E/A, rapporto fra velocità di riempimento precoci (*early*) e tardive (*atrial*) del ventricolo sinistro; E/E', rapporto fra velocità transmitrale nella fase precoce di riempimento e velocità del piano valvolare mitralico nella stessa fase; FE, frazione di eiezione; GLS, *global longitudinal strain* (strain longitudinale globale); LVMi, *left ventricular mass index* (massa ventricolare sinistra indicizzata); PAPs, pressione arteriosa polmonare sistolica; VS, ventricolo sinistro.

colare sinistra, senza ostruzione del tratto di efflusso né *pattern* riconoscibili di distribuzione dell'ipertrofia. Sei pazienti rispondevano ai criteri ecocardiografici per rimodellamento concentrico (LVMI inferiori ai *cut-off* per sesso, con spessore relativo di parete $>0,42$); un paziente presentava un'ipertrofia settale isolata. Questi dati confermavano la prevalenza del fenotipo ipertrofico fra i pazienti con cardiomiopatia mitocondriale. Nel 32% dei pazienti era presente una disfunzione diastolica di grado I (alterato rilasciamento).

Il *global longitudinal strain* (GLS), un indice di cinesi ventricolare, era mediamente ridotto rispetto ai valori di riferimento. Questi dati potrebbero esprimere una precoce compromissione della funzione contrattile del ventricolo sinistro, ma sono anche compatibili con un rimodellamento in senso ipertrofico del ventricolo sinistro, come documentato in letteratura relativamente a varie forme di ipertrofia ventricolare^{[182][183]}.

Nessun paziente presentava una valvulopatia emodinamicamente significativa né ipertensione polmonare, consentendo di escludere queste anomalie come possibili cause di dispnea.

La RM cardiaca con m.d.c. era indicata come esame opzionale nell'algoritmo di Bates *et al.* Nella nostra popolazione, 18 pazienti l'hanno eseguita (72%); gli altri pazienti presentavano controindicazioni (claustrofobia o dispositivi metallici impiantati). I principali risultati sono riportati nella *Tabella 4.6*.

La RM ha confermato i reperti ecocardiografici di sostanziale normalità per quanto riguarda volumi e funzione, massa indicizzata e spessori di parete del ventricolo sinistro. Non sono state riscontrate alterazioni morfologiche o funzionali a carico del ventricolo destro, tranne un paziente con un'area di acinesia della parete libera del ventricolo destro; questo paziente presentava anche una zona del setto distale il cui aspetto era suggestivo di sostituzione fibro-adiposa (*Figura 4.1*).

L'analisi *cardiac tagging* ha mostrato una riduzione dello *strain* sistolico longitudinale miocardico; così come la riduzione del GLS all'ecocardiogramma, questo dato dimostra una riduzione subclinica della cinesi ventricolare ed è compatibile con un rimodellamento in senso ipertrofico^[96].

Dopo somministrazione di m.d.c. sono state riscontrate aree di *late gadolinium enhancement* (LGE; indice di fibrosi miocardica) in 8 pazienti su 18 (44%). Queste aree erano lineari, singole o multiple, poste in sede subendocardica e localizzate più frequentemente a livello del setto interventricolare e della giunzione antero-settale (*Figura 4.1*). Queste sono regioni particolarmente propense alla sostituzione fibrosa per le elevate tensioni meccaniche e l'abbondante vascolarizzazione^[114].

Ad integrazione dell'esame RM tradizionale è stata eseguita l'analisi *T1-mapping* del miocardio (*Figura 4.2*), che ha mostrato un tendenziale incremento del volume extracellu-

Parametro	Valori di riferimento	Pazienti (n=18)
Volume telediastolico VS (mL)	142±21 156±21 M, 128±21 F	123,0 (98,3-140,3) 154 (139-176) M, 110 (88-134) F
Volume telediastolico VS indicizzato (mL/m ²)	78±9 80±9 M, 75±9 F	72 (58-79) 90 (78-97) M, 67 (53-75) F
Volume telesistolico VS (mL)	47±10 53±11 M, 42±10 F	38,0 (28,8-46,3) 52 (44-56) M, 36 (22-40) F
Volume telesistolico VS indicizzato (mL/m ²)	26±5 27±6 M, 24±5 F	22 (17-25) 30 (23-38) M, 20 (12-24) F
Gittata sistolica (ml)	95±14 104±14 M, 86±14 F	82 (64-100) 100 (94-103) M, 72 (60-94) F
FE VS (%)	67±5	67 (64-74)
Cinetica regionale VS normale	-	18/18 (100%)
Strain sistolico longitudinale miocardico (%)	-19,2±3,6	-17,4 (-18,1;-16,2)
Volume telediastolico VD (mL)	144±23 163±25 M, 126±21 F	126 (90-153) 168 (136-187) M, 112 (88-134) F
Volume telediastolico VD indicizzato (mL/m ²)	78±11 83±12 M, 73±9 F	73 (61-82) 90 (78-97) M, 68 (57-79) F
Volume telesistolico VD (mL)	50±14 57±15 M, 43±13 F	41 (25-57) 63 (49-78) M, 34 (24-53) F
Volume telesistolico VD indicizzato (mL/m ²)	27±7 29±7 M, 25±7 F	26 (18-32) 35 (28-37) M, 22 (16-30) F
FE VD (%)	66±6	64 (61-68)
Cinetica regionale VD normale	-	18/18 (100%)
Spessore setto IV (mm)	<=11	10 (9-11)
Spessore parete infero-laterale (mm)	<=10	9 (8-10)
LVMI (g/m ²)	69±8 74±9 M, 63±8 F	66 (54-79) 86 (62-96) M, 63 (53-72) F
Ipertrofia	-	2/18 (11%)
LGE	-	8/18 (44%)
ECV cuore (%)	24±4 M, 28±4 F	29 (28-30)
ECV muscolo (%)	18±4 M, 14±3 F	20 (16-21)

Tabella 4.6: Risultati della RM cardiaca

Sono indicati i valori di riferimento relativi alla popolazione generale, al sesso maschile e al sesso femminile.

Per i valori di riferimento si rimanda a pubblicazioni dedicate^{[184][185][186]}.

Abbreviazioni: FE, frazione di eiezione; GLS, *global longitudinal strain* (strain longitudinale globale); IV, interventricolare; LVMI, *left ventricular mass index* (massa ventricolare sinistra indicizzata); VD, ventricolo destro; VS, ventricolo sinistro.

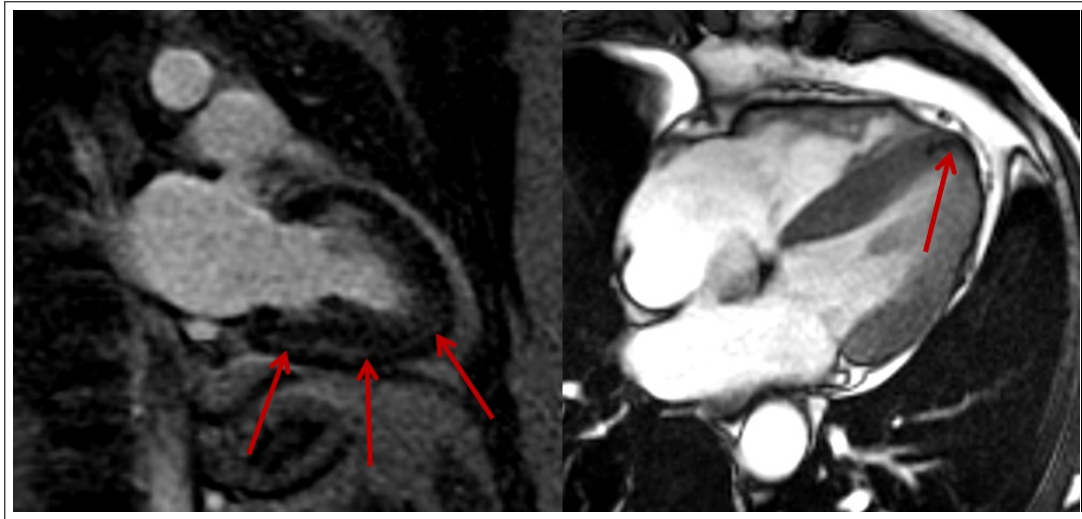


Figura 4.1: **Fibrosi e sostituzione fibroadiposa**

Sinistra: area lineare di LGE localizzata nella giunzione infero-settale, indicativa di fibrosi subendocardica.

Destra: *indian ink*, reperto indicativo di sostituzione fibroadiposa.

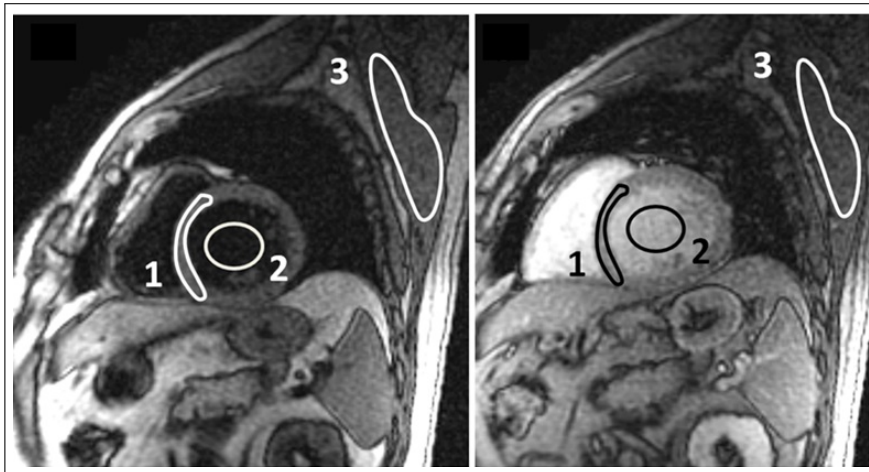


Figura 4.2: **Analisi *T1-mapping***

Il segnale T1 viene valutato a livello dei singoli pixel, prima (*sinistra*) e dopo (*destra*) la distribuzione del m.d.c. Le regioni di interesse sono localizzate nel miocardio (escludendo le giunzioni e le aree di fibrosi macroscopica) (1), nel sangue intraventricolare (2), nel muscolo scheletrico (3). Per i risultati dell'analisi *T1-mapping* a livello muscolare si veda il seguito di questo paragrafo. *Adattata da: Barison et al., 2015.*^[186]

lare (ECV) miocardico nei pazienti: 29% (28-30%) (valori di riferimento precedentemente stabiliti presso l'FTGM: $24 \pm 4\%$ maschi, $28 \pm 4\%$ femmine)^[186]. Non è stata riscontrata un'associazione fra il valore di ECV e la presenza di LGE ($P=0,606$).

La malattia mitocondriale si associa frequentemente a coinvolgimento del muscolo scheletrico, come verificato anche nei nostri pazienti, nel corso della precedente caratterizzazione neurologica. Durante la RM è stata eseguita un'acquisizione a livello del muscolo scheletrico (grande pettorale o grande dorsale) per effettuare l'analisi *T1-mapping* anche a questo livello. L'ECV nel muscolo è risultato pari a 20% (16-21%), quindi mediamente aumentato rispetto ai valori di riferimento precedentemente stabiliti presso la FTGM

($14 \pm 3\%$ maschi, $18 \pm 4\%$ femmine)^[186].

La correlazione fra i valori di ECV nel miocardico e muscolare non raggiungeva la significatività statistica ($P=0,108$). Per quanto riguarda la distribuzione dei valori di ECV miocardico e muscolare rispetto ai *cut-off* (diversi nei due sessi), si rimanda alla Figura 4.3.

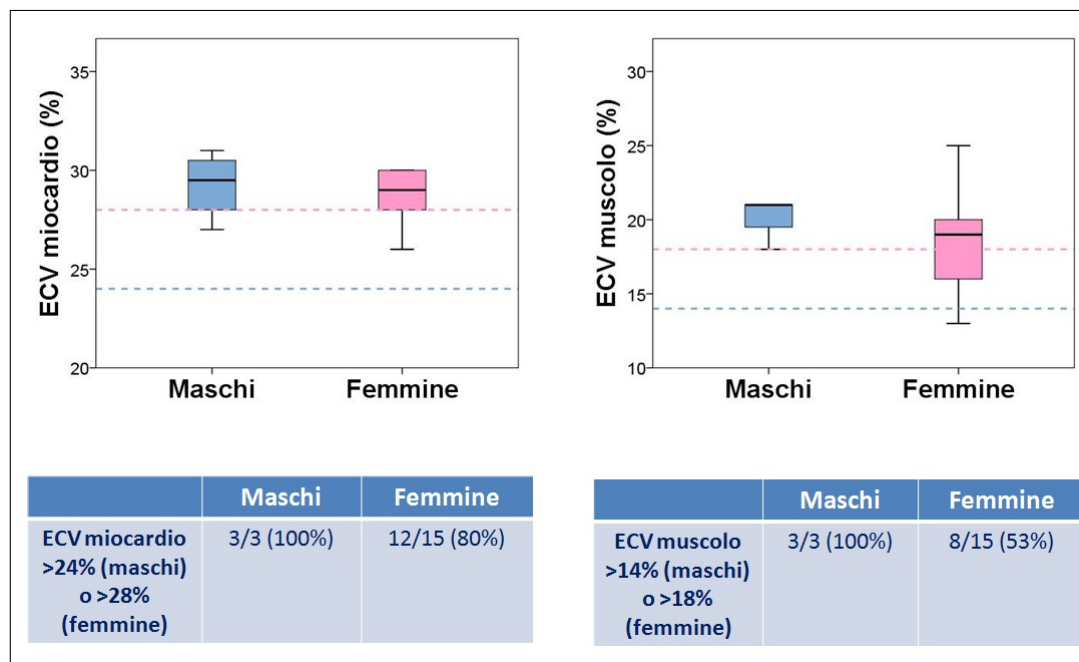


Figura 4.3: **Espansione del volume extracellulare nel miocardio e nel muscolo**

Si confrontano il volume extracellulare (ECV) nel miocardio e nel muscolo nei pazienti, suddivisi per sesso (azzurro: maschi; rosa: femmine). Si indicano i *cut-off* relativi ad ECV miocardico e muscolare, diversi nei due sessi.

Per caratterizzare ulteriormente la composizione del muscolo scheletrico, in 8 pazienti e 3 controlli è stata effettuata la spettroscopia RM con ^1H del muscolo scheletrico (braccio destro), per ricavare il valore del rapporto tessuto adiposo/acqua. (Figura 4.4).

4.3 Test ergometrico cardiopolmonare

Hanno eseguito il test ergometrico cardiopolmonare 20 pazienti e 10 controlli. I principali risultati sono riportati nella *Tabella 4.7* e nella *Figura 4.5*.

Nel complesso, i pazienti presentavano una più precoce interruzione dello sforzo, una riduzione della capacità di consumo di ossigeno (come dimostrato dai parametri VO_2/kg al picco, $\text{VO}_2/\text{work rate slope}$, polso di O_2 al picco) ed una soglia anaerobica precoce; queste alterazioni erano in pieno accordo col fatto che la disfunzione mitocondriale compromette il metabolismo aerobico. Nei pazienti si riscontrava inoltre una minore efficienza ventilatoria, dimostrata da una *slope* VE/VCO_2 significativamente superiore nei pazienti

Parametro	Controlli	Pazienti	P
W max (W)	147,5 (123,8-204,3)	86,5 (65,3-107,3)	<0,001
VO ₂ /kg max (mL/kg/min)	26,4 (23,7-30,4)	18,5 (12,5-20,1)	<0,001
VO ₂ /work rate slope	10,7 (9,7-11,2)	9,5 (8,7-10,6)	0,074
AT a % di VO ₂ max predetto	66 (48-72)	42 (26-52%)	0,011
VE/VCO ₂ slope	26,9 (21,2-32,7)	30,1 (28,0-38,1)	0,024
QR	1,17 (1,10-1,21)	1,11 (1,09-1,25)	0,061
Polso di O ₂ al picco (mL/battito)	10,9 (9,0-13,7)	6,9 (5,5-8,7)	0,001
FC basale(b.p.m.)	82 (81-86)	82 (74-100)	0,948
FC max (b.p.m.)	177 (159-178)	140 (125-156)	0,141
% di FC max predetta (%)	80 (77-87)	92 (88-102)	<0,001
Δ FC max-basale (b.p.m.)	84 (76-98)	52 (36-68)	<0,001
PAS basale(b.p.m.)	120 (114-123)	130 (113-140)	0,169
PAS picco (mmHg)	188 (170-213)	190 (170-200)	0,619
PAD basale (mmHg)	75 (68-80)	80 (70-80)	0,812
PAD picco (mmHg)	87 (78-96)	88 (80-90)	1,000
DP basale (mmHg)	10149 (9113-11163)	9428 (8544-13264)	0,945
DP picco (mmHg)	30150 (24500-34525)	25180 (21228-29780)	0,067
Borg dispnea	7 (5-7)	7 (6-8)	0,231
Borg fatica	8 (7-8)	8 (7-9)	0,067
VE/MVV	0,53 (0,49-0,66)	0,38 (0,32-0,44)	0,001

Tabella 4.7: Differenze fra controlli e pazienti nei principali indicatori di performance al test cardiopolmonare

Abbreviazioni: AT, *anaerobic threshold* (soglia anaerobica); DP, doppio prodotto; FC, frequenza cardiaca; Δ PAD, differenza fra la pressione arteriosa diastolica al picco e quella basale; Δ PAS, differenza fra la pressione arteriosa sistolica al picco e quella basale; MVV, massima ventilazione volontaria; QR, quoziente respiratorio; VCO₂, produzione di anidride carbonica; VE, ventilazione; VO₂, consumo di ossigeno; W, *work* (lavoro).

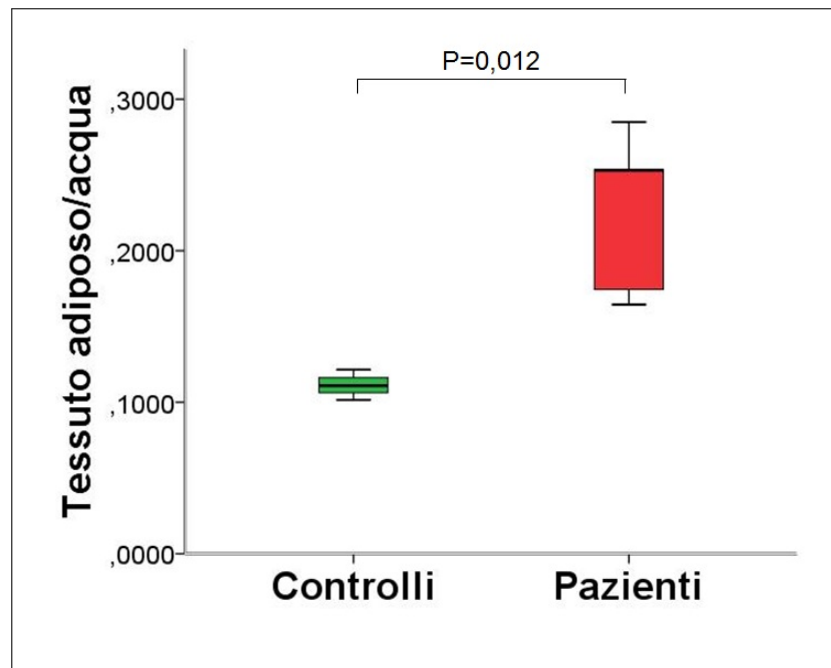


Figura 4.4: **Composizione del muscolo scheletrico analizzata mediante spettroscopia**

Il rapporto tessuto adiposo-acqua è significativamente maggiore nei pazienti che nei controlli, indicando che i pazienti presentano un sovertimento strutturale nel muscolo.

($P=0,024$). Il quoziente respiratorio è risultato sovrapponibile nei due gruppi, denotando prove massimali dal punto di vista metabolico: controlli 1,17 (1,10-1,21), pazienti 1,10 (0,96-1,20) ($P=0,061$). I punteggi di Borg relativi a dispnea e fatica muscolare non erano significativamente diversi nei pazienti e nei controlli, come prevedibile dato che l'interruzione del test cardiopolmonare dipendeva dalla sintomatologia. Infine, il parametro VE/MVV è risultato $<0,80$ in tutti i pazienti, indicando che la limitazione della capacità di esercizio non era legata ad una debolezza della muscolatura respiratoria^[190].

Per quanto concerne la risposta emodinamica nei pazienti, si segnala in particolare la riduzione statisticamente significativa di tre parametri: FC massima raggiunta, percentuale di FC massima teorica, differenza fra FC massima e FC basale. Questi dati potevano essere attribuiti semplicemente ad una più precoce interruzione dello sforzo, rendendo necessario l'utilizzo della formula di Lauer per verificare la presenza di incompetenza cronotropa (si veda il paragrafo 4.6).

4.4 Valutazione respiratoria

Dato che la dispnea da sforzo era un elemento ricorrente in anamnesi, i pazienti sono stati sottoposti ad alcune indagini della funzione respiratoria. I risultati principali sono riportati nella *Tabella 4.8*

Nelle malattie neuromuscolari si può instaurare un quadro di pneumopatia restritti-

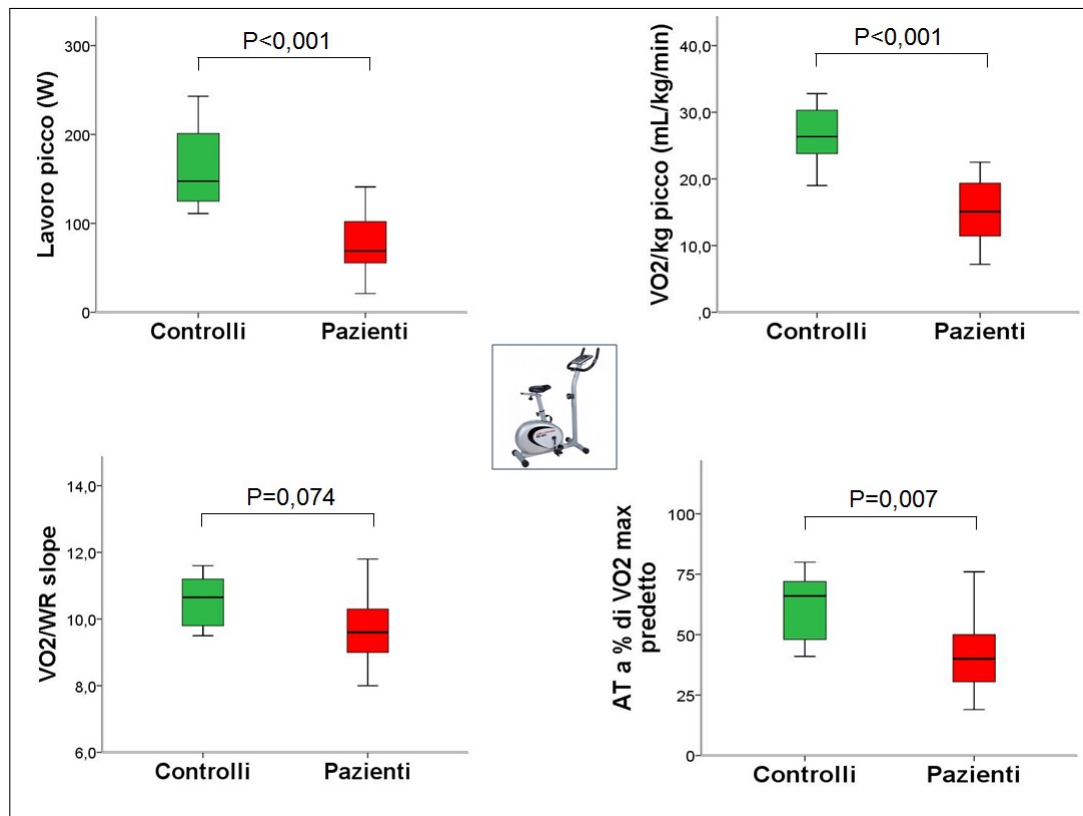


Figura 4.5: Ridotta performance al test cardiopolmonare e compromissione del metabolismo ossidativo

Rispetto ai controlli, i pazienti interrompevano più precocemente il test cardiopolmonare, come dimostrato dalla riduzione significativa dei parametri lavoro al picco e VO_2/kg al picco (consumo di ossigeno/kg/picco). La riduzione del secondo parametro rifletteva probabilmente anche una compromissione del metabolismo ossidativo, così come il trend verso una riduzione della slope VO_2/WR (*work rate*, carico di lavoro), e la riduzione statisticamente significativa della soglia anaerobica rispetto al consumo di ossigeno massimo predetto.

Parametro	Pazienti (n=21)
CPT (% del predetto)	91 (85-100)
IT	99,5% (94,8-103,6%)
D/VasbHb (% del predetto)	100 (88-111)
MIP	43 cmH ₂ O (32-77 cmH ₂ O)
MIP < 70 cmH ₂ O	14/21 (67%)
MEP	50 cmH ₂ O (27-58 cmH ₂ O)
MEP < 60 cmH ₂ O	15/21 (71%)

Tabella 4.8: Analisi della funzione respiratoria

Abbreviazioni: CPT, capacità polmonare totale; D/VasbHb, capacità di diffusione del monossido di carbonio corretta per il valore di emoglobina e normalizzata sul volume alveolare; IT, indice di Tiffenau (rapporto fra volume espiratorio forzato nel primo secondo e capacità vitale); MEP, massima pressione espiratoria; MIP, massima pressione inspiratoria.

Parametro	Pazienti (n=24)
Apnee/ipopnee 24 h	100 (56-193)
Apnee centrali 24 h	0 (0-4)
Apnee ostruttive 24 h	6 (0-76)
Apnee miste 24 h	0 (0-0)
Ipopnee 24 h	58 (38-104)
Ipopnee giorno	15 (0-43)
Ipopnee notte	40 (17-63)
AHI globale	4,0 (1,3-8,5)
AHI giorno	1,0 (0,0-3,8)
AHI notte	7,5 (4,0-15,0)
SaO ₂ media	95% (94-97%)
SaO ₂ minima	84% (76-88%)
Durata SaO ₂ <90%	8 min (3-16 min)

Tabella 4.9: Monitoraggio cardiorespiratorio nelle 24 ore

Abbreviazioni: AHI, *apnea-hypopnea index* (indice apnea-ipopnea); SaO₂, saturazione in ossigeno dell'emoglobina.

va per la debolezza della muscolatura respiratoria. Quando la CPT è compresa fra 70 e 100% del predetto si ha una condizione di pneumopatia restrittiva lieve^[187]; 13/21 pazienti (62%) rientravano in questa categoria. Solo 2 pazienti presentavano una CPT <70% del predetto. Tuttavia, una grave compromissione della muscolatura respiratoria era dimostrata da una marcata riduzione della MIP e da una riduzione ancora più marcata della MEP, in relazione ai *cut-off* rispettivi (70 e 60 cmH₂O)^[187]. Questi risultati suggerivano la potenziale utilità della misurazione di MIP e MEP in sede di *screening* e di *follow-up* dei pazienti con malattia mitocondriale.

Nessun paziente presentava una pneumopatia ostruttiva né alterazioni significative della capacità di diffusione alveolo-capillare.

Il monitoraggio cardio-respiratorio a lungo termine ha consentito di valutare il *pattern* respiratorio di questi pazienti. I risultati principali sono riassunti nella *Tabella 4.9*.

Le ipopnee sono risultate relativamente frequenti, soprattutto durante le ore notturne. Questi eventi erano particolarmente lunghi e associati a desaturazioni spesso marcate (*Figura 4.5*) e potevano essere attribuiti al deficit della muscolatura respiratoria, dimostrato dalla riduzione di MIP e MEP.

La classificazione tradizionale delle apnee prevede apnee centrali, apnee ostruttive e apnee miste. Non è mai stata proposta una suddivisione delle apnee ostruttive a seconda della patogenesi: collasso della muscolatura orofaringea (apnee ostruttive "classiche", riscontrabili nella sindrome delle apnee ostruttive del sonno) oppure debolezza della mu-

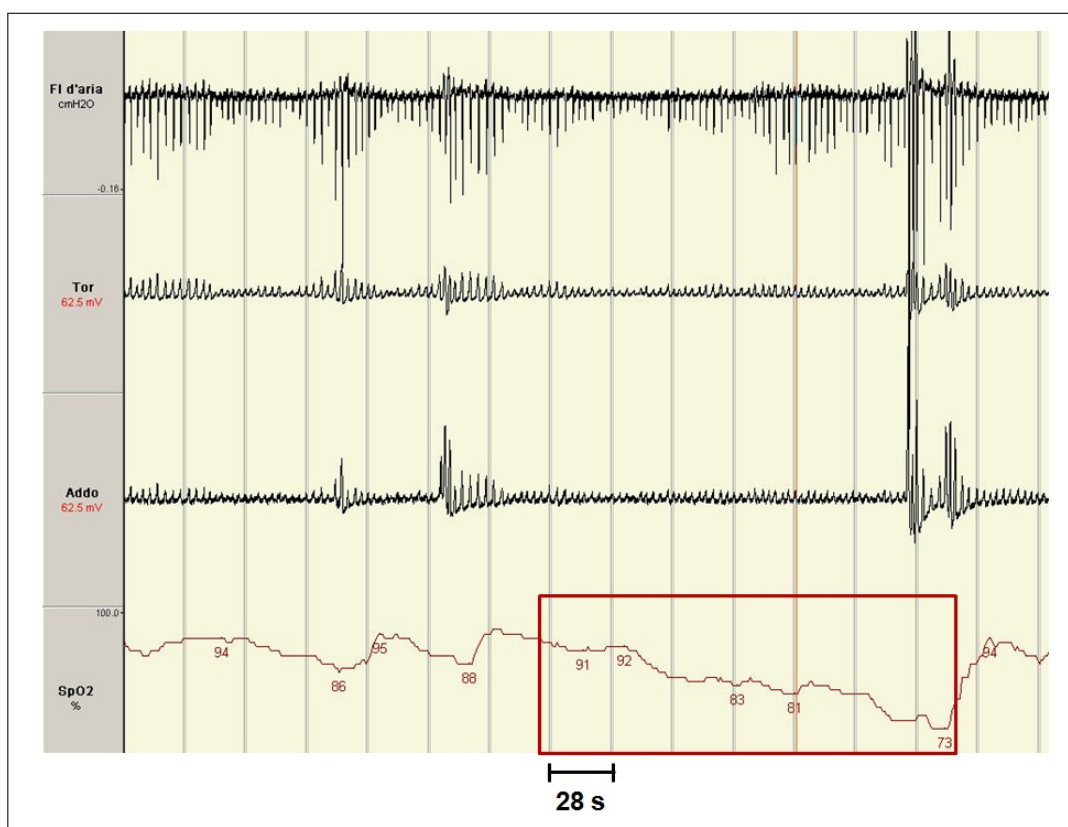


Figura 4.6: Ipopnea ascrivibile a debolezza muscolare

L'ipopnea qui rappresentata ha una durata di circa 3 min. La saturazione in ossigeno dell'emoglobina diminuisce progressivamente dal valore basale di circa 95% fino al 73%.

scolatura respiratoria. Il secondo tipo di apnea era più probabile nei nostri pazienti, che avevano un BMI ridotto e presentavano una compromissione della muscolatura respiratoria.

Per cercare di distinguere i due tipi di apnee ostruttive, abbiamo scelto un criterio temporale (*cut-off* di 30 s). È noto infatti che le apnee ostruttive "classiche" hanno una durata breve (in media 10s)^[170], mentre le apnee da debolezza muscolare hanno verosimilmente una durata più lunga, analogamente alle ipopnee. Non possiamo tuttavia escludere che apnee ostruttive brevi, da collasso delle vie aeree, possano essere determinate anch'esse da una debolezza della muscolatura orofaringea. Utilizzando comunque il nostro *cut-off*, abbiamo calcolato che le apnee da debolezza costituivano in media il 37% delle apnee ostruttive.

4.5 Riflessi cardiorespiratori

I risultati della valutazione dei *feedback* cardiorespiratori sono riassunti nella *Tabella 4.10*.

Nei nostri pazienti la sensibilità chemocettiva all'ipercapnia ed all'ipossia era simile a quella dei controlli. Si poteva quindi escludere che un'iperattività del chemoriflesso contribuisse alla dispnea da sforzo in questi pazienti.

Il chemoriflesso controlla la ventilazione e la funzione cardiovascolare, mentre il baroriflesso esercita unicamente effetti emodinamici. La sensibilità barocettiva è risultata significativamente inferiore nei pazienti rispetto ai controlli. La causa della depressione del baroriflesso non era immediatamente comprensibile in questa popolazione di pazienti; tuttavia, questa depressione costituiva un determinante di disautonomia con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico (si veda il paragrafo 4.6).

In questo studio abbiamo documentato per la prima volta che l'ergoriflesso risulta decisamente iperattivo in pazienti con malattia mitocondriale (*Figura 4.7*). Abbiamo valutato la componente dell'ergoriflesso definita metaboriflesso e l'abbiamo indagata in termini di risposta ventilatoria all'occlusione vascolare post-esercizio.

L'iperattività dell'ergoriflesso è riconducibile alla compromissione del muscolo scheletrico. Abbiamo riscontrato che all'aumentare del rapporto tessuto adiposo/acqua (indice di sostituzione fibro-adiposa nel muscolo) tendeva ad aumentare anche la sensibilità ergocettiva (*Figura 4.8*). Nonostante la piccola numerosità campionaria (8 pazienti e 3 controlli), la correlazione fra rapporto tessuto adiposo/acqua e sensibilità ergocettiva raggiungeva la significatività statistica (*Figura 4.9*).

L'aumento della sensibilità ergocettiva è un possibile determinante di dispnea da sforzo e affaticamento muscolare. Considerando insieme controlli e pazienti, all'aumentare

Parametro	Controlli	Pazienti	P
HVR	-0,14 (-0,07/-0,64) (n=10)	-0,33 (-0,10/-0,58) (n=19)	0,801
HCVR	0,73 (0,20-1,33) (n=10)	0,83 (0,34-1,35) (n=19)	0,947
DS RR/DS PAS (ms/mmHg)	10,4 (6,9-12,6) (n=13)	6,3 (4,0-8,2) (n=24)	0,006
Risposta ventilatoria al clamp (%)	37 (26-41) (n=12)	64 (53-82) (n=18)	<0,001

Tabella 4.10: Riflessi cardio-respiratori

Abbreviazioni: DS RR/DS PAS, *slope* fra deviazione standard degli intervalli RR e deviazione standard della pressione arteriosa sistolica; HCVR, *hypercapnic ventilatory response*; HVR, *hypoxic ventilatory response*.

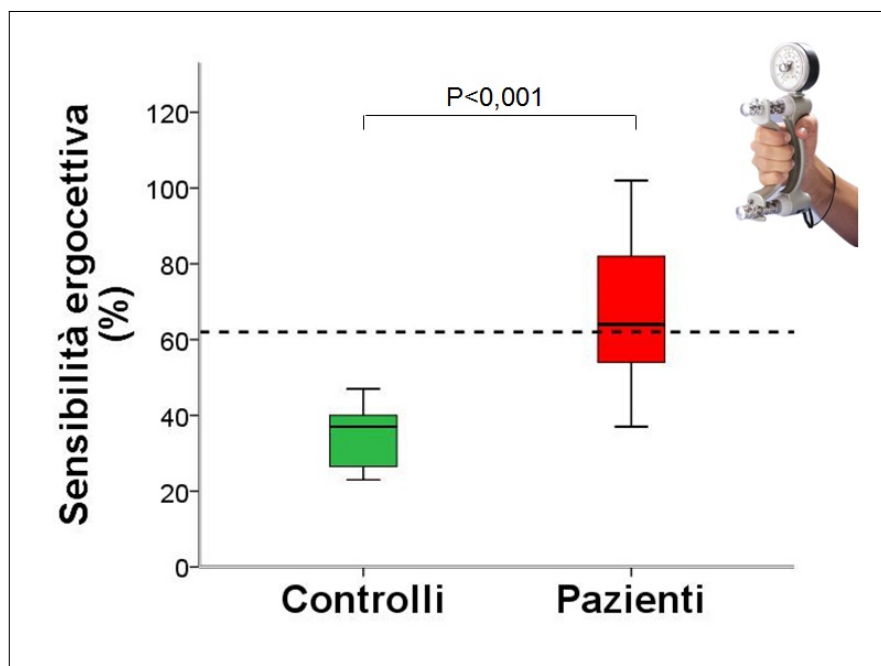


Figura 4.7: Iperattività dell'ergoriflesso in pazienti con malattia mitocondriale

La mediana nei controlli era 37% (27-40%), nei pazienti era 64% (53-82%). Dodici su diciotto pazienti (67%) presentavano una sensibilità ergocettiva >62%. Questo *cut-off* è stato definito da Piepoli *et al.* nel primo studio che ha dimostrato un aumento della sensibilità ergocettiva in pazienti con scompenso cardiaco.

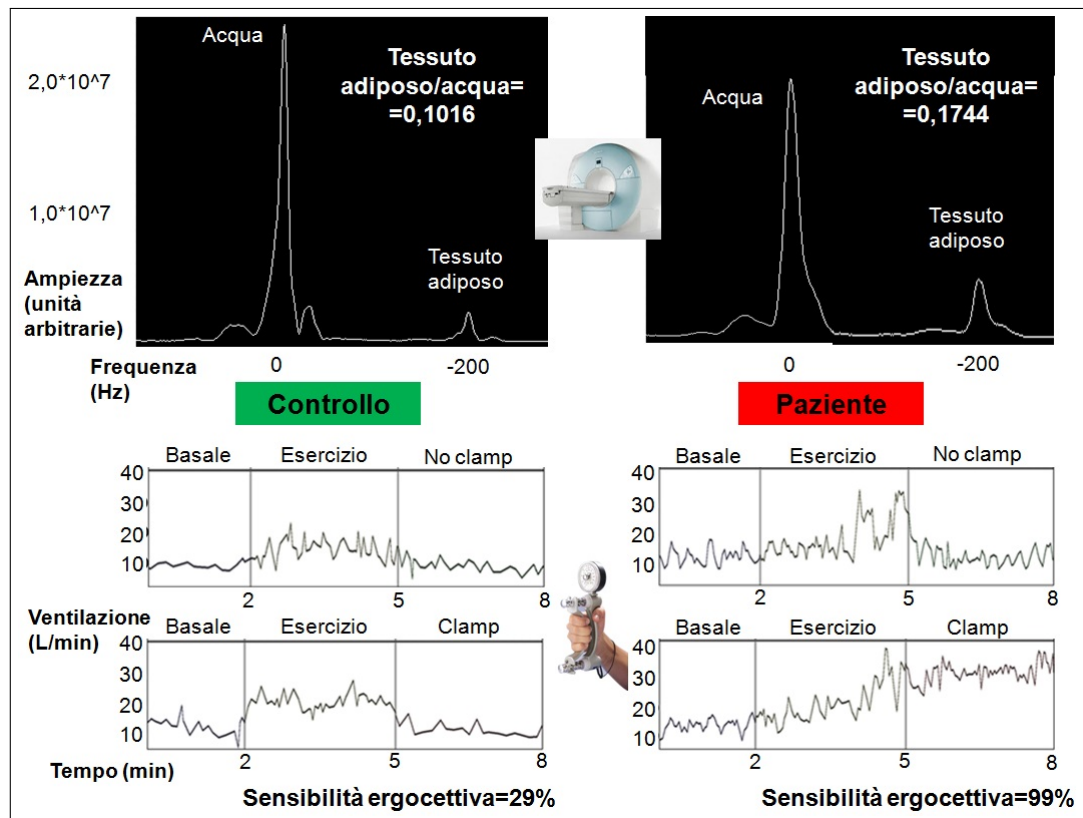


Figura 4.8: Sovvertimento strutturale del muscolo scheletrico e sensibilità ergocettiva

Il paziente presenta un maggiore rapporto tessuto adiposo-acqua, quindi un più marcato sovertimento strutturale nel muscolo scheletrico, rispetto al controllo; parallelamente, la sensibilità ergocettiva è marcatamente maggiore nel paziente che nel controllo.

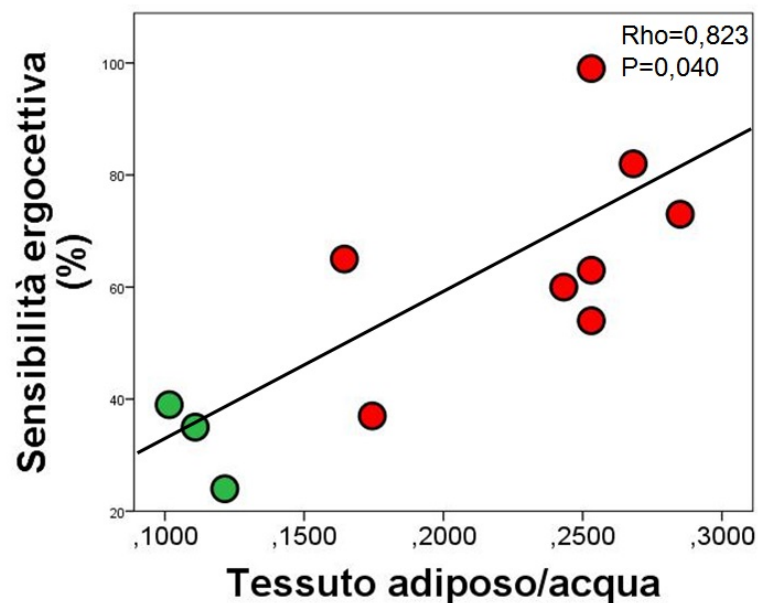


Figura 4.9: Correlazione fra composizione del muscolo scheletrico e sensibilità ergocettiva

All'aumentare della sostituzione fibroadiposa nel muscolo aumenta la sensibilità ergocettiva.

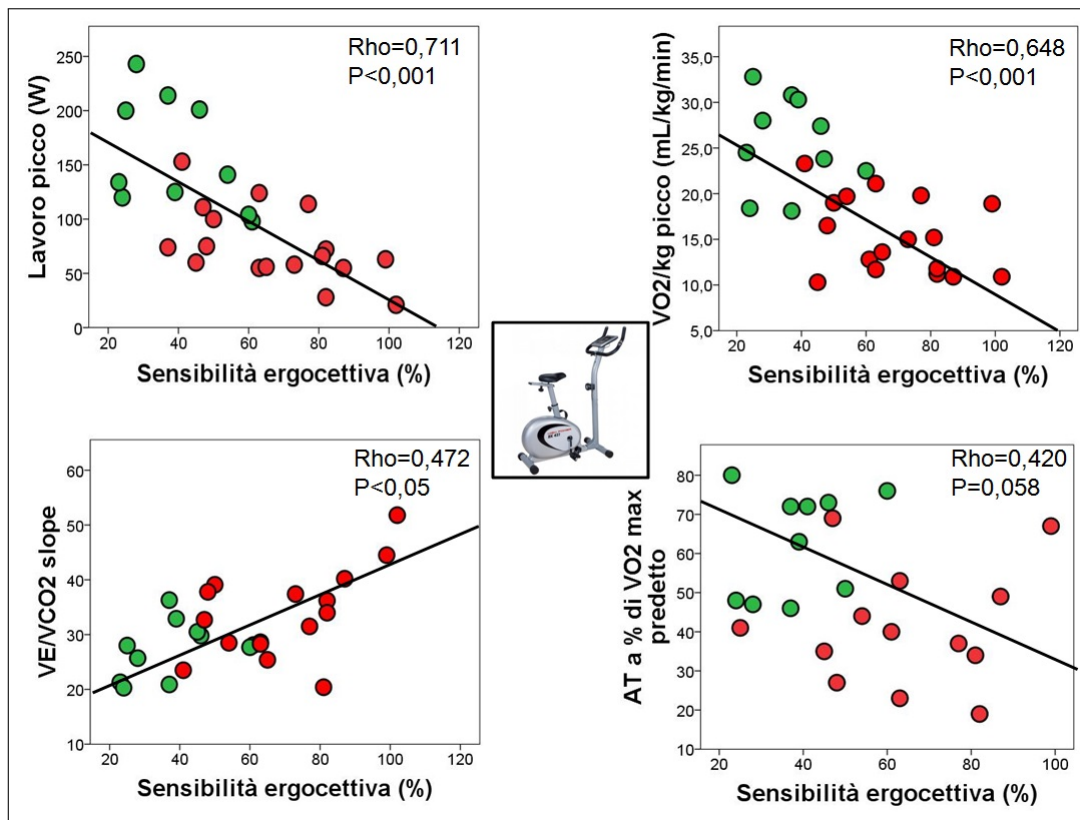


Figura 4.10: Sensibilità ergocettiva e performance al test cardiopolmonare

Con l'aumento della sensibilità ergocettiva si riducono la tolleranza allo sforzo, espressa dai parametri lavoro al picco e consumo di ossigeno (VO₂)/kg al picco; l'efficienza ventilatoria diminuisce, come indicato da un rapporto ventilazione/produzione di anidride carbonica (VE/VCO₂) progressivamente maggiore. Infine, la soglia anaerobica rispetto al VO₂ massimo predetto tende a ridursi, indicando una compromissione ingravescente del metabolismo ossidativo muscolare.

della sensibilità ergocettiva si riducevano progressivamente VO₂/kg max e W max, cioè la tolleranza allo sforzo si riduceva. Contestualmente diminuiva l'efficienza ventilatoria, espressa dal parametro VE/VCO₂ slope. La soglia anaerobica diventava più precoce, anche se la correlazione non raggiungeva la significatività statistica (Figura 4.10).

In tutti i casi (pazienti e controlli), il test cardiopolmonare è stato limitato dalla sintomatologia (dispnea e/o fatica muscolare). È interessante notare che i punteggi Borg relativi alla dispnea erano simili nei controlli e nei pazienti con normale sensibilità ergocettiva, mentre erano significativamente maggiori nei pazienti con sensibilità ergocettiva aumentata (Figura 4.11), parallelamente ad una più precoce interruzione dello sforzo. Questo dato supportava il ruolo dell'ergoriflesso nel determinismo della dispnea da sforzo.

Abbiamo inoltre riscontrato un aumento significativo dei punteggi Borg relativi alla fatica muscolare confrontando controlli, pazienti con ergoriflesso normale e pazienti con ergoriflesso attivato; la differenza fra pazienti con sensibilità ergocettiva normale e aumentata non raggiungeva la significatività statistica (Figura 4.11). Questi risultati suggerivano che l'ergoriflesso contribuisca alla sensazione di fatica muscolare, anche se forse in misura

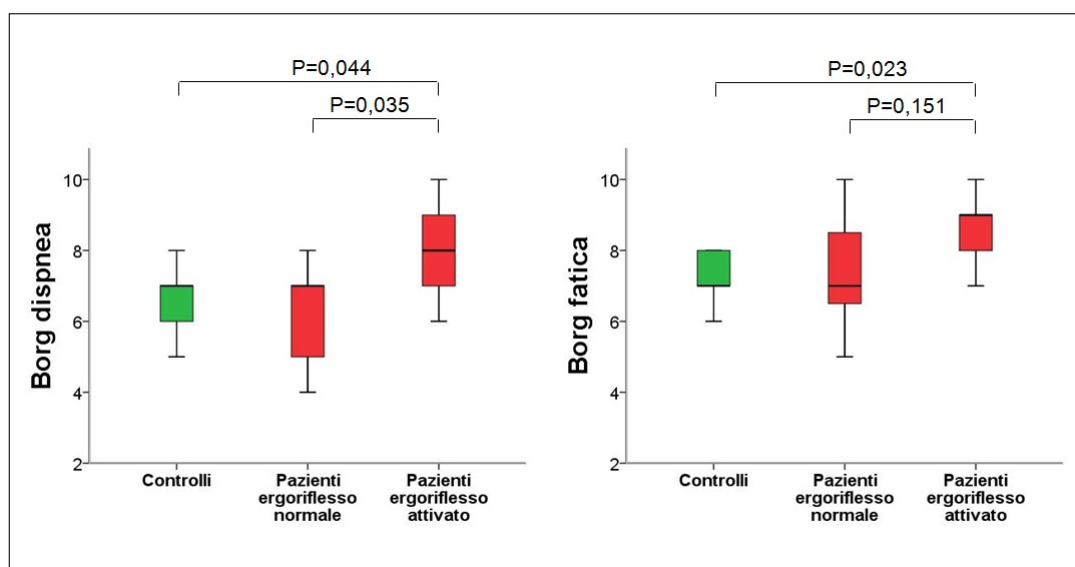


Figura 4.11: Ergoriflessio e punteggi relativi a dispnea e fatica muscolare

Si riportano i risultati di due analisi dei sottogruppi (controlli *vs.* pazienti con ergoriflessio normale *vs.* pazienti con ergoriflessio attivato; pazienti con ergoriflessio normale *vs.* pazienti con ergoriflessio attivato). Nella prima analisi, si riscontra un'associazione significativa con i punteggi Borg relativi a dispnea e fatica muscolare. Nella seconda analisi, risultano significativamente maggiori solo i punteggi Borg relativi alla dispnea.

minore rispetto alla dispnea da sforzo.

4.6 Funzione autonoma

Dei 20 pazienti che hanno eseguito il test cardiopolmonare, 17 (85%) presentavano incompetenza cronotropa, dimostrata da un *chronotropic response index* (CRI; si veda il paragrafo 3.7) inferiore al *cut-off* di 0,80; per confronto, solo due controlli (20%) presentavano un CRI <0,80 (Figura 4.12).

I principali risultati dell'ECG Holter sono riportati nella Tabella 4.11.

La frequenza cardiaca (FC) media era leggermente maggiore nei pazienti rispetto ai controlli, anche se la differenza non raggiungeva la significatività statistica. C'era un *trend* verso una FC maggiore nei controlli; la FC minima era significativamente minore nei controlli. Già questi dati suggerivano una maggiore variabilità della FC (*heart rate variability*, HRV) nei controlli rispetto ai pazienti, anche se l'HRV può essere valutata con precisione solo effettuando un'analisi del segnale nel dominio del tempo e nel dominio delle frequenze.

Rispetto ai controlli, i pazienti presentavano un'incidenza significativamente maggiore delle extrasistoli sopraventricolari (ESV); la differenza nell'incidenza di extrasistoli ventricolari (EV) non raggiungeva la significatività statistica, anche se alcuni pazienti presentavano un'extrasistolia ventricolare ad incidenza moderato-elevata (216, 564 e 961 EV). Non sono stati riscontrati episodi di tachicardia sopraventricolare o ventricolare. Non

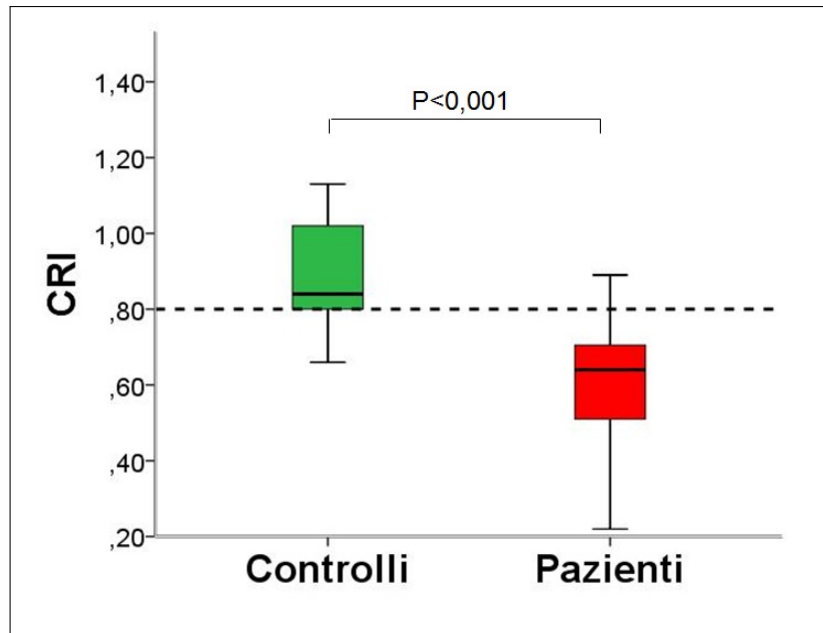


Figura 4.12: Incompetenza cronotropa nei pazienti con malattia mitocondriale

Il *chronotropic response index* (CRI) è significativamente inferiore nei pazienti rispetto ai controlli; in quasi tutti i controlli il CRI è superiore a 0,80, *cut-off* oltre il quale non c'è incompetenza cronotropa, mentre la quasi totalità dei pazienti presenta un CRI inferiore a 0,80.

Parametro	Controlli (n=11)	Pazienti (n=24)	P
FC media	74 b.p.m. (70-76 b.p.m.)	77 b.p.m. (70-86 b.p.m.)	0,141
FC minima	45 b.p.m. (40-48 b.p.m.)	48 b.p.m. (44-56 b.p.m.)	0,043
FC massima	134 b.p.m. (123-153 b.p.m.)	132 b.p.m. (114-139 b.p.m.)	0,987
ESV	1 (0-2)	5 (2-21)	0,001
EV	0 (0-2)	1 (0-16)	0,102
RR 24 h	812 ms (788-842 ms)	779 ms (698-858 ms)	0,309
pNN50 24 h	15,68 % (4,77-21,91%)	4,27% (1,54-8,95%)	0,072
SD 24 h	146 ms (131-172)	106 ms (80-143 ms)	0,032
SDANN 24 h	135 ms (110-158 ms)	97 ms (62-130 ms)	0,029
rMSSD 24 h	32 ms (25-50 ms)	29 ms (22-38 ms)	0,328
LF/HF ratio 24 h	4,02 (2,61-5,05)	2,52 (1,90-4,17)	0,102
LF power 24 h	1116 ms² (791-1635 ms²)	499 ms² (322-1124 ms²)	0,032
HF power 24 h	318 ms ² (141-552 ms ²)	181 ms ² (92-416 ms ²)	0,222

Tabella 4.11: ECG Holter

Abbreviazioni: ESV, extrasistoli sopraventricolari; EV, extrasistoli ventricolari; FC, frequenza cardiaca; HF, *high frequency* (alta frequenza); LF, *low frequency* (bassa frequenza); rMSSD, media delle radici quadrate delle differenze fra successive intervalli RR; SD, deviazione standard degli intervalli fra battiti sinusali consecutivi (intervalli RR); SDANN, deviazione standard dei valori medi fra battiti sinusali consecutivi in tutti i periodi di 5 min della registrazione.

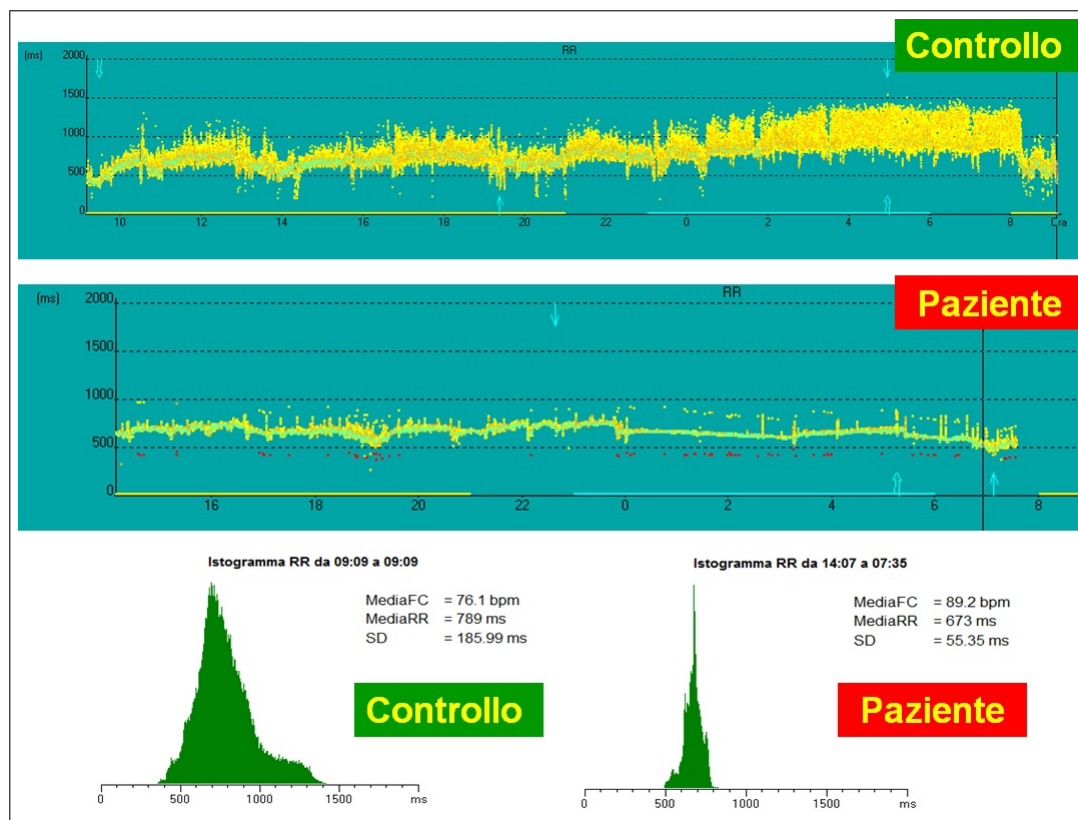


Figura 4.13: Riduzione dell'*heart rate variability* in un paziente

Nel grafico in alto si riporta la durata dell'intervallo RR in funzione del tempo; maggiore è lo spessore verticale della traccia gialla, maggiori sono le oscillazioni dell'intervallo RR in un dato momento, quindi maggiore è l'HRV.

In basso viene mostrata la distribuzione degli intervalli RR a seconda della loro durata.

Il parametro SD esprime la deviazione standard degli intervalli RR, quindi è un indice di HRV.

Un valore di SD <70 ms, indice di marcata riduzione dell'HRV, era presente in 5 pazienti (20%).

erano presenti neanche bradiaritmie né pause sinusali significative, per cui si poteva ragionevolmente escludere una disfunzione del nodo senoatriale come causa dell'incompetenza cronotropa. Era quindi ragionevole ritenere che l'incompetenza cronotropa riscontrata al test cardiopolmonare fosse riconducibile ad una disautonomia con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico

Questa conclusione era corroborata dall'analisi del segnale ECG nel dominio del tempo. Due indici di HRV (SD, SDANN) risultavano significativamente ridotti nei pazienti rispetto ai controlli, mentre la riduzione di due indici di variabilità battito-battito (pNN50 e rMSSD) non raggiungeva la significatività statistica. Per i valori si rimanda alla *Tabella 4.11*, mentre un esempio emblematico della differenza fra pazienti e controlli è riportato nella *Figura 4.13*. La diminuzione dell'HRV, come l'incompetenza cronotropa, è espressione di disfunzione autonoma con incremento della stimolazione adrenergica e riduzione del tono vagale^[188].

Il valore del parametro SD è correlato con la potenza delle componenti LF e HF; di

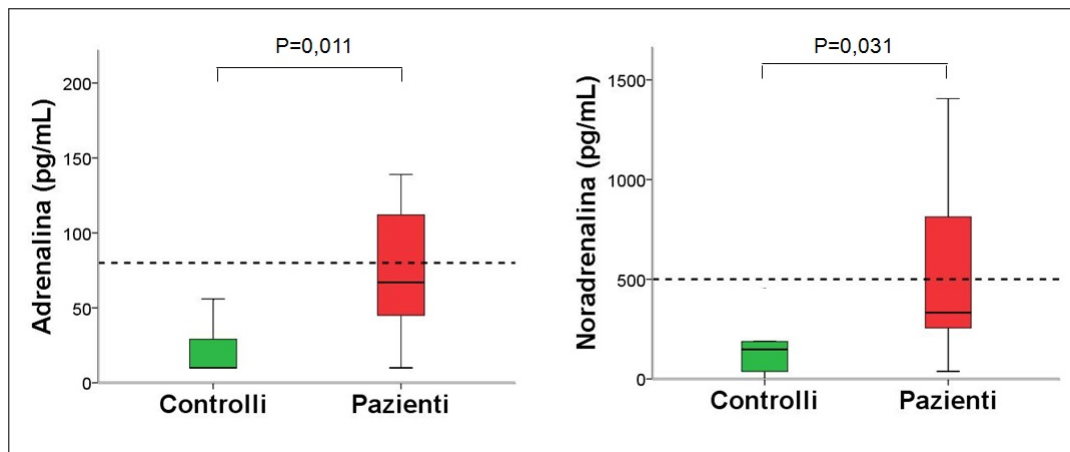


Figura 4.14: Livelli di catecolamine in controlli e pazienti

Nell'immagine sono indicati i *cut-off* per i valori di catecolamine definiti in popolazioni di pazienti con scompenso cardiaco: adrenalina 80 ng/mL, noradrenalina 500 ng/mL.

conseguenza, alla riduzione dell'SD tende a ridursi anche la potenza di entrambe le componenti LF e HF^[188]. Parallelamente, il rapporto LF/HF si modifica in modo non prevedibile, senza alcuna relazione col bilancio fra tono simpatico e tono parasimpatico^[188].

Valutando insieme controlli e pazienti e suddividendoli in percentili di SD, abbiamo riscontrato effettivamente una riduzione significativa della componente LF e una riduzione non significativa della componente HF, mentre il rapporto LF/HF rimaneva sostanzialmente costante.

In sintesi, pazienti con malattia mitocondriale presentano spesso una riduzione dell'HRV, che si riflette in una riduzione di vari parametri (in primo luogo SD) all'analisi nel dominio del tempo e in una riduzione della potenza delle componenti LF e HF all'analisi nel dominio delle frequenze. Dato che l'HRV è significativamente diversa in soggetti sani e pazienti mitocondriopatici, non sarebbe possibile trarre conclusioni sulla funzione autonoma dei pazienti con una valutazione di rapporto LF/HF, potenza della componente LF e potenza della componente HF, come si è tentato di fare in letteratura (si veda il paragrafo 5.2). Sarebbe stato più opportuno ricercare una riduzione dell'HRV mediante l'analisi nel dominio del tempo oppure verificare la presenza di incompetenza cronotropa.

Altre possibili evidenze di disautonomia sono rappresentate dai livelli di catecolamine significativamente superiori (*Figura 4.14*) e dalla sensibilità barocettiva significativamente inferiore (si veda il paragrafo 4.5) nei pazienti rispetto ai controlli.

La riduzione statisticamente significativa della sensibilità barocettiva nei pazienti rispetto ai controlli (si veda il paragrafo 4.5) supportava ulteriormente la presenza di una disautonomia nella nostra popolazione di pazienti.

Dato che in soggetti sani e in pazienti con scompenso cardiaco è stato dimostrato che l'ergoriflesso determina un'attivazione adrenergica, era verosimile che nella nostra popola-

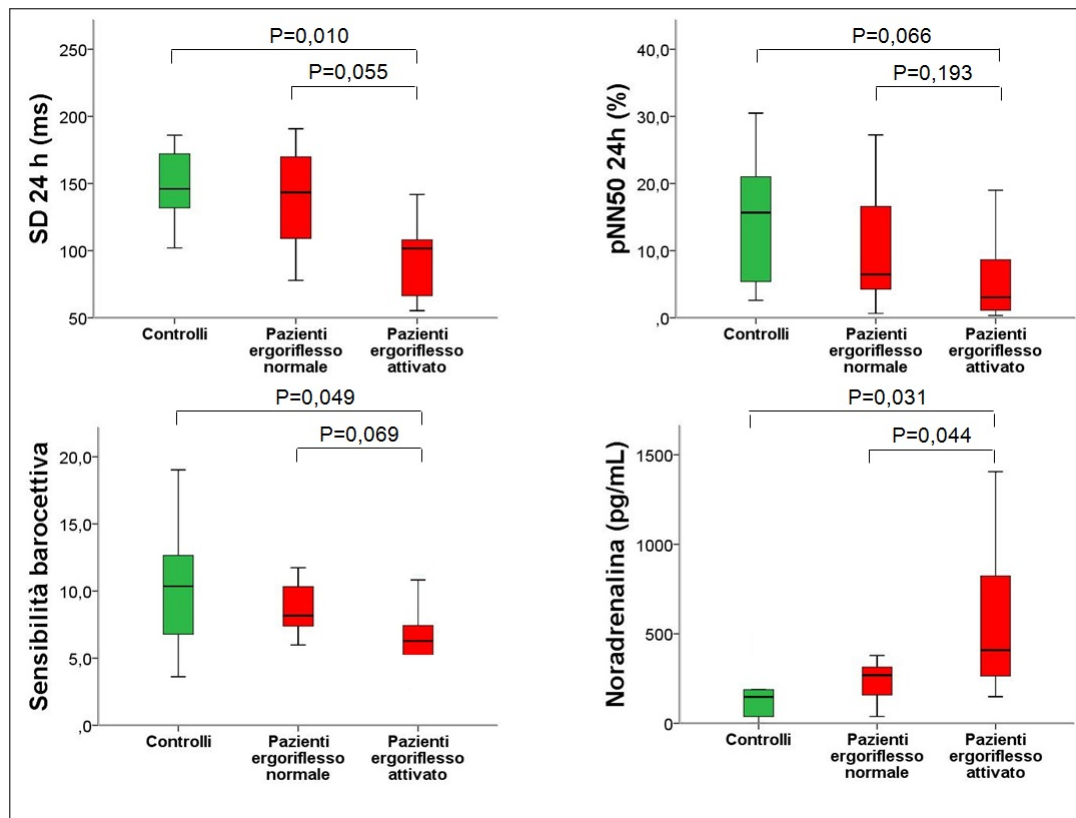


Figura 4.15: Ergoriflesso e funzione autonoma

L'immagine riporta due analisi dei sottogruppi: controlli *vs.* pazienti con ergoriflesso normale *vs.* pazienti con ergoriflesso attivato; pazienti con ergoriflesso normale *vs.* pazienti con ergoriflesso attivato. Nella prima analisi, si riscontra un'associazione statisticamente significativa con riduzione dell'SD, riduzione della sensibilità barocettiva e aumento dei livelli di noradrenalina. Nella seconda analisi, si nota una differenza statisticamente significativa nei livelli di noradrenalina fra pazienti con ergoriflesso normale oppure attivato.

zione l'iperattività dell'ergoriflesso si associasse ad evidenze di disautonomia. I principali risultati a questo riguardo sono riportati nella *Figura 4.16*.

Confrontando 3 sottogruppi (controlli, pazienti con sensibilità ergocettiva <62%, pazienti con sensibilità ergocettiva >62%) si riscontravano differenze statisticamente significative di SD, noradrenalina e sensibilità barocettiva. Quando si confrontavano pazienti con sensibilità ergocettiva <62% e pazienti con sensibilità ergocettiva >62%, la differenza era significativa solo nel caso dei livelli di noradrenalina, anche se era ai limiti della significatività statistica nel caso di SD e sensibilità barocettiva.

La correlazione fra sensibilità ergocettiva e sensibilità barocettiva non raggiungeva la significatività statistica. È stata invece riscontrata una correlazione statisticamente significativa fra sensibilità ergocettiva e livelli di noradrenalina (*Figura 4.16*).

Nel complesso, questi risultati suggerivano un'influenza dell'ergoriflesso sulla funzione autonoma anche in pazienti con malattia mitocondriale.

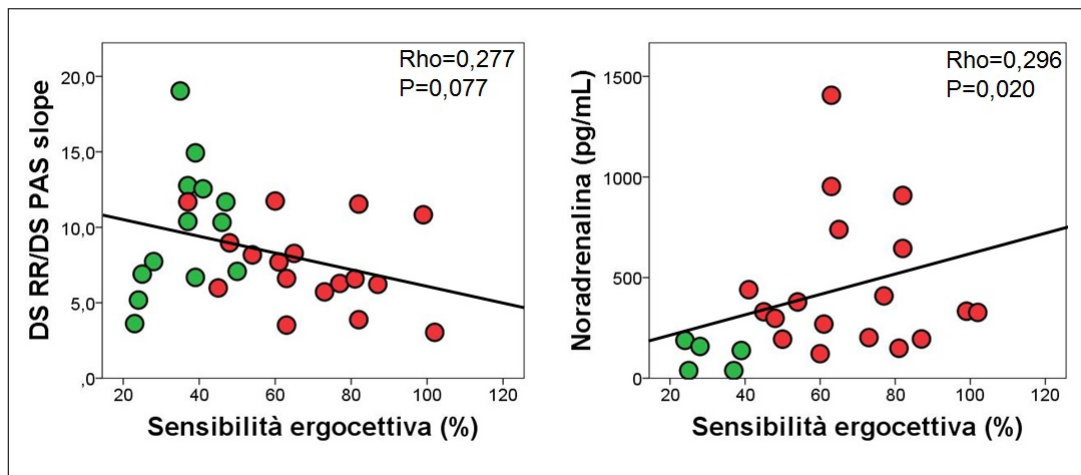


Figura 4.16: Sensibilità ergocettiva, sensibilità barocettiva e livelli di noradrenalina

Si nota una tendenziale riduzione del rapporto DS RR/DS PAS (indice di sensibilità barocettiva) con l'aumento della sensibilità ergocettiva. La correlazione fra ergoriflesso e livelli di noradrenalina raggiunge la significatività statistica.

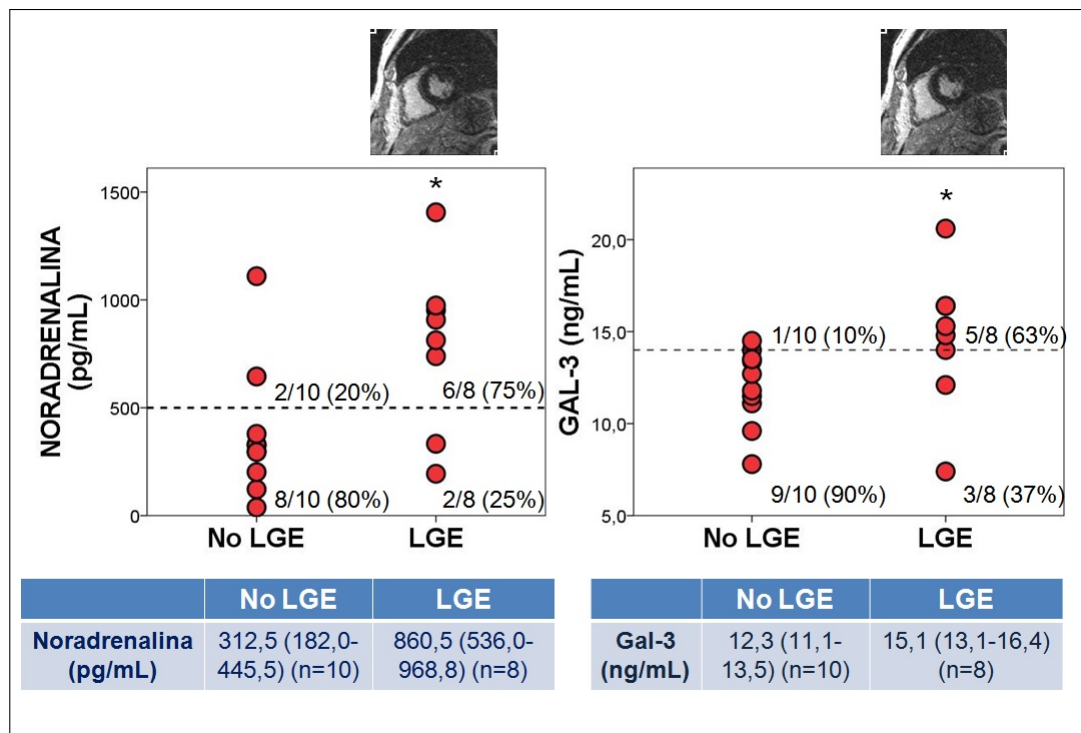


Figura 4.17: Noradrenalina, galectina-3 e fibrosi miocardica

In entrambi i casi si nota l'associazione statisticamente significativa ($P < 0,05$) fra livelli di noradrenalina e di Gal-3 e la presenza di LGE, quindi di fibrosi miocardica.

4.7 Caratterizzazione biumorale

I livelli circolanti di noradrenalina e di galectina-3 (Gal-3) risultavano associati con la presenza di LGE alla RM (Figura 4.17).

Nel grafico sono stati indicati i *cut-off* utilizzati in pazienti con scompenso cardiaco. Mediante l'analisi ROC sono stati individuati i seguenti *cut-off* ottimali per la predizione

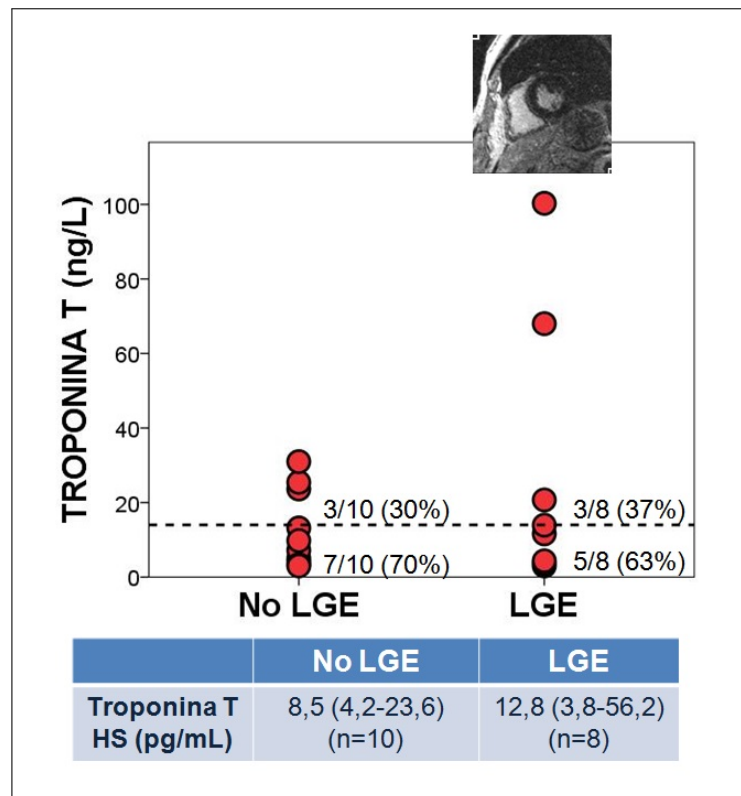


Figura 4.18: Troponina T HS e fibrosi miocardica

L'associazione fra livelli di troponina T HS e LGE non risulta statisticamente significativa ($P=0,633$).

di fibrosi:

- noradrenalina: 692 pg/mL (*area under the curve* (AUC) 0,800, sensibilità 90%, specificità 75%);
- Gal-3: 13,8 ng/mL (AUC 0,794, sensibilità 80%, specificità 75%).

Non è stata riscontrata un'associazione statisticamente significativa fra i livelli di aldosterone e la presenza di LGE, né fra i livelli di peptidi natriuretici e la presenza di LGE. Non era statisticamente significativa neanche l'associazione fra i livelli di troponina T HS e la presenza di LGE (Figura 4.18), nonostante la troponina T sia considerata un indice di necrosi miocardica, la quale prelude alla fibrosi.

Confrontando i valori di troponina T HS con quelli di troponina I, è stato notato che i livelli di troponina T HS erano spesso superiori al *cut-off*, mentre i livelli di troponina I non superavano mai il *cut-off* (Figura 4.19).

Questi dati sembrano suffragare l'ipotesi di Rittoo *et al.*, secondo cui in pazienti miopatici la troponina T HS viene riespressa a livello muscolare, per cui diventa un marcatore di necrosi muscolare, oltre che cardiaca. La troponina I sarebbe invece cardio-specifica^[200]. Questo argomento verrà ripreso più estesamente nel paragrafo 5.6.

Un'origine muscolare della troponina T sembra confermata dalla forte correlazione fra

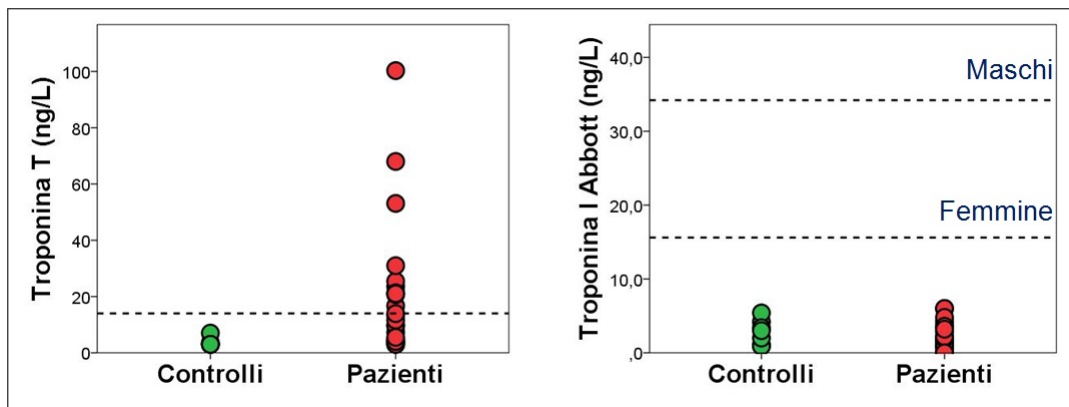


Figura 4.19: Discrepanza fra i valori di troponina T HS e troponina I

I valori di troponina T HS sono risultati al di sopra del *cut-off* (14 ng/L) in 10/25 pazienti (40%), mentre i valori di troponina I, misurata con metodo Abbott (immagine) e con metodo Beckman, sono risultati costantemente inferiori ai relativi *cut-off*. Il paziente con valore più alto di troponina T HS (100,30 ng/L) presentava una troponina I (metodo Abbott) di 4,8 $\mu\text{g/L}$.

i livelli basali di troponina T HS e di vari indici di danno muscolare (*Figura 4.20*). È interessante notare che, nei pazienti, i valori basali di mioglobina, LDH e CPK rientravano spesso nei limiti della norma; , mentre i livelli di troponina T HS superavano spesso il relativo *cut-off*:

- mioglobina: 2/25 (8%) >110 ng/mL;
- LDH: 6/25 (24%) >500 IU/L;
- CPK: 8/25 (32%) >175 IU/L;
- troponina T HS: 10/25 (40%) >14 ng/L.

In base a questi risultati, la troponina T HS potrebbe addirittura costituire il biomarcatore più sensibile di danno muscolare (*Figura 4.21*).

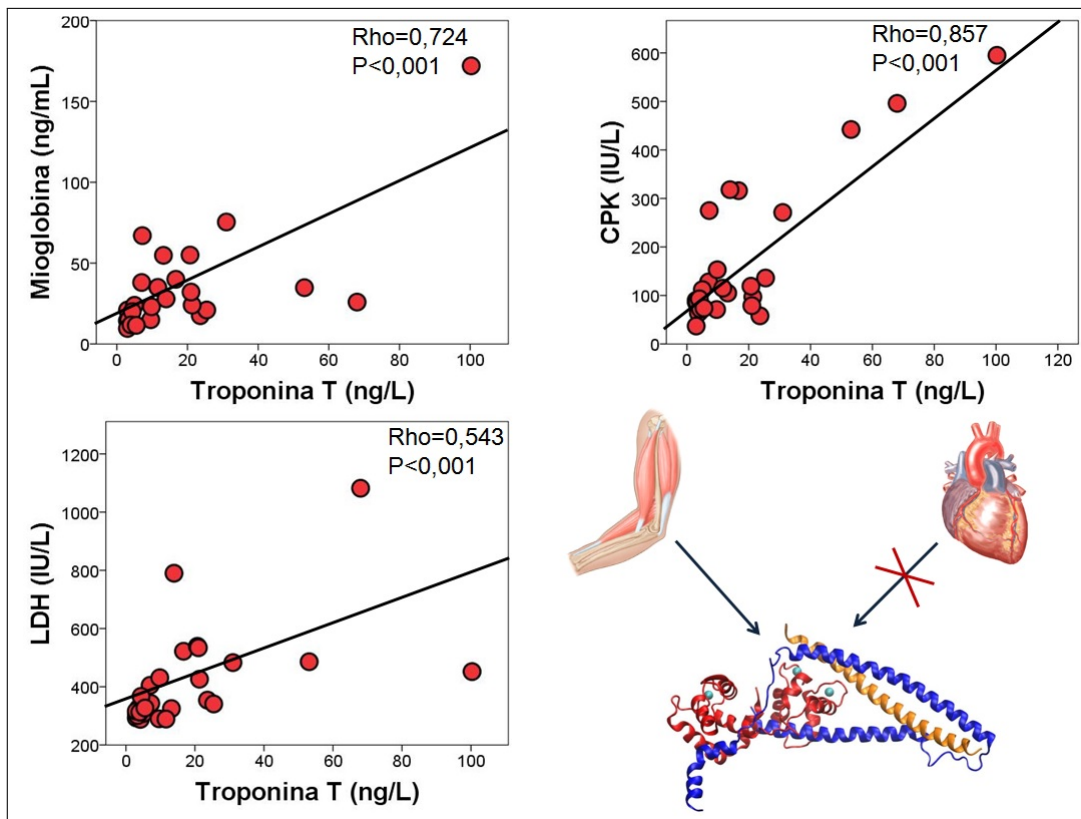


Figura 4.20: Correlazione fra valori di troponina T HS e indici di danno muscolare

Si riscontrano forti correlazioni fra troponina T HS, mioglobina, CPK, LDH

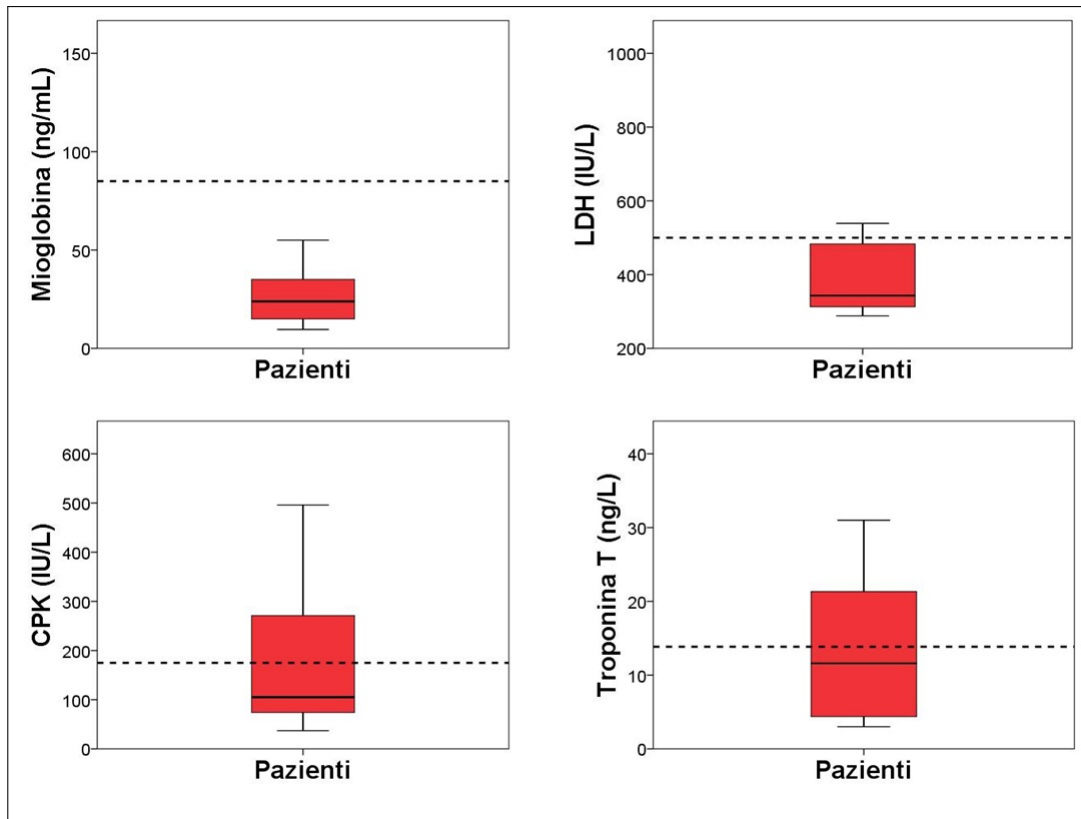


Figura 4.21: Troponina T HS indicatore più sensibile di danno muscolare?

Si riporta la distribuzione di valori di tre biomarcatori di danno muscolare (mioglobina, LDH, CPK) e della troponina T HS, con i relativi *cut-off*. Sono esclusi i valori *outliers*. Si nota che la media dei valori di troponina T HS è quella che più si avvicina al *cut-off* rispettivo; questo suggerisce che la troponina T HS possa essere l'indicatore più sensibile di danno muscolare in pazienti miopatici.

Appendice: il *training* fisico

La "muscle hypothesis" di Piepoli e Coats, presentata nel paragrafo 2.4, ha aperto la strada alla valutazione del *training* fisico per il trattamento dei pazienti con scompenso cardiaco. In passato si riteneva che un programma di esercizio fisico fosse controindicato in questi pazienti, per il rischio di un ulteriore peggioramento della funzione ventricolare sinistra^[205]. Nel 1990 fu eseguito il primo trial clinico su 11 pazienti con scompenso cardiaco; dopo solo otto settimane di *training*, questi pazienti presentavano un miglioramento della tolleranza allo sforzo, della qualità di vita e della sintomatologia^[206]. Nel decennio successivo, molti piccoli trial clinici hanno documentato che il *training* aumenta il massimo consumo di ossigeno^{[207][208]}, migliora la funzione autonoma riducendo il tono simpatico a riposo^[209], migliora l'emodinamica del circolo polmonare durante riposo ed esercizio^[210], diminuisce la tendenza al rimodellamento ventricolare^[206] e migliora la prognosi^[211]. Per quanto riguarda il muscolo scheletrico, sono stati riportati miglioramenti a livello di istologia, funzione, perfusione, metabolismo, ultrastruttura^[211].

È verosimile che il *training* aumenti la tolleranza all'esercizio sia mediante i suoi effetti diretti sul muscolo sia indirettamente, tramite una riduzione della sensibilità ergocettiva^[211]. In effetti, è stato riportato che il *training* riduce l'attività di scarica di fibre afferenti dal muscolo in modelli animali di scompenso cardiaco^[213]. In uno studio di Piepoli e Coats del 1996, sei settimane di *training* di un solo arto superiore riducevano il contributo del metaboriflesso alla risposta cardio-respiratoria all'esercizio, in misura maggiore nei pazienti con scompenso cardiaco rispetto ai soggetti di controllo (ventilazione: -57.6% contro -24.6%; pressione diastolica: -33.2% contro -4.6%; resistenze vascolari nell'arto inferiore: -59.9% contro -8.0%); sei settimane di inattività fisica cancellavano gli effetti benefici del *training*^[121]. Questi risultati costituiscono attualmente l'unica evidenza che il *training* può ridurre la sensibilità ergocettiva in pazienti con scompenso cardiaco, con la parziale eccezione di un articolo recente che ha valutato solo l'attività di scarica di fibre simpatiche nel muscolo scheletrico (*muscle sympathetic nerve activity*, MSNA)^[214].

A partire dagli anni '2000, il *training* è stato valutato anche nell'ambito della patologia neuromuscolare. Per quanto concerne la malattia mitocondriale, nel 2006 Taivassalo *et*

al. hanno analizzato l'effetto di un protocollo di *training* su cicloergometro. Al giorno 1 e al giorno 5 di ogni settimana veniva effettuato un test massimale e al giorno 3 un test submassimale; durante quest'ultimo i pazienti dovevano pedalare mantenendo la frequenza cardiaca al 60% della frequenza cardiaca raggiunta al picco del precedente test massimale. Dopo 14 settimane, i pazienti sono stati randomizzati fra la prosecuzione del *training* per altre 14 settimane e l'interruzione del *training*. Secondo quanto riportato dagli autori, 14 settimane di *training* hanno determinato un miglioramento significativo della tolleranza all'esercizio submassimale, nonché della capacità di lavoro e del consumo di ossigeno al picco dello sforzo. Questi effetti benefici erano mantenuti da altre 14 settimane di *training*, mentre la cessazione dell'esercizio (*detraining*) riportava la risposta cardio-respiratoria all'esercizio al livello iniziale^[88].

In seguito, lo stesso gruppo ha individuato un miglioramento del metabolismo ossidativo e della tolleranza all'esercizio anche in pazienti sottoposti ad un protocollo di esercizio isometrico con entrambi gli arti inferiori; la durata del protocollo era di 12 settimane, con 3 sedute alla settimana^[215].

In uno studio recente di Bates *et al.*, 10 pazienti con la mutazione m.3243A>G sono stati sottoposti a un protocollo di *training* su cicloergometro, della durata di 16 settimane, con 3 sedute alla settimana, della durata di 30 minuti. Durante le sedute, la frequenza cardiaca *target* era pari al 70-80% della frequenza cardiaca al picco del test cardiopolmonare precedente; quest'ultimo veniva eseguito al tempo 0, dopo 8 settimane e dopo 16 settimane. I pazienti sono stati associati per sesso ed età con 10 soggetti sedentari (controlli sani)^[87].

Dopo 16 settimane di *training* risultavano aumentati il consumo di ossigeno al picco dello sforzo, il lavoro al picco e la soglia anaerobica; l'entità dell'aumento era simile in pazienti e controlli. Non sono stati riscontrati miglioramenti significativi della funzione autonoma, la quale era però misurata, in modo impreciso, in termini di potenza delle componenti LF e HF e rapporto LF/HF^[87].

Alla luce di questo lavoro, nel settembre 2014 una prima paziente (EA) è stata avviata ad un protocollo di *training*. È stato utilizzato il protocollo definito precedentemente presso l'FTGM per i pazienti con scompenso cardiaco. Questo protocollo prevede un test cardiopolmonare al tempo 0, dopo 3 mesi e dopo 6 mesi; la frequenza cardiaca *target* durante le sedute di allenamento è pari al 60% della frequenza cardiaca di picco. A domicilio, i pazienti devono effettuare almeno 3 sedute alla settimana, della durata di 30 minuti (esclusi 5 minuti di riscaldamento e di recupero). Ogni mese i pazienti effettuano una seduta presso l'FTGM con la fisioterapista di riferimento, che verifica la *compliance* al programma di *training*.

	Tempo 0	6° mese	Differenza
Lavoro max (W)	74	90	+21,6%
VO ₂ /kg max (mL/kg/min)	18,1	22,7	+25,4%
VO ₂ /WR slope	10,1	10,4	+3,0%
AT (% di VO ₂ max predetto)	46	59	+28,3%
VE/VCO ₂ slope	36,3	35,3	-2,7%

Tabella 4.12: Effetti benefici di 6 mesi di *training*

	Tempo 0	6° mese	Differenza
Lavoro max (W)	124	154	+24,19%
VO ₂ /kg max (mL/kg/min)	21,1	21,6	+2,37%
VO ₂ /WR slope	11,0	12,8	+16,36%
AT (% di VO ₂ max predetto)	53%	60%	+13,21%
VE/VCO ₂ slope	28,3	26,7	-5,65%

Tabella 4.13: Effetti benefici di 3 mesi di *training* con il nostro nuovo protocollo

Per motivi logistici, questa paziente è stata seguita telefonicamente e non ha eseguito la visita a 3 mesi, ma soltanto una visita di controllo a 6 mesi, con l'esecuzione di un test cardiopolmonare e la misurazione delle massime pressioni respiratorie. I principali risultati sono presentati nella *Tabella 4.12*.

Nel complesso, la paziente presentava una maggiore tolleranza allo sforzo e un miglioramento degli indici di metabolismo ossidativo. La paziente riferiva altresì un benessere soggettivo e un miglioramento dello stato generale di salute.

Per poter valutare in modo più completo gli effetti del *training*, nel gennaio 2015 il protocollo di studio è stato modificato come segue:

- la frequenza cardiaca *target* è stata portata al 70-80% della frequenza cardiaca di picco, come nello studio di Bates *et al.*^[87];
- la durata è stata prolungata a 12 mesi;
- il programma di valutazione è diventato più articolato (*Figura 4.22*).

Undici pazienti sono stati avviati a questo protocollo di *training*; al momento, un paziente (CA) ha effettuato la valutazione a 3 mesi, che prevede l'esecuzione di un test cardiopolmonare con prelievi (per dettagli si veda il capitolo 4). La *Tabella 4.13* riassume i risultati principali di questa valutazione.

Tra le possibili integrazioni di questo protocollo di *training* ci sono:

- riabilitazione respiratoria;

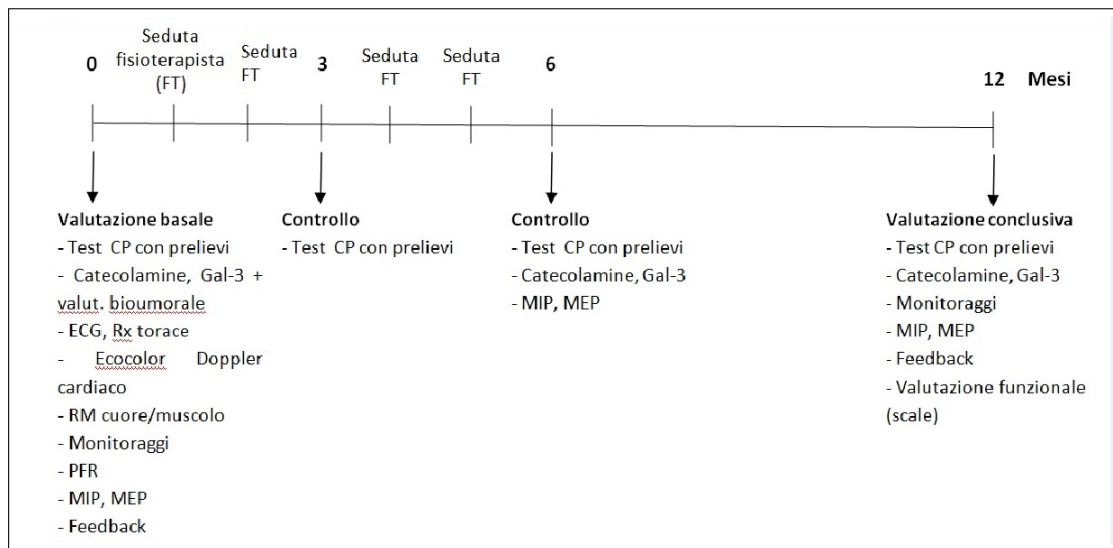


Figura 4.22: Schema del protocollo di *training*.

Per dettagli sulla valutazione basale si rimanda al capitolo 4.

Monitoraggi: ECG Holter, monitoraggio cardio-respiratorio nelle 24 ore. *Feedback*: ergoriflesso, chemoriflesso, baroriflesso. Le scale di valutazione, aggiunte per valutare gli effetti del protocollo di *training*, sono: scala NMDAS (*Newcastle Mitochondrial Disease Adult Scale*; stato psicofisico generale), mMRC (*modified Medical Research Council*; dispnea), FIS (*Fatigue Impact Scale*), SF-12 (*Short Form 12*; qualità di vita). Abbreviazioni: CP, cardiopolmonare; ECG, elettrocardiogramma; FT, fisioterapista; MIP, massima pressione inspiratoria; MEP, massima pressione espiratoria; RM, risonanza magnetica

- somministrazione di integratori ad elevato apporto proteico e calorico;
- valutazione degli effetti del *training* mediante bioimpedenziometria (per analizzare la composizione corporea), spettroscopia con ³¹P del muscolo scheletrico e del miocardio (per valutare il metabolismo ossidativo).

Capitolo 5

Discussione

I principali risultati del presente studio possono essere riassunti come segue:

1. in una popolazione di pazienti con malattia mitocondriale, il coinvolgimento del muscolo scheletrico risultava pressoché costante alla valutazione neurologica, comprensiva di test ischemico con dosaggio dell'acido lattico, EMG, biopsia muscolare con valutazione istologica e immunoenzimatica, e all'analisi *T1-mapping* e alla spettroscopia RM con ^1H ;
2. nonostante l'anamnesi cardiologica fosse muta, è stato riscontrato frequentemente un danno cardiaco subclinico, rappresentato da fibrosi e/o ipertrofia miocardica;
3. l'ergoriflesso, meccanismo neurale che origina nel muscolo scheletrico e controlla ventilazione e funzione autonoma, è risultato marcatamente iperattivo nei pazienti rispetto ai controlli;
4. sono risultate frequenti dispnea da sforzo e fatica muscolare, potenzialmente ascrivibili ad un aumento della sensibilità ergocettiva;
5. questi pazienti presentano spesso una disautonomia con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico;
6. è stata individuata un'associazione statisticamente significativa fra livelli circolanti di Gal-3 e la presenza di fibrosi miocardica, individuata mediante RM con m.d.c.. La troponina T HS non era associata con la presenza di fibrosi miocardica; la discrepanza fra i livelli circolanti di troponina THS e troponina I suggeriva un'origine muscolare della troponina T.

5.1 Interessamento muscolare

La caratterizzazione neurologica, seppure eterogenea, aveva dimostrato alterazioni di tipo miopatico praticamente in tutti i casi (vedi paragrafo 4.1). Possiamo aggiungere che, tranne due casi, nei pazienti con mutazioni dell' mtDNA non è stata quantificata la percentuale di genomi mitocondriali mutati rispetto ai totali.

Nel corso del presente studio abbiamo cercato di valutare il danno muscolare anche tramite acquisizioni di RM a livello del muscolo scheletrico. Nel corso dell' RM cardiaca, 18 pazienti sono stati sottoposti ad un' acquisizione a livello della muscolatura del tronco (grande pettorale o grande dorsale), per misurare l' ECV a livello del muscolo. L' ECV nel muscolo è risultato mediamente aumentato rispetto a valori di riferimento precedentemente definiti presso la FTGM; questo reperto suggerisce l' attivazione di vie profibrotiche in seguito al danno muscolare. A nostra conoscenza, l' analisi *T1-mapping* del muscolo scheletrico non è mai stata condotta in pazienti miopatici, ma solo in pazienti con sclerosi sistemica^[186]; nello studio in questione è stata riscontrata una correlazione fra l' ECV muscolare e quello miocardico^[186], che non abbiamo invece riscontrato nella nostra popolazione

Otto pazienti e tre controlli sono stati sottoposti a spettroscopia con ¹H a livello del braccio destro, per calcolare il rapporto fra le ampiezze dei picchi di tessuto adiposo e di acqua; questo rapporto aumenta in caso di sovertimento strutturale del muscolo, con sostituzione fibroadiposa^[189]. Il rapporto risultava significativamente superiore nei pazienti rispetto ai controlli. Nonostante la piccola numerosità campionaria, abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa fra il rapporto tessuto adiposo-acqua e la sensibilità ergocettiva.

5.2 Danno cardiaco subclinico

Nessuno dei pazienti indirizzati presso la FTGM presentava una patologia cardiaca nota, sebbene 12 pazienti su 25 (48%) fossero già stati sottoposti ad accertamenti cardiologici, rappresentati in tutti i casi da ECG ed ecocolor-Doppler cardiaco. Nessun paziente aveva effettuato una RM cardiaca con m.d.c., nonostante essa sia l' unico esame che consente di studiare la composizione di parete e le sezioni destre del cuore.

All' ECG sono state riscontrate piuttosto frequentemente anomalie aspecifiche e di difficile interpretazione, quali deviazione assiale sinistra o alterazioni della ripolarizzazione. Per un' esposizione completa dei risultati si rimanda al paragrafo 4.2.

All' ecocolor-Doppler cardiaco, due pazienti rispondevano ai criteri per ipertrofia ventricolare e sei ai criteri per rimodellamento concentrico. Questi dati sono in accordo col

fatto che, nella malattia mitocondriale, la cardiomiopatia assume più frequentemente un fenotipo ipertrofico. In base ai criteri ecocardiografici, l'ipertrofia andava classificata in un caso come concentrica, nell'altro come eccentrica. Un paziente presentava un'ipertrofia settale isolata; non c'erano casi di ostruzione del tratto di efflusso. Non sono stati riscontrati altri reperti degni di nota, a parte un caso di ipocinesia ed iniziale riduzione della cinesi ventricolare. La RM cardiaca è stata eseguita in 18 pazienti su 25 (72%). Quest'esame ha confermato la presenza di ipertrofia ventricolare in 2 pazienti ed ha dimostrato la presenza di LGE, quindi di fibrosi miocardica, in 8 pazienti su 18 (44%). Questi risultati sono concordi con quelli di alcuni studi di RM su pazienti con malattia mitocondriale, in cui ipertrofia e fibrosi erano reperti di frequente riscontro; a questo proposito si rimanda al paragrafo 2.1.

Nella nostra casistica abbiamo riscontrato aree lineari di fibrosi, singole o multiple, a localizzazione subendocardica e con interessamento prevalente della regione settale. È ragionevole ritenere che queste aree siano prodotte da una sostituzione fibrosa in aree di pregressa necrosi; un possibile meccanismo di questa necrosi è costituito da un'eccessiva stimolazione simpatica a livello miocardico.

Non è stata riscontrata una correlazione fra la presenza di LGE e i valori del volume extracellulare (ECV) miocardico. A questo riguardo, è importante considerare le differenze fra la ricerca del LGE e la valutazione dell'ECV miocardico mediante analisi *T1-mapping*. La prima analisi è qualitativa e ricerca la presenza di fibrosi macroscopica, ascrivibile a cicatrizzazione in aree di pregressa necrosi^[114]. La seconda analisi è quantitativa, esclude le zone giunzionali e quelle di fibrosi macroscopica, indaga il rimodellamento dell'interstizio e l'apposizione di collagene^[186]. Il frequente riscontro di LGE e l'aumento dell'ECV miocardico fanno ipotizzare che entrambi i processi (sostituzione fibrosa e rimodellamento dell'interstizio) siano simultaneamente attivi nei nostri pazienti.

5.3 Iperattività dell'ergoriflesso

L'ergoriflesso è un meccanismo neurale che origina nel muscolo scheletrico e che modula ventilazione e funzione cardiovascolare a seconda dell'intensità dell'esercizio. Una deplezione della muscolatura scheletrica, come quella associata allo scompenso cardiaco, può determinare un'iperattività dell'ergoriflesso. È verosimile che anche pazienti con un danno muscolare scheletrico, quale si riscontra frequentemente nella malattia mitocondriale, possa determinare un aumento della sensibilità ergocettiva.

Utilizzando un protocollo validato nello scompenso cardiaco, abbiamo valutato la sensibilità ergocettiva in termini di risposta ventilatoria all'occlusione vascolare dopo un eser-

cizio dinamico. In questo modo abbiamo riscontrato un aumento significativo della sensibilità ergocettiva nei pazienti rispetto ai controlli: 64% (53-82%) nei pazienti contro 37% (26-41%) nei controlli ($P < 0,001$). Per indicare un aumento della sensibilità ergocettiva abbiamo utilizzato il valore di 62% come *cut-off*, in base a quanto definito da Piepoli *et al.* nell'ambito dello scompenso cardiaco.

Un aumento della sensibilità ergocettiva era stato finora descritto soltanto nell'ambito dello scompenso cardiaco. In questo studio abbiamo fornito la prima dimostrazione dell'iperattività dell'ergoriflesso in pazienti con malattia mitocondriale, nonostante alcuni autori l'avessero già ipotizzata da un punto di vista teorico in precedenza^{[87][159][160]}. A nostra conoscenza, questa rappresenta anche la prima documentazione di aumento della sensibilità ergocettiva in pazienti miopatici.

5.4 Ergoriflesso e limitazione della capacità di esercizio

I pazienti con malattia mitocondriale presentano spesso una riduzione della tolleranza allo sforzo, che è oggettivabile mediante test ergometrico cardiopolmonare. I risultati di questo esame riflettono fedelmente quelli riportati precedentemente in letteratura: in prove solitamente massimali dal punto di vista metabolico (come dimostrato da valori di quoziente respiratorio $> 1,10$), i pazienti con malattia mitocondriale raggiungevano un carico di lavoro inferiore rispetto ai controlli, presentavano un minore consumo di ossigeno durante l'aumento del carico di lavoro (minore *slope* VO_2/WR) e all'acme dello sforzo (minore VO_2/kg al picco); la soglia anaerobica veniva raggiunta più precocemente, l'efficienza degli scambi ventilatori si riduceva, come dimostrato da un aumento della *slope* VE/VCO_2 . Queste alterazioni sono riconducibili al decondizionamento fisico e alla compromissione del metabolismo ossidativo legata alla disfunzione mitocondriale.

Nei nostri pazienti, abbiamo escluso altre possibili cause di dispnea da sforzo mediante prove di funzionalità respiratoria, misurazione della capacità di diffusione del monossido di carbonio, radiografia del torace, esame emocromocitometrico, dosaggio degli ormoni tiroidei. Per verificare se la debolezza della muscolatura respiratoria costituisse un fattore limitante la capacità di esercizio, abbiamo misurato il parametro ventilazione al picco del test cardiopolmonare/massima ventilazione volontaria (VE/MVV). In tutti i pazienti questo rapporto era inferiore a 0,80, per cui la riserva funzionale della muscolatura respiratoria non era intaccata (cioè la debolezza dei muscoli respiratori non limitava l'esercizio).

L'iperattività dell'ergoriflesso può ridurre la tolleranza allo sforzo determinando dispnea e fatica muscolare, come dimostrato per la prima volta nel contesto dello scompenso cardiaco. Nel nostro studio, abbiamo riscontrato associazioni statisticamente significative

con i punteggi Borg relativi a dispnea e fatica muscolare al test cardiopolmonare. La sensibilità ergocettiva presentava inoltre una correlazione significativa con un'interruzione precoce del test (espressa da W_{max} e VO_2/kg_{max}), con un precoce passaggio al metabolismo anaerobico (posizione della soglia anaerobica rispetto al VO_2_{max} predetto) e con una riduzione dell'efficienza ventilatoria (VE/VCO_2 slope); questi dati supportano un'influenza dell'ergoriflesso sulla tolleranza allo sforzo.

5.5 Ergoriflesso e disautonomia

Nella grande maggioranza dei pazienti sottoposti a test cardiopolmonare (17/20, 85%) era presente incompetenza cronotropa, riconducibile a disautonomia con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico^[191]. Confermavano queste alterazioni della funzione autonoma la sensibilità barocettiva significativamente inferiore nei pazienti rispetto ai controlli e la riduzione della variabilità della frequenza cardiaca (HRV)^[192].

Per quanto riguarda l'ultimo punto, nei pazienti si riscontrava una riduzione statisticamente significativa di SD e SDANN nelle 24 ore, due indici di HRV. Molti pazienti presentavano una riduzione marcata di questi indici: ad esempio, 5 pazienti su 24 (21%) presentavano un valore di SD <70 ms.

Nell'analisi del segnale Holter nel dominio delle frequenze, quando l'HRV è nei limiti della norma la potenza della componente HF riflette con buona approssimazione il tono parasimpatico, mentre la potenza della componente LF è un indice molto approssimativo del tono simpatico. La riduzione dell'HRV si manifesta con una diminuzione della potenza di entrambe le componenti LF e HF, mentre il rapporto LF/HF si modifica in modo non prevedibile^[193]. Di conseguenza, in caso di riduzione dell'HRV si possono trarre conclusioni molto limitate sulla funzione autonoma dalla potenza delle componenti LF e HF e dal loro rapporto^{[194][195]}.

A nostra conoscenza, prima di un case report del nostro gruppo c'erano solo due documentazioni di disautonomia in pazienti con malattia mitocondriale. Nel 2002 era stato pubblicato uno studio su 10 pazienti con malattia mitocondriale e diabete, confrontati con 55 soggetti diabetici e con 45 controlli; su una registrazione Holter veniva fatta un'analisi del segnale nel dominio del tempo e nel dominio delle frequenze. Nei pazienti diabetici mitocondriali e negli altri diabetici, il parametro SD era significativamente ridotto rispetto ai controlli. La potenza delle componenti LF e HF e il rapporto LF/HF erano significativamente inferiori nei soggetti diabetici; la riduzione era più marcata nei pazienti mitocondriopatici. Questi risultati sono sostanzialmente in accordo con quelli da noi ottenuti.

Nel 2013 Bates *et al.* avevano studiato 10 pazienti mitocondriopatici e 10 controlli, effettuando una registrazione ECG di 30 minuti ed effettuando solo un'analisi nel dominio delle frequenze. Gli autori avevano riscontrato un aumento della potenza della componente LF e del rapporto LF/HF, interpretando questi risultati come evidenze di ipertono adrenergico^[87]. Tuttavia, come spiegato precedentemente, l'analisi nel dominio delle frequenze non fornisce informazioni attendibili riguardo la funzione autonoma quando l'HRV si riduce. La funzione autonoma può essere valutata in modo più attendibile mediante un'analisi del segnale Holter nel dominio del tempo, la ricerca dell'incompetenza cronotropa al test cardiopolmonare, il dosaggio dei livelli basali di catecolamine e la misurazione della sensibilità barocettiva. Nella nostra popolazione, tutti questi indici erano concordi nell'indicare la presenza di una disautonomia con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico.

In soggetti sani e in pazienti con scompenso cardiaco è stata individuata un'influenza dell'ergoriflesso sulla funzione autonoma^{[89][142]}. Nella nostra popolazione, un'analisi dei sottogruppi (controlli *vs.* pazienti con ergoriflesso normale *vs.* pazienti con ergoriflesso attivato) ha mostrato differenze statisticamente significative di SD, livelli di noradrenalina in circolo e sensibilità barocettiva.

È stato ipotizzato che in condizioni fisiologiche l'attivazione dell'ergoriflesso riduca la sensibilità barocettiva, verosimilmente agendo sui centri integrativi del sistema nervoso centrale. Gli studi che hanno tentato di dimostrare quest'influenza non sono completamente attendibili perché hanno misurato la sensibilità barocettiva durante il recupero post-esercizio, cioè quando il set-point del baroriflesso si modifica in modo non prevedibile^{[196][197]}. Tuttavia, è plausibile che in questi pazienti l'iperattività dell'ergoriflesso riducesse la sensibilità barocettiva.

Confrontando pazienti con ergoriflesso normale e attivato, si riscontravano differenze significative soltanto nel caso dei livelli di noradrenalina, anche se erano ai limiti della significatività statistica nel caso di SD e sensibilità barocettiva. La correlazione fra sensibilità ergocettiva e sensibilità barocettiva non raggiungeva la significatività statistica; abbiamo invece riscontrato una correlazione significativa con i livelli di noradrenalina.

5.6 Biomarcatori di danno cardiaco e muscolare

L'individuazione della fibrosi miocardica è importante perché può influenzare l'iter diagnostico (esecuzione dell'Holter per verificare la presenza di extrasistoli ventricolari) e la strategia terapeutica (*in primis* inibizione farmacologica del sistema renina-angiotensina-aldosterone, per rallentare la progressione della fibrosi).

Nel nostro studio, noradrenalina e Gal-3 risultavano associate con la presenza di LGE alla RM. L'associazione fra noradrenalina e presenza di LGE è riconducibile ad un effetto profibrotico della stimolazione simpatica cronica^{[131][132]}. Questo effetto potrebbe essere sia diretto che mediato da un'iperattività del sistema renina-angiotensina-aldosterone^{[131][132][136]}. I nostri risultati promuovono il ricorso al dosaggio della noradrenalina sia come indice di funzione autonoma sia come possibile predittore di fibrosi miocardica.

La Gal-3 è un indice di flogosi e fibrosi tissutale^[198]. Recentemente è stato dimostrato il suo valore predittivo indipendente nell'individuazione di fibrosi miocardica in pazienti con cardiomiopatia dilatativa^[199]; la Gal-3 non è mai stata valutata nel contesto della cardiomiopatia ipertrofica. Qualora confermata da ulteriori studi, l'associazione fra livelli di Gal-3 e fibrosi miocardica promuoverebbe il dosaggio della Gal-3 in pazienti con malattia mitocondriale, soprattutto qualora non si possa eseguire la RM cardiaca.

La troponina T HS non ha presentato un'associazione con la presenza di LGE alla RM, nonostante la troponina T sia considerata un indicatore sensibile e specifico di necrosi miocardica^[200], che esita nella fibrosi cardiaca. Abbiamo inoltre riscontrato che i valori di troponina T HS erano frequentemente superiori al *cut-off*, mentre i valori di troponina I, valutati con due diversi dosaggi, erano costantemente inferiori ai rispettivi *cut-off*. Non esistono significative differenze analitiche fra il dosaggio della troponina T HS e il dosaggio Abbott della troponina I, per cui la differenza riscontrata dev'essere attribuita ad un rilascio preferenziale della troponina T rispetto alla troponina I dai cardiomiociti (poco plausibile) oppure ad un'origine diversa di troponina T e troponina I.

Nel giugno 2014, Rittoo *et al.* hanno pubblicato uno studio su 52 pazienti con 20 diversi tipi di miopatia. Gli autori hanno riscontrato frequentemente un aumento dei livelli di troponina T HS in presenza di valori normali di troponina I (e di peptidi natriuretici)^[200]. Contrariamente alla troponina I, la troponina T viene espressa nel muscolo scheletrico durante la vita fetale^{[65][202]} e viene riespressa in condizioni di danno e rigenerazione muscolare, come documentato mediante indagini immunoistochimiche e la ricerca dell'mRNA della troponina T^{[203][204]}.

A supporto di un'origine muscolare della troponina T, abbiamo riscontrato una forte correlazione ($P < 0,001$) fra i livelli basali di troponina T HS e i tre indici di danno muscolare: mioglobina, LDH e soprattutto CPK ($Rho = 0,857$). Valutando la distribuzione dei valori rispetto ai *cut-off* rispettivi, è stato notato che la media dei valori di troponina T HS è quella che più si avvicina al *cut-off* rispettivo; questo dato suggerisce che la troponina T HS potrebbe addirittura costituire il biomarcatore più sensibile di danno muscolare in pazienti con malattia mitocondriale.

Limitazioni dello studio

La principale limitazione di questo studio è rappresentata dal numero relativamente piccolo di soggetti valutati (25 pazienti e 13 controlli). Inoltre, la caratterizzazione della popolazione di controllo è ancora in parte incompleta, ad esempio per motivi tecnici il dosaggio delle catecolamine è stato eseguito solo in 5 soggetti. Ci proponiamo quindi di completare la caratterizzazione dei soggetti arruolati e di proseguire il reclutamento.

Un'altra possibile limitazione è costituita dall'eterogeneità dei pazienti sul piano clinico e genotipico. Bisogna considerare che la malattia mitocondriale può avere varie manifestazioni cliniche, per cui la selezione dei pazienti in base a un determinato fenotipo risulterebbe artificiosa e determinerebbe una drastica riduzione della numerosità campionaria. D'altro canto, mutazioni diverse esitano in una generica disfunzione mitocondriale, per cui anche una selezione su base genotipica non sarebbe giustificata. Rifacendoci ad uno studio precedente^[161], abbiamo incluso anche 4 pazienti in cui non era stata ancora individuata una mutazione di sicuro significato patogenetico. In questi casi, l'insieme dei dati clinici, istologici e immunoenzimatici era fortemente suggestivo di malattia mitocondriale, inoltre in 2 pazienti erano state individuate delezioni multiple dell'mtDNA, indicative di un'instabilità del genoma mitocondriale ascrivibile ad una mutazione patogenetica dell'nDNA.

Abbiamo notato che la caratterizzazione neurologica del danno muscolare era piuttosto eterogenea. Come discusso precedentemente (si veda il paragrafo 4.1), questa eterogeneità era riconducibile essenzialmente al diverso tempo intercorso fra il sospetto di malattia mitocondriale e l'individuazione di una mutazione patogenetica. Sarebbe necessario uniformare il più possibile la valutazione neurologica del danno muscolare, integrarla con gli esami effettuati in ambito cardiologico (spettroscopia RM e analisi T1-*mapping* del muscolo) e con gli altri risultati clinici e strumentali.

Possiamo citare come ulteriore limitazione il fatto che la sensibilità ergocettiva è stata valutata esclusivamente in termini di risposta ventilatoria al *clamp*, in accordo con gli studi di Piepoli *et al.* In futuro ci proponiamo di valutare la risposta cardiovascolare alla stimolazione ergocettiva in pazienti e controlli; abbiamo già intrapreso quest'analisi registrando la frequenza cardiaca e, in un sottogruppo di pazienti, la pressione arteriosa

diastolica durante la valutazione dell'ergoriflesso.

Conclusioni e prospettive

In questo studio preliminare su pazienti con malattia mitocondriale, la RM con m.d.c. ha rilevato la presenza di fibrosi e/o ipertrofia in una percentuale significativa di casi, nonostante l'anamnesi cardiologica fosse muta. Sono stati riscontrati una riduzione della sensibilità barocettiva, un aumento della sensibilità ergocettiva e un *imbalance* autonomico con aumento del tono simpatico e riduzione del tono parasimpatico. La troponina T HS si è dimostrata un biomarcatore accurato di danno muscolare scheletrico.

Fra i possibili sviluppi di questo studio elenchiamo i seguenti:

- utilizzo della RM cardiaca per caratterizzare il danno cardiaco subclinico (fibrosi, ipertrofia) in un'ampia popolazione di pazienti;
- analisi dell'evoluzione nel tempo del danno cardiaco, mediante la ripetizione seriata della RM cardiaca;
- verifica del valore predittivo di noradrenalina e Gal-3 nei confronti della fibrosi miocardica;
- valutazione di altri possibili biomarcatori di fibrosi, ad esempio ST2, propeptidi del collagene, osteopontina, GDF15;
- verifica di associazioni tra fibrosi e/o ipertrofia ed alterazioni sistemiche (ad esempio, aumento della sensibilità ergocettiva oppure *imbalance* simpato-vagale);
- analisi della vulnerabilità miocardica e muscolare mediante dosaggio di biomarcatori di danno cardiaco e muscolare prima e dopo il test cardiopolmonare;
- caratterizzazione della troponina T HS come indicatore di danno muscolare in pazienti miopatici, in primo luogo mediante ricerca dell'espressione della troponina T nei campioni biopsici di muscolo scheletrico;
- valutazione di nuovi approcci terapeutici: modulazione neuro-ormonale (terapia beta-bloccante) e *training* fisico.

Per quanto riguarda l'ultimo punto, la somministrazione di beta-bloccanti potrebbe correggere la disautonomia e migliorare la storia naturale del danno cardiaco. Siccome anche il *training* fisico migliora il bilancio simpato-vagale, la terapia beta-bloccante potrebbe essere riservata ai pazienti che non sono candidabili al *training* o che non ottengono notevoli benefici dal *training*.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare innanzitutto il Prof. Michele Emdin, il Dr. Alberto Giannoni e il Dr. Claudio Passino per aver definito il progetto sperimentale e per avermi guidato nella sua realizzazione. Ringrazio inoltre il Prof. Gabriele Siciliano, il Dr. Michelangelo Mancuso per aver definito il progetto sperimentale e per avermi guidato nella sua realizzazione.

Questa tesi è il frutto del lavoro collettivo di un numero notevole di persone operanti presso la FTGM, in qualità di medici, infermieri, tecnici, ingegneri. A queste persone va la mia più profonda gratitudine. Per ragioni di brevità mi limito a citarle in ordine alfabetico: Assunta Agazio, Giovanni Donato Aquaro, Elena Barberini, Andrea Barison, Eleonora Benelli, Francesca Bramanti, Giosuè Angelo Catapano, Sara Chiappino, Vlad Chubuchny, Fabrizio Conforti, Daniele De Marchi, Alessandra Gabutti, Sara Guerrieri, Francesco Grotti, Giovanni Iudice, Petra Keilberg, Maila Lazzarini, Francesca Mannucci, Gianluca Mirizzi, Luca Panchetti, Luigi Emilio Pastormerlo, Roberta Poletti, Concetta Prontera, Valentina Raglianti, Luca Serasini, Silvia Severino, Claudia Taddei, Alessandro Valleggi, Maurizio Varanini, Cristina Vassalle, Giuseppe Vergaro, Luc Zyw.

Al termine del mio percorso alla Scuola Superiore Sant'Anna, desidero ringraziare il mio tutor, Prof. Flavio Coceani, e altri docenti della Scuola: Prof. Aldo Clerico, Prof. Fabio Anastasio Recchia, Prof. Vincenzo Lionetti, Prof. Mario Meola.

Ringrazio anche gli ex-allievi della Scuola: Annamaria Del Franco, Alberico Del Torto, Nicola Pugliese, che prima di me hanno svolto il loro lavoro di tesi presso la FTGM. Porgo i migliori auguri a Chiara Borrelli e Vincenzo Castiglione, allievi della Scuola, che si accingono a percorrere la stessa strada.

Ringrazio il Prof. Salvatore DiMauro e il Prof. Michio Hirano, che mi hanno accolto presso la *Columbia University* di New York per uno stage estivo, durante il quale ho potuto approfondire alcuni aspetti genetici e clinici della patologia mitocondriale.

Ringrazio infine i pazienti arruolati in questo studio, per avermi mostrato il lato “umano” della malattia mitocondriale e avermi fatto comprendere la necessità di migliorarne la gestione clinica.

Bibliografia

- [1] Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull.* 2013;106:135-159.
- [2] DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med.* 2003;348:2656-2668.
- [3] Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol.* 1967;14:255-274.
- [4] Andersson S, Karlberg O, Canback B, *et al.* On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003; 358:165–179.
- [5] Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol.* 1988;136:507-513.
- [6] Burger G, Lang BF, Reith M, *et al.* Genes encoding the same three subunits of respiratory complex II are present in the mitochondrial DNA of two phylogenetically distant eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:2328–2332.
- [7] Youle RJ, van der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012;337:1062–1065.
- [8] Rafelski SM. Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC Biol.* 2013;11:71.
- [9] Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech.* 2003;61:88–102.
- [10] Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, *et al.* Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:4542-4546.
- [11] Rossignol R, Faustin B, Rocher C, *et al.* Mitochondrial threshold effects. *Biochem J.* 2003;370:751–762.

- [12] Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6:389-402.
- [13] Wolff JN, White DJ, Woodhams M, *et al.* The strength and timing of the mitochondrial bottleneck in salmon suggests a conserved mechanism in vertebrates. *PLoS One.* 2011;6:e20522.
- [14] Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, *et al.* Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1996;14:146–151.
- [15] Brown DT, Samuels DC, Michael EM, *et al.* Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes. *Am J Hum Genet* 2001;68:533–536.
- [16] Van Goethem G, Luoma P, Rantamäki M, *et al.* POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology.* 2004;63:1251-1257.
- [17] Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, *et al.* Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet.* 2001;28:211-212.
- [18] DiMauro S, Hirano M. Pathogenesis and treatment of mitochondrial disorders. *Adv Exp Med Biol.* 2009;652:139-170.
- [19] Busiello RA, Savarese S, Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol.* 2015;6:36.
- [20] Sheu SS, Dirksen RT, Pugh EN Jr. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: mitochondria take center stage. *J Gen Physiol.* 2012;139:391-393.
- [21] Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett.* 1975;59:137-139.
- [22] Santo-Domingo J, Demareux N. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the renaissance of mitochondrial pH. *J Gen Physiol.* 2012;139:415-423.
- [23] Celi FS, Le TN, Ni B. Physiology and relevance of human adaptive thermogenesis response. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26:238-247.

- [24] O-Uchi J, Pan S, Sheu SS. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: molecular identities of mitochondrial Ca²⁺ influx mechanism: updated passwords for accessing mitochondrial Ca²⁺-linked health and disease. *J Gen Physiol.* 2012;139:435-443.
- [25] Seidlmayer LK, Juettner VV, Kettlewell S, *et al.*. Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca²⁺, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovasc Res.* 2015;106:237-248.
- [26] Wei L, Dirksen RT. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: mitochondrial superoxide flashes: from discovery to new controversies. *J Gen Physiol.* 2012;139:425-434.
- [27] Weidinger A, Kozlov AV. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules.* 2015;5:472-484.
- [28] Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, *et al.* Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823:1604-1616.
- [29] Papadopoulos V, Miller WL. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26:771-790.
- [30] Valentino ML, Barboni P, Rengo C, *et al.* The 13042G>A/ND5 mutation in mtDNA is pathogenic and can be associated also with a prevalent ocular phenotype. *J Med Genet.* 2006;43:e38.
- [31] Barbiroli B, Iotti S, Lodi R. Improved brain and muscle mitochondrial respiration with CoQ. An in vivo study by ³¹P-MR spectroscopy in patients with mitochondrial cytopathies. *BioFactors.* 1999;9:253-260.
- [32] Lenaz G, Baracca A, Carelli V, *et al.* Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1658:89-94.
- [33] Baracca A, Barogi S, Carelli V, *et al.* Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene. *J Biol Chem.* 2000;275:4177-4182.
- [34] Baracca A, Solaini G, Sgarbi G, *et al.* Severe impairment of complex I-driven ATP synthesis in Leber's hereditary optic neuropathy cybrids. *Arch. Neurol.* 2005;62:730-736.

- [35] Verkaart S, Koopman WJH, van Emst-De Vries SE, *et al.* Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:373–381.
- [36] Brini M, Pinton P, King MP, *et al.* A calcium signaling defect in the pathogenesis of a mitochondrial DNA inherited oxidative phosphorylation deficiency. *Nature Med.* 1999;5:951–954.
- [37] Moudy AM, Handran SD, Goldberg MP, *et al.* Abnormal calcium homeostasis and mitochondrial polarization in a human encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:729–733.
- [38] Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, *et al.* Heteroplasmic mtDNA mutation (T>G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet.* 1992;50:852–858.
- [39] Betts J, Jaros E, Perry RH, *et al.* Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. *Neuropath Appl Neurobiol.* 2006;32:359–373.
- [40] Tanji K, Kunimatsu T, Vu TH, *et al.* Neuropathological features of mitochondrial disorders. *Cell Develop Biol.* 2001;12:429–439.
- [41] Carelli V, Barboni P, Sadun AA. Mitochondrial ophthalmology. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, eds. *Mitochondrial Medicine.* London: Informa Healthcare, 2006:105–142.
- [42] McFarland R, Schaefer AM, Gardner A, *et al.* Familial myopathy: New insights into the T14709C mitochondrial tRNA mutation. *Ann Neurol.* 2004;55:478–484.
- [43] DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med.* 2005;37:222–232.
- [44] DiMauro S, Schon EA, Carelli V, *et al.* The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol.* 2013;9:429–44.
- [45] Tuppen H, Blakely EL, Turnbull DM, *et al.* Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1797:113–128.
- [46] DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med.* 2003;348:2656–2668.

- [47] Bates MG, Bourke JP, Giordano C, *et al.* Cardiac involvement in mitochondrial DNA disease: clinical spectrum, diagnosis, and management. *Eur Heart J.* 2012; 33:3023–3033.
- [48] Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol.* 2008;39:223–235.
- [49] Ruhoy IS, Saneto RP. The genetics of Leigh syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet.* 2014;7:221-734.
- [50] Maceluch JA, Niedziela M. The clinical diagnosis and molecular genetics of Kearns–Sayre syndrome: a complex mitochondrial encephalomyopathy. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2006;4:117–137.
- [51] Kabunga P, Lau AK, Phan K, *et al.* Systematic review of cardiac electrical disease in Kearns-Sayre syndrome and mitochondrial cytopathy. *Int J Cardiol.* 2015;181:303-310.
- [52] Rotig A, Cormier V, Blanche S, *et al.* Pearson’s marrow–pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest.* 1990;86:1601–1608.
- [53] Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 1990;348:651–653.
- [54] Yoshida T, Ouchi A, Miura D, *et al.* MELAS and reversible vasoconstriction of the major cerebral arteries. *Intern Med.* 2013;52:1389-1392.
- [55] Kaufman KR, Zuber N, Rueda-Lara MA, *et al.* MELAS with recurrent complex partial seizures, nonconvulsive status epilepticus, psychosis, and behavioral disturbances: case analysis with literature review. *Epilepsy Behav.* 2010;18:494-497.
- [56] Shanske S, Coku J, Lu J, *et al.* The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome: evidence from 12 cases. *Arch Neurol.* 2008;65:368–372.
- [57] Taylor RW, Chinnery PF, Haldane F, *et al.* MELAS associated with a mutation in the valine transfer RNA gene of mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 1996;40:459–462.
- [58] Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, *et al.* Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns–Sayre syndrome. *N Engl J Med.* 1989;320:1293–1299.

- [59] Finsterer J. Inherited mitochondrial neuropathies. *J Neurol Sci.* 2011;304:9-16.
- [60] Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet.* 2002;39:162–169.
- [61] Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, *et al.* Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell.* 1990;61:931–937.
- [62] Yoneda M, Tanno Y, Horai S, *et al.* A common mitochondrial DNA mutation in the t-RNA(Lys) of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. *Biochem Int.* 1990;21:789–796.
- [63] Silvestri G, Ciafaloni E, Santorelli FM, *et al.* Clinical features associated with the A>G transition at nucleotide 8344 of mtDNA (“MERRF mutation”). *Neurology.* 1993;43:1200–1206.
- [64] Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, *et al.* The epidemiology of mitochondrial disorders-past, present and future. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1659:115-120.
- [65] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290:457-465.
- [66] Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 1988;331:717-719.
- [67] Wallace DC, Singh G, Lott MT, *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber’s hereditary optic neuropathy. *Science.* 1988;242:1427-1430.
- [68] Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, *et al.* A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 1994;330:962-968.
- [69] Bogousslavsky J, Regli F. Ischemic stroke in adults younger than 30 years of age. Cause and prognosis. *Arch Neurol.* 1987;44:479-482.
- [70] Estivill X, Govea N, Barceló E, *et al.* Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet.* 1998;62:27-35.
- [71] Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, *et al.* Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet.* 1998;63:447-454.

- [72] Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, *et al.* The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol.* 2000;48:188-193.
- [73] Bernier FP, Boneh A, Dennett X, *et al.* Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology.* 2002;59:1406-1411.
- [74] Berardo A, DiMauro S, Hirano M. A diagnostic algorithm for metabolic myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010;10:118-126.
- [75] Mancuso M, Orsucci D, Filosto M, *et al.* Drugs and mitochondrial diseases: 40 queries and answers. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13:527-543.
- [76] Krähenbühl S, Brandner S, Kleinle S, *et al.* Mitochondrial diseases represent a risk factor for valproate-induced fulminant liver failure. *Liver.* 2000;20:346-348.
- [77] Avula S, Parikh S, Demarest S, *et al.* Treatment of mitochondrial disorders. *Curr Treat Options Neurol.* 2014;16:292.
- [78] Mancuso M, Orsucci D, Volpi L, *et al.* Coenzyme Q10 in neuromuscular and neurodegenerative disorders. *Curr Drug Targets.* 2010;11:111-121.
- [79] Hargreaves IP. Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;49:105-111.
- [80] Marriage B, Clandinin MT, Glerum DM. Nutritional cofactor treatment in mitochondrial disorders. *J Am Diet Assoc.* J 2003;103:1029-1038.
- [81] Khan NA, Auranen M, Paetau I, *et al.* Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Mol Med.* 2014;6:721-731.
- [82] Marriage BJ, ClandininMT, Macdonald IM, *et al.* Cofactor treatment improves ATP synthetic capacity in patients with oxidative phosphorylation disorders. *Mol Genet Metab.* 2004;81:263-272.
- [83] Ogasahara S, Yorifuji S, Nishikawa Y, *et al.* Improvement of abnormal pyruvate metabolism and cardiac conduction defect with coenzyme Q10 in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology.* 1985;35:372-377.
- [84] Barbiroli B, Frassinetti C, Martinelli P, *et al.* Coenzyme Q10 improves mitochondrial respiration in patients with mitochondrial cytopathies. An in vivo study on brain and skeletal muscle by phosphorous magnetic resonance spectroscopy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1997;43:741-749.

- [85] Matthews PM, Ford B, Dandurand RJ, *et al.* Coenzyme Q10 with multiple vitamins is generally ineffective in treatment of mitochondrial disease. *Neurology*. 1993;43:884–90.
- [86] <http://www.mitopedia.org/terapie.php>
- [87] Bates MG, Newman JH, Jakovljevic DG, *et al.* Defining cardiac adaptations and safety of endurance training in patients with m.3243A>G-related mitochondrial disease. *Int J Cardiol*. 2013;168:3599-3608.
- [88] Taivassalo T, Gardner JL, Taylor RW, *et al.* Endurance training and detraining in mitochondrial myopathies due to single large-scale mtDNA deletions. *Brain*. 2006;129:3391-3401.
- [89] Murphy JL, Blakely EL, Schaefer AM, *et al.* Resistance training in patients with single, large-scale deletions of mitochondrial DNA. *Brain*. 2008;131:2832-2840.
- [90] Moggio M, Colombo I, Peverelli L, *et al.* Mitochondrial disease heterogeneity: a prognostic challenge. *Acta Myol*. 2014;33:86-93.
- [91] Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management. *Tex Heart Inst J*. 2013;40:385–394.
- [92] Limongelli G, Tome-Esteban M, Dejthevaporn C, *et al.* Prevalence and natural history of heart disease in adults with primary mitochondrial respiratory chain disease. *Eur J Heart Fail*. 2010;12:114–121.
- [93] Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, *et al.* Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics*. 2004;114:925–931.
- [94] Majamaa-Voltti K, Peuhkurinen K, Kortelainen ML, *et al.* Cardiac abnormalities in patients with mitochondrial DNA mutation 3243A.G. *BMC Cardiovasc Disord*. 2002;2:12.
- [95] Vydt TCG, de Coo RFM, Soliman OI, *et al.* Cardiac involvement in adults with m.3243A.G MELAS gene mutation. *Am J Cardiol*. 2007;99:264–269.
- [96] Bates MG, Hollingsworth KG, Newman JH, *et al.* Concentric hypertrophic remodelling and subendocardial dysfunction in mitochondrial DNA point mutation carriers. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2013;14:650-658.

- [97] Pastores G, Santorelli F, Shanske S, *et al.* Leigh syndrome and hypertrophic cardiomyopathy in an infant with a mitochondrial DNA point mutation (T8993G). *Am J Med Genet.*1994;50:265–271.
- [98] Taniike M, Fukushima H, Yanagihara I, *et al.* Mitochondrial tRNA(Ile) mutation in fatal cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;186:47–53.
- [99] Tanaka M, Ino H, Ohno K, *et al.* Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy. *Lancet.* 1990;336:1452.
- [100] Taylor RW, Giordano C, Davidson MM, *et al.* A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1786–1796.
- [101] Wahbi K, Larue S, Jardel C, *et al.* Cardiac involvement is frequent in patients with the m.8344A.G mutation of mitochondrial DNA. *Neurology.* 2010;74:674–677.
- [102] Okajima Y, Tanabe Y, Takayanagi M, *et al.* A follow up study of myocardial involvement in patients with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Heart.* 1998;80:292–295.
- [103] Stalder N, Yarol N, Tozzi P, *et al.* Mitochondrial A3243G mutation with manifestation of acute dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 2012;5:e1–e3.
- [104] Seibel P, Degoul F, Bonne G, *et al.* Genetic biochemical and pathophysiological characterization of a familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF). *J Neurol Sci.* 1991;105:217–224.
- [105] Ito T, Hattori K, Tanaka M, *et al.* Mitochondrial cytopathy. *Jpn Circ J.* 1990;54:1214–1220.
- [106] Anan R, Nakagawa M, Miyata M, *et al.* Cardiac involvement in mitochondrial diseases. A study on 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. *Circulation.* 1995;91:955–961.
- [107] Santorelli FM, Tanji K, Manta P, *et al.* Maternally inherited cardiomyopathy: an atypical presentation of the mtDNA 12S rRNA gene A1555G mutation. *Am J Hum Genet.* 1999;64:295–300.
- [108] Thebault C, Ollivier R, Leurent G, *et al.* Mitochondriopathy: a rare aetiology of restrictive cardiomyopathy. *Eur J Echocardiogr.* 2008;9:840–845.

- [109] Tang S, Batra A, Zhang Y, *et al.* Left ventricular noncompaction is associated with mutations in the mitochondrial genome. *Mitochondrion*. 2010;10:350–357.
- [110] Vallance HD, Jeven G, Wallace DC, *et al.* A case of sporadic infantile histiocytoid cardiomyopathy caused by the A8344G (MERRF) mitochondrial DNA mutation. *Pediatric Cardiology*. 2004;25:538–540.
- [111] Finsterer J. Histiocytoid cardiomyopathy: a mitochondrial disorder. *Clin Cardiol*. 2008;31:225-227.
- [112] Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, *et al.* Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1362-1369.
- [113] Giordano C, Perli E, Orlandi M, *et al.* Cardiomyopathies due to homoplasmic mitochondrial tRNA mutations: morphologic and molecular features. *Hum Pathol*. 2013;44:1262-1270.
- [114] Florian A, Ludwig A, Stubbe-Dräger B, *et al.* Characteristic cardiac phenotypes are detected by cardiovascular magnetic resonance in patients with different clinical phenotypes and genotypes of mitochondrial myopathy. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2015;17:40.
- [115] Hirano M, DiMauro S. Clinical features of mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. In: Lane RJM ed. *Handbook of Muscle Disease*. New York: Marcel Dekker Inc; 1996, p479–504.
- [116] Tveskov C, Angelo-Nielsen K. Kearns-Sayre syndrome and dilated cardiomyopathy. *Neurology*. 1990;40:553–554.
- [117] Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA, *et al.* ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:e1–62.
- [118] Nikoskelainen E, Savontaus M, Huoponen K, *et al.* Pre-excitation syndrome in Leber's hereditary optic neuropathy. *Lancet*. 1994;344:857–858.
- [119] Sproule DM, Kaufman P, Engelstad K, *et al.* Wolff-Parkinson-White syndrome in patients with MELAS. *Arch Neurol*. 2007;64:1625–1627.

- [120] Oginosawa Y, Abe H, Nagatomo T, *et al.* Sustained polymorphic ventricular tachycardia unassociated with QT prolongation or bradycardia in the Kearns-Sayre syndrome. *Pac Clin Electrophysiol.* 2003;26:1911–1912.
- [121] Karanikis P, Korantzopoulos P, Kountouris E, *et al.* Kearns-Sayre syndrome associated with trifascicular block and QT prolongation. *Int J Cardiol.* 2005;101:147–150.
- [122] Holmgren D, Wahlander H, Eriksson B, *et al.* Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease; clinical course and cardiological findings. *Eur Heart J.* 2003;24:280–288.
- [123] Szeto HH. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol.* 2014;171:2029-2050.
- [124] Chakrabarti AK, Feeney K, Abueg C, *et al.* Rationale and design of the EMBRACE STEMI study: a phase 2a, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, tolerability and efficacy of intravenous Bendavia on reperfusion injury in patients treated with standard therapy including primary percutaneous coronary intervention and stenting for ST-segment elevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2013;165:509-514.
- [125] Packer M. How should physicians view heart failure? The philosophical and physiological evolution of three conceptual models of the disease. *Am J Cardiol.* 1993;71:3C-11C.
- [126] Massie BM. 15 years of heart-failure trials: what have we learned? *Lancet.* 1998;352(suppl 1):29-33.
- [127] Currie PJ, Kelly MJ, McKenzie A, *et al.* Oral beta-adrenergic blockade with metoprolol in chronic severe dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1984;3:203-209.
- [128] Ikram H, Fitzpatrick D. Double-blind trial of chronic oral beta blockade in congestive cardiomyopathy. *Lancet.* 1981;2:490-493.
- [129] Foulst JM, Tavolaro O, Antony I, *et al.* Coronary vasodilation induced by intracoronary enalaprilat: an argument for the role of a local renin-angiotensin system in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 1989;10(suppl F):97-100.
- [130] Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1992;20:248-254.

- [131] Bristow MR. The adrenergic nervous system in heart failure. *N Engl J Med.* 1984;311:850-1.
- [132] Mann DL, Kent RL, Parsons B, *et al.* Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation.* 1992;85:790-804.
- [133] Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, *et al.* Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1984;311:819-823.
- [134] Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation.* 2005;111:2837-49.
- [135] Kawano H, Do YS, Kawano Y, *et al.* Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation.* 2000;101:1130-7.
- [136] Delcayre C, Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:1577-84.
- [137] Doehner W, Frenneaux M, Anker SD. Metabolic impairment in heart failure: the myocardial and systemic perspective. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64:1388-1400.
- [138] Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14:58-74.
- [139] Coats AJ, Clark AL, Piepoli M, *et al.* Symptoms and quality of life in heart failure: the muscle hypothesis. *Br Heart J.* 1994;72:S36-39.
- [140] Piepoli M, Clark AL, Volterrani M, *et al.* Contribution of muscle afferents to the hemodynamic, autonomic, and ventilatory responses to exercise in patients with chronic heart failure: effects of physical training. *Circulation.* 1996;93:940-52.
- [141] Alam M, Smirk FH. Observations in man upon a blood pressure raising reflex arising from the voluntary muscles. *J Physiol.* 1937;89:372-383.
- [142] Nobrega AC, O'Leary D, Silva BM, *et al.* Neural regulation of cardiovascular response to exercise: role of central command and peripheral afferents. *Biomed Res Int.* 2014;2014:478965.
- [143] Kaufman MP, Longhurst JC, Rybicki KJ, *et al.* Effects of static muscular contraction on impulse activity of groups III and IV afferents in cats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1983;55:105-112.

- [144] Scott AC, Francis DP, Coats AJ, *et al.* Reproducibility of the measurement of the muscle ergoreflex activity in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2003;5:453-461.
- [145] Murphy MN, Mizuno M, Mitchell JH, *et al.* Cardiovascular regulation by skeletal muscle reflexes in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301:H1191-204.
- [146] Kniffki KD, Mense S, Schmidt RF. Responses of group IV afferent units from skeletal muscle to stretch, contraction and chemical stimulation. *Exp Brain Res.* 1978;31:511-522.
- [147] Mense S, Stahnke M. Responses in muscle afferent fibres of slow conduction velocity to contractions and ischaemia in the cat. *J Physiol.* 1983;342:383-397.
- [148] Matsukawa K, Wall PT, Wilson LB, *et al.* Reflex stimulation of cardiac sympathetic nerve activity during static muscle contraction in cats. *Am J Physiol.* 1994;267:H821-7.
- [149] Mitchell JH, Kaufman MP, Iwamoto GA. The exercise pressor reflex: its cardiovascular effects, afferent mechanisms, and central pathways. *Annu Rev Physiol.* 1983;45:229-42.
- [150] Piepoli MF, Crisafulli A. Pathophysiology of human heart failure: importance of skeletal muscle myopathy and reflexes. *Exp Physiol.* 2014;99:609-615.
- [151] Piepoli M, Coats AJS. Skeletal muscle ergoreflex: a possible role in the ventilatory control [abstract]. *Circulation.* 1992;86:1-368.
- [152] Piepoli MF, Coats AJS. The 'skeletal muscle hypothesis in heart failure' revised. *Eur Heart J.* 2013;34:486-488.
- [153] Piepoli MF, Coats AJ. Increased metaboreceptor stimulation explains the exaggerated exercise pressor reflex seen in heart failure. *J Appl Physiol* (1985). 2007;102:494-496.
- [154] Middlekauff HR, Sinoway LI. Increased mechanoreceptor stimulation explains the exaggerated exercise pressor reflex seen in heart failure. *J Appl Physiol* (1985). 2007;102:492-494.
- [155] Hooper RG, Thomas AR, Kearl RA. Mitochondrial enzyme deficiency causing exercise limitation in normal-appearing adults. *Chest.* 1995;107:317-322.

- [156] Flaherty KR, Wald J, Weisman IM, *et al.* Unexplained exertional limitation: characterization of patients with a mitochondrial myopathy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:425-432.
- [157] Momiyama Y, Suzuki Y, Ohtomo M, *et al.* Cardiac autonomic nervous dysfunction in diabetic patients with a mitochondrial DNA mutation: assessment by heart rate variability. *Diabetes Care.* 2002;25:2308-2313.
- [158] Smith SA, Downey RM, Williamson JW, *et al.* Autonomic dysfunction in muscular dystrophy: a theoretical framework for muscle reflex involvement. *Front Physiol.* 2014;5:47.
- [159] Heinicke K, Taivassalo T, Wyrick P, *et al.* Exertional dyspnea in mitochondrial myopathy: clinical features and physiological mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301:R873-R884.
- [160] Taivassalo T, Jensen TD, Kennaway N, *et al.* The spectrum of exercise tolerance in mitochondrial myopathies: a study of 40 patients. *Brain.* 2003;126:413-423.
- [161] Mancuso M, Orsucci D, Coppedè F, *et al.* Diagnostic approach to mitochondrial disorders: the need for a reliable biomarker. *Curr Mol Med.* 2009;9:1095-1107.
- [162] Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, *et al.* Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015;16:233-270.
- [163] Barison A, Masci PG, Aquaro GD. CMR-based characterization of cardiac amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2014;7:1067-1068.
- [164] Schmidt H, Francis PD, Rauchhaus M, *et al.* Chemo- and ergoreflexes in health, disease and ageing. *Int J Cardiol.* 2005;98:369-78.
- [165] Passino C, Severino S, Poletti R, *et al.* Aerobic training decreases B-type natriuretic peptide expression and adrenergic activation in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:1835-1839.
- [166] Borg GA. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc.* 1982;14:377-381.
- [167] Pastormerlo LE, Agazio A, Benelli E, *et al.* Usefulness of high-sensitive troponin elevation after effort stress to unveil vulnerable myocardium in patients with heart failure. *Am J Cardiol.* (article in press).

- [168] Baldi S, Miniati M, Bellina CR, *et al.* Relationship between extent of pulmonary emphysema by high-resolution computed tomography and lung elastic recoil in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:585-589.
- [169] Thornton AT, Singh P, Ruehland WR, *et al.* AASM criteria for scoring respiratory events: interaction between apnea sensor and hypopnea definition. *Sleep.* 2012;35:425-432.
- [170] Efken C, Bitter T, Prib N, *et al.* Obstructive sleep apnoea: longer respiratory event lengths in patients with heart failure. *Eur Respir J.* 2013;41:1340-1346.
- [171] Giannoni A, Emdin M, Bramanti F, *et al.* Combined increased chemosensitivity to hypoxia and hypercapnia as a prognosticator in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:1975-1980.
- [172] Bernardi L, De Barbieri G, Rosengard-Barlund M, *et al.* New method to measure and improve consistency of baroreflex sensitivity values. *Clin Auton Res.* 2010;20:353-361.
- [173] Mirizzi G, Giannoni A, Bramanti F, *et al.* A simple method for measuring baroreflex sensitivity holds prognostic value in heart failure. *Int J Cardiol.* 2013;169:e9-e11.
- [174] Lauer MS, Francis GS, Okin PM, *et al.* Impaired chronotropic response to exercise stress testing as a predictor of mortality. *JAMA.* 1999;281:524-529.
- [175] Krintus M, Kozinski M, Boudry P, *et al.* European multicenter analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT STAT high sensitive troponin I immunoassay. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52:1657-1665.
- [176] Kavsak PA, MacRae AR, Yerna MJ, *et al.* Analytic and clinical utility of a next-generation, highly sensitive cardiac troponin I assay for early detection of myocardial injury. *Clin Chem.* 2009;55:573-577.
- [177] Gaze DC, Prante C, Dreier J, *et al.* Analytical evaluation of the automated galectin-3 assay on the Abbott ARCHITECT immunoassay instruments. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52:919-926.
- [178] La'ulu SL, Apple FS, Murakami MM, *et al.* Performance characteristics of the ARCHITECT Galectin-3 assay. *Clin Biochem.* 2013;46:119-122.

- [179] Clerico A, Del Chicca MG, Zucchelli GC, *et al.* Performance of a fully automated fluorometric enzyme immunoassay for serum myoglobin measurement. *J Nucl Biol Med.* 1993;37:83-87.
- [180] Zucchelli GC, Malvano R, Buzzigoli G, *et al.* Radioimmunoassay of acute myocardial infarction markers (myoglobin, creatine kinase MB and lactate dehydrogenase H4). *J Nucl Med Allied Sci.* 1978;22:147-151.
- [181] Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, *et al.* Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr.* 2009; 10:165-193.
- [182] Lilli A, Baratto MT, Del Meglio J, *et al.* Three-dimensional simultaneous strain-volume analysis describes left ventricular remodelling and its progression: a pilot study. *Eur J Echocardiogr.* 2011;12:520-527.
- [183] Baltabaeva A, Marciniak M, Bijnens B, *et al.* Regional left ventricular deformation and geometry analysis provides insights in myocardial remodelling in mild to moderate hypertension. *Eur J Echocardiogr.* 2008;9:501-508.
- [184] Maceira AM, Prasad SK, Khan M, *et al.* Normalized left ventricular systolic and diastolic function by steady state free precession cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2006 ;8 ;417-426.
- [185] Maceira AM, Prasad SK, Khan M, *et al.* Reference right ventricular systolic and diastolic function normalized to age, gender and body surface area from steady-state free precession cardiovascular magnetic resonance. *Eur Heart J.* 2006;27:2879-2888
- [186] Barison A, Gargani L, De Marchi D, *et al.* Early myocardial and skeletal muscle interstitial remodelling in systemic sclerosis: insights from extracellular volume quantification using cardiovascular magnetic resonance. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015;16;74-80.
- [187] American Thoracic Society. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144:1202-1218.
- [188] Di Rienzo M, Mancia G, Parati G, Pedotti A, Zanchetti A eds. Blood pressure and heart rate variability. Computer analysis, methodology and clinical applications. Amsterdam: IOS Press, 1993, pp. 275.

- [189] Kemp GJ, Radda GK. Quantitative interpretation of bioenergetic data from ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: an analytical review. *Magn Reson Q.* 1994;10:43-63.
- [190] Guazzi M, Adams V, Conraads V, *et al.* EACPR/AHA Scientific Statement. Clinical recommendations for cardiopulmonary exercise testing data assessment in specific patient populations. *Circulation.* 2012;126:2261-2274.
- [191] Brubaker PH, Kitzman DW. Chronotropic incompetence: causes, consequences, and management. *Circulation.* 2011;123:1010-1020.
- [192] Lombardi F, Malliani A, Pagani M, *et al.* Heart rate variability and its sympatho-vagal modulation. *Cardiovasc Res.* 1996;32:208-216.
- [193] Milicević G. Low to high frequency ratio of heart rate variability spectra fails to describe sympatho-vagal balance in cardiac patients. *Coll Antropol.* 2005;29:295-300.
- [194] Billman GE. The LF/HF ratio does not accurately measure cardiac sympatho-vagal balance. *Front Physiol.* 2013;4:26.
- [195] Parati G, di Rienzo M, Castiglioni P, *et al.* Point:counterpoint: cardiovascular variability is/is not an index of autonomic control of circulation. *J Appl Physiol.* 2006;101:676-682.
- [196] Hartwich D, Dear WE, Waterfall JL, *et al.* Effect of muscle metaboreflex activation on spontaneous cardiac baroreflex sensitivity during exercise in humans. *J Physiol.* 2011;589:6157-6171.
- [197] Sala-Mercado JA, Ichinose M, Hammond RL, *et al.* Muscle metaboreflex attenuates spontaneous heart rate baroreflex sensitivity during dynamic exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H2867-2873.
- [198] Passino C, Barison A, Vergaro G, *et al.* Markers of fibrosis, inflammation, and remodeling pathways in heart failure. *Clin Chim Acta.* 2015;443:29-38.
- [199] Vergaro G, Del Franco A, Giannoni A, *et al.* Galectin-3 and myocardial fibrosis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2015;184:96-100.
- [200] Rittoo D, Jones A, Lecky B, *et al.* Elevation of cardiac troponin T, but not cardiac troponin I, in patients with neuromuscular diseases: implications for the diagnosis of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:2411-2420.

- [201] Anderson PAW, Malouf NN, Oakeley AE, *et al.* Troponin T isoform expression in humans: a comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ Res.* 1991;69:1226–33.
- [202] Sabry MA, Dhoot GK. Identification of and pattern of transitions of cardiac, adult slow and slow skeletal muscle-like embryonic isoforms of troponin T in developing rat and human skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil.* 1991;12:262–70.
- [203] Bodor GS, Survant L, Voss EM, *et al.* Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle. *Clin Chem.* 1997;43:476–84.
- [204] Ricchiuti V, Apple FS. RNA expression of cardiac troponin T isoforms in diseased human skeletal muscle. *Clin Chem.* 1999;45:2129–35.
- [205] Piepoli MF, Scott AC, Capucci A, *et al.* Skeletal muscle training in chronic heart failure. *Acta Physiol Scand.* 2001;171:295-303.
- [206] Coats AJ, Adamopoulos S, Meyer TE, *et al.* Effects of physical training in chronic heart failure. *Lancet.* 1990;335:63-66.
- [207] Coats AJ, Adamopoulos S, Radaelli A, *et al.* Controlled trial of physical training in chronic heart failure. Exercise performance, hemodynamics, ventilation, and autonomic function. *Circulation.* 1992;85:2119-2131.
- [208] Belardinelli R, Georgiou D, Scocco V, *et al.* Low intensity exercise training in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26:975-982.
- [209] Radaelli A, Coats AJ, Leuzzi S, *et al.* Physical training enhances sympathetic and parasympathetic control of heart rate and peripheral vessels in chronic heart failure. *Clin Sci (Lond).* 1996;91 Suppl:92-94.
- [210] Hambrecht R, Gielen S, Linke A, *et al.* Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. *JAMA.* 2000;283:3095-3101.
- [211] Piepoli MF, Davos C, Francis DP, *et al.* Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ.* 2004;328:189.
- [212] Piepoli MF. Exercise training in chronic heart failure: mechanisms and therapies. *Neth Heart J.* 2013;21:85-90.
- [213] Wang HJ, Li YL, Zucker IH, *et al.* Exercise training prevents skeletal muscle afferent sensitization in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;302:R1260-1270.

- [214] Antunes-Correa LM, Nobre TS, Groehs RV, *et al.* Molecular basis for the improvement in muscle metaboreflex and mechanoreflex control in exercise-trained humans with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307:H1655-66.
- [215] Murphy JL, Blakely EL, Schaefer AM, *et al.* Resistance training in patients with single, large-scale deletions of mitochondrial DNA. *Brain.* 2008;131:2832-2840.
- [216] Piepoli MF, Kaczmarek A, Francis DP, *et al.* Reduced peripheral skeletal muscle mass and abnormal reflex physiology in chronic heart failure. *Circulation.* 2006;114:126-134.
- [217] Piepoli MF, Dimopoulos K, Concu A, *et al.* Cardiovascular and ventilatory control during exercise in chronic heart failure: role of muscle reflexes. *Int J Cardiol.* 2008;130:3-10.