

**UNIVERSITÀ DI PISA**



Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E CHIRURGIA**

TESI DI LAUREA

**La dimensione “fatica muscolare” nel Registro Nazionale  
per la Distrofia Miotonica di Steinert: risultati  
di un protocollo di studio**

***RELATORE***

Chiar.mo Prof. Gabriele Siciliano

***CANDIDATO***

Marina Bottari

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

## INDICE GENERALE

1. RIASSUNTO DELLA TESI.....	3
2. INTRODUZIONE.....	7
2.1. Le Distrofie Muscolari.....	7
2.2. Le Distrofie Miotoniche tipo 1 e tipo 2: generalità.....	8
2.3. La Malattia di Steinert: epidemiologia.....	9
2.3.1. Basi genetiche.....	9
2.3.2. Meccanismi patogenetici.....	11
2.3.3. Et� d'esordio e forme cliniche.....	15
2.3.4. Forma classica: manifestazioni cliniche.....	17
• Fenomeno miotonico e interessamento della muscolatura scheletrica.....	18
• Interessamento multisistemico.....	21
2.3.5. Aspetti neuropsicologici.....	24
2.3.6. Approccio diagnostico.....	26
2.3.7. Gestione terapeutica.....	28
2.4. La fatica muscolare.....	30
2.4.1. Il concetto di Fatica.....	30
2.4.2. La fatica nelle malattie neuromuscolari.....	33
2.4.3. Meccanismi fisiopatologici.....	34
2.4.4. Componenti Centrali e Periferiche della Fatica nella DM1.....	38
2.5. Creazione di un Registro Nazionale di malattia.....	40
3. OBIETTIVI E DISEGNO DELLO STUDIO.....	42
4. MATERIALI E METODI.....	43
4.1. Reclutamento pazienti.....	43
4.2. Protocollo di studio.....	43
• Valutazione clinica e Questionari.....	43
• Protocollo di esercizio muscolare.....	46

4.3. Valutazione di parametri biochimici.....	47
• Dosaggio plasmatico dell'acido lattico.....	47
• Dosaggio plasmatico dei Prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP).....	47
• Dosaggio plasmatico della Attività ferro-riducente del plasma (FRAP).....	48
• Dosaggio plasmatico dei Gruppi tiolici plasmatici totali (-SH).....	49
4.4. Analisi Statistica dei risultati.....	49
5. RISULTATI.....	50
5.1. Valutazione della Qualità di Vita.....	52
5.2. Valutazione della percezione soggettiva di fatica muscolare mediante l'utilizzo della scala clinica FSS-Fatigue Severity Scale.....	53
5.3. Valutazione della percezione soggettiva della sonnolenza diurna mediante l'utilizzo della scala clinica ESS-Epworth Sleepiness Scale.....	56
5.4. Test da sforzo muscolare con "hand-grip".....	57
5.5. Parametri biochimici: acido lattico e markers di stress ossidativo.....	59
6. DISCUSSIONE .....	62
• Valutazione soggettiva della dimensione "fatica muscolare".....	63
• Valutazione oggettiva della fatica muscolare mediante il protocollo di esercizio.....	66
7. CONCLUSIONI.....	72
8. BIBLIOGRAFIA.....	73
RINGRAZIAMENTI.....	81

## 1. RIASSUNTO DELLA TESI

**Introduzione.** La Distrofia Miotonica di tipo 1 (DM1) è la più comune forma di distrofia muscolare dell'età adulta. È una malattia geneticamente determinata, ad ereditarietà autosomica dominante. Nel 1992 è stata identificata la mutazione responsabile della malattia che consiste in un'abnorme ripetizione di una tripletta trinucleotidica citosina-timina-guanina (CTG) a livello della regione non codificante 3' del gene *DMPK*, localizzato sul cromosoma 19q13.3. Il gene coinvolto codifica per una proteina chinasi denominata Myotonic Dystrophy Protein Kinase (DMPK) la cui funzione non è ancora ad oggi del tutto nota.

Sono state formulate diverse ipotesi alla base della patogenesi della DM1, quali la teoria dell'aploinsufficienza della DMPK, una alterazione dell'espressione di geni limitrofi al *DMPK*, lo stress ossidativo, l'accumulo tossico intranucleare di trascritti RNA non tradotti. Ad oggi, la principale ipotesi molecolare alla base della malattia prevede che ripetizioni instabili espanse determinino una alterazione del metabolismo dell'mRNA e considera la DM1 come una patologia da "tossicità dell'RNA". Da un punto di vista clinico, la malattia, che può esordire sia in età pediatrica che in età giovane-adulta, si caratterizza, oltre che per l'interessamento muscolare con atrofia e debolezza associate a miotonia, per un coinvolgimento multisistemico comprendente aspetti cardiaci, respiratori, gastrointestinali, oculari, interessamento del sistema nervoso centrale (SNC), endocrino-metabolico e/o riproduttivo, nel tempo responsabile di disabilità crescenti e conseguenze sociali secondarie. È ben noto inoltre che i pazienti affetti da DM1 presentano spesso disturbi neuropsicologici e comorbidità psichiatriche tra cui una ridotta consapevolezza di malattia e della sua progressione (anosognosia), che può portare ad una falsa attribuzione secondaria di sintomi, ritardi in procedure diagnostiche importanti e bassa compliance al trattamento.

Tra le varie manifestazioni cliniche di questa complessa patologia neuromuscolare, la maggior parte dei pazienti con DM1 lamentano, fin dall'esordio, una precoce fatica muscolare, che può essere definita come l'incapacità di mantenere il livello atteso di performance motoria nel tempo. Sia il muscolo scheletrico che il SNC possono essere coinvolti in modo indipendente nella DM1, di conseguenza due forme distinte di fatica sono possibili in questa malattia: una fatica "centrale" secondaria ad atrofia corticale e a lesioni della sostanza bianca, e una fatica "periferica" causata da atrofia delle fibre muscolari. Queste due componenti della fatica possono concomitare ed essere variamente espresse nei pazienti miotonici.

**Obiettivi.** Nell'ambito del progetto multicentrico finalizzato alla creazione di un Registro Nazionale di malattia per le distrofie miotoniche sul territorio italiano, che vedrà coinvolto anche il Centro per le Malattie Muscolari della Clinica Neurologica di Pisa, l'obiettivo della presente tesi è stato quello di definire un protocollo per la caratterizzazione clinica e funzionale della fatica muscolare nei pazienti affetti da DM1.

**Disegno dello studio.** Sono stati inclusi nello studio 26 soggetti con diagnosi clinica e genetica di DM1, 17 maschi (età media in anni  $\pm$  deviazione standard:  $40,53 \pm 14,69$ ) e 9 femmine (età media in anni  $\pm$  deviazione standard:  $43,78 \pm 11,37$ ), seguiti presso l'Ambulatorio per le Malattie Neuromuscolari della Clinica Neurologica di Pisa. Ai pazienti sono stati somministrati questionari per una valutazione della esperienza soggettiva di fatica muscolare, quali 1) INQoL - Individualized Neuromuscular Quality Of Life, questionario clinico standardizzato formulato per determinare come e quanto il disturbo muscolare condizioni la vita del paziente (in particolare, di nostro interesse sono state i domini di Debolezza e Fatica); 2) FSS - Fatigue Severity Scale, scala clinica che permette una valutazione della severità della fatica muscolare percepita; 3) ESS - Epworth Sleepiness Scale, scala di valutazione della sonnolenza diurna come possibile fattore concomitante al sintomo fatica muscolare.

Al fine di valutare in modo oggettivo la dimensione fatica muscolare, ai pazienti è stato proposto un test da sforzo intermittente dei muscoli dell'avambraccio, a carico incrementale, eseguito con l'ausilio di un miometro connesso ad un "hand-grip". Il protocollo ha previsto per ciascun paziente la determinazione del livello di Contrazione Volontaria Massimale (CVM), sia in condizioni basali che al termine dell'esercizio muscolare. I pazienti sono stati inoltre sottoposti a prelievi ematici venosi dalle vene antecubitali del braccio in condizioni basali e al termine del protocollo di esercizio per la determinazione dei seguenti parametri biochimici: acido lattico e markers di stress ossidativo quali prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP), capacità ferro-riducente del plasma (FRAP) e tioli plasmatici totali (-SH).

### **Risultati.**

*Valutazione soggettiva della dimensione "fatica muscolare".*

Per quanto riguarda la valutazione della qualità di vita, nonostante la disabilità motoria ed il coinvolgimento multisistemico, i pazienti con DM1 riferiscono un moderato impatto della malattia sulla loro vita quotidiana. Tra le scale prescelte, la FSS è risultata sensibile nel rilevare la percezione di fatica da parte dei pazienti. La percezione soggettiva di fatica muscolare si correla con parametri oggettivi di affaticamento muscolare durante il test da

sforzo e con il grado di disabilità motoria. L'analisi di correlazione tra la fatica percepita, misurata tramite scala FSS, e la sonnolenza diurna, misurata tramite scala ESS, è risultata invece non significativa: si ipotizza che alcuni fattori interferenti, come la possibile anosognosia dei pazienti, possano aver interferito con l'affidabilità delle risposte ai questionari, non consentendo di quantificare correttamente il fenomeno della sonnolenza diurna. D'altra parte, fatica muscolare e sonnolenza diurna hanno caratteristiche che spesso si sovrappongono, di conseguenza i pazienti possono avere difficoltà a distinguerle, e gli strumenti clinici possono non essere sempre sensibili a discriminarle.

*Valutazione oggettiva della fatica muscolare mediante il protocollo di esercizio.*

In tutti i pazienti che hanno eseguito lo sforzo muscolare il protocollo di esercizio ha permesso di raggiungere la soglia anaerobica come dimostrato dall'incremento dei valori di acido lattico. Questo tipo di esercizio è principalmente aerobico all'inizio del test e diviene progressivamente anaerobico man mano che aumenta la forza esercitata per progressivo reclutamento delle unità motorie rapide. Una forte tendenza alla significatività statistica, probabilmente non raggiunta per il numero esiguo di pazienti analizzati, si è osservata nella correlazione tra FSS totale e valore medio basale di acido lattico: all'aumentare dei valori basali di lattato, i pazienti in studio riferivano una maggiore fatica percepita (scala FSS). Si ipotizza che questo possa essere ricondotto al fatto che i pazienti affetti da DM1, con stile di vita più sedentario a causa della malattia muscolare, abbiano un metabolismo mitocondriale compromesso, con precoce attivazione del metabolismo anaerobico. L'analisi della forza muscolare al termine del test da sforzo ha dimostrato un decremento statisticamente significativo della CVM ( $\Delta$  CVM), indicativo di un processo di effettivo affaticamento muscolare. Come atteso, l'analisi statistica ha rilevato una correlazione tra valori di CVM (sia pre-test sia post-test) e la percezione soggettiva di fatica: pazienti con valori di forza massimali più bassi riferivano maggiore senso di fatica muscolare.

*Valutazione dei parametri di stress ossidativo.* L'analisi ha documentato in media un incremento statisticamente significativo ( $p=0.0002$ ) dei livelli plasmatici basali degli AOPP nei pazienti DM1 vs controlli, indicativo di una aumentata condizione di stress ossidativo. Al contrario, in condizioni di riposo, non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nei livelli medi plasmatici di FRAP e Tioli tra pazienti DM1 e controlli. La mancanza di differenze statisticamente significative tra i livelli degli antiossidanti non enzimatici dei pazienti rispetto ai controlli potrebbe dipendere dal fatto che i pazienti affetti da DM1 presentano una eccessiva produzione di specie reattive

dell'ossigeno (ROS) con conseguente incremento del danno ossidativo (documentata dai livelli basali di AOPP più elevati nei pazienti rispetto ai controlli sani). Al 60% della CVM, i parametri di stress ossidativo non variano in modo statisticamente significativo rispetto ai valori basali nei pazienti testati. Probabilmente la durata del protocollo di esercizio non è risultata sufficiente ad attivare la via biochimica che induce un danneggiamento delle proteine da parte dei ROS così come un aumento dei meccanismi di difesa antiossidante.

**Conclusioni.** La presente tesi ha portato alla definizione di un protocollo per la caratterizzazione clinica e funzionale della fatica muscolare nei pazienti affetti da DM1 e l'impatto che tale disturbo può avere sulla qualità di vita. Il test di esercizio muscolare con miometro ha permesso di analizzare parametri biometrici e biochimici connessi alla contrazione muscolare e al fenomeno della fatica, fornendo un profilo oggettivo di quest'ultimo, confrontabile con le scale soggettive di valutazione clinica. Nello specifico, il suddetto protocollo è stato in grado di correlare in modo statisticamente significativo la percezione soggettiva di fatica con il dato oggettivo di compromissione della forza muscolare quale evento correlato all'affaticamento, mentre non sono state rilevate correlazioni né con il livello ematico dell'acido lattico, quale marcatore metabolico, né con i parametri biochimici di stress ossidativo prima e dopo lo sforzo. Sebbene si renderà necessario un ulteriore processo di validazione che includa l'analisi della variabilità intra- e inter-osservatore e su una più ampia casistica, il protocollo di fatica utilizzato si propone quale utile strumento di valutazione della dimensione clinimetrica della "fatica muscolare" nei pazienti affetti da distrofia miotonica di Steinert, da inserire tra i parametri clinico-funzionali nell'ambito di un Registro Nazionale, da applicare nella definizione della storia naturale di malattia e di misure di "outcome" sensibili e riproducibili, in vista di interventi terapeutici nei vari ambiti, neuropsicologico, riabilitativo e farmacologico.

## 2. INTRODUZIONE

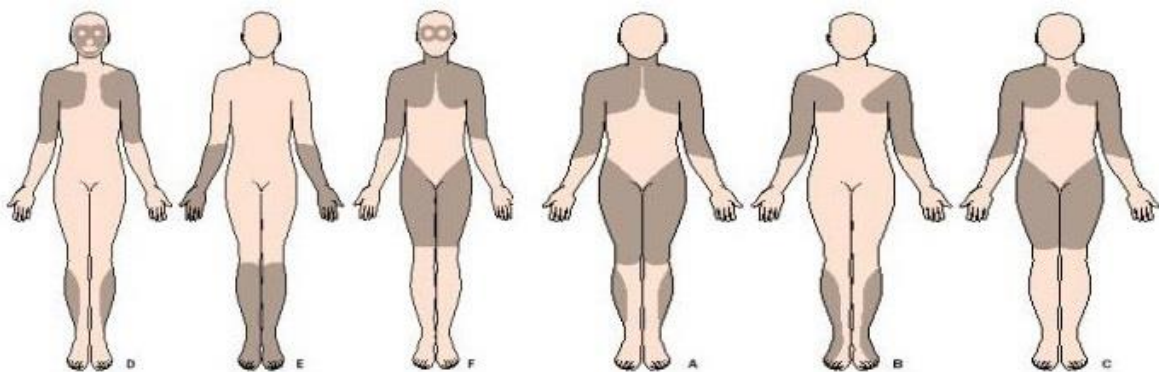
### 2.1. Le Distrofie Muscolari

Le *Distrofie Muscolari* possono essere definite come un gruppo di miopatie ereditarie geneticamente determinate, progressive, caratterizzate da un progressivo deficit di forza e trofismo muscolare, sulla base di un processo degenerativo primario del tessuto muscolare scheletrico.

Ogni tipo di distrofia muscolare ha fenotipo clinico e caratteristiche genetiche unici. I sintomi mostrano alta variabilità all'interno delle diverse tipologie di distrofia muscolare, includendo difficoltà nella deambulazione, frequenti cadute, disabilità motorie, difetti cardiaci ed eventi avversi respiratori.

Le principali forme di distrofie muscolari sono rappresentate dalle distrofinopatie, la distrofia di Emery-Dreyfuss, la distrofia facio-scapolo-omerale, la distrofia dei cingoli, la distrofia oculofaringea e la distrofia miotonica.

Sulla base della distribuzione predominante della muscolatura interessata, possono essere distinte le forme maggiori di distrofia muscolare, con l'aggiunta delle forme congenite di distrofia, nelle quali la debolezza muscolare è più generalizzata (Fig. 1).



**Figura 1.** Distribuzione predominante della debolezza muscolare nelle differenti forme di distrofia: A. distrofia di Duchenne; B. Emery-Dreyfuss; C. distrofia dei cingoli; D. facioscapolomereale; E. distale; F. oculofaringea.



## 2.2. Le Distrofie Miotoniche tipo 1 e tipo 2: generalità

Le distrofie miotoniche sono malattie genetiche multisistemiche che colpiscono prevalentemente il muscolo scheletrico e – in varia misura secondo le forme – quello cardiaco (difetti di conduzione, aritmie, cardiomiopatia dilatativa), il corpo vitreo dell'occhio (cataratta), le ghiandole sessuali (atrofia delle gonadi, sterilità), il sistema endocrino (ipotiroidismo, diabete), il muscolo liscio (disturbi gastrici, stitichezza) e il sistema nervoso centrale (ritardo intellettivo, alterazioni comportamentali).

Negli anni le Distrofie Miotoniche sono state l'oggetto di ampie ricerche per le loro importanti e varie manifestazioni cliniche e per l'interessante biologia molecolare. La progressiva degenerazione muscolare conduce a ipostenia e atrofia muscolare associate a miotonia; queste manifestazioni muscolari, in combinazione con un interessamento multiorgano, rappresentano le principali caratteristiche cliniche della distrofia miotonica



**Figura 2:** Hans Steinert, medico tedesco.

tipo 1 e tipo 2.

Geneticamente sono state identificate due entità distinte: la prima, relativamente frequente, è definita Distrofia Miotonica di tipo 1 (o “Malattia di Steinert”), per la prima volta descritta clinicamente da Steinert più di cento anni fa (Fig. 2), ed è causata dal difetto nel gene della miotonina proteina kinasi (*DMPK*), localizzato sul cromosoma 19q13.3.

La seconda forma, più rara, è la Distrofia Miotonica di tipo 2 (originariamente definita come PROMM-PROximal Myotonic Myopathy, miopatia miotonica prossimale), dovuta ad una alterazione del gene della Zinc Finger Protein 9 (*ZNF9*), codificata dal cromosoma 3q21.3 [Udd & Krahe 2012].

Da quando nel 1994 è stato riconosciuto il 2° tipo di Distrofia Miotonica, grazie alla mappatura genetica del suo locus sul cromosoma 3q21.3, si possono incontrare i termini di Distrofia Miotonica tipo 1 e tipo 2, o le loro rispettive abbreviazioni DM1 e DM2 [Udd & Krahe 2012].

Espansioni ripetitive di triplette o quadriplete nucleotidiche (CTG per la DM1 e CCTG per la DM2) sono le mutazioni alla base di entrambe le forme di distrofia miotonica, le quali, nonostante le somiglianze cliniche e genetiche, rappresentano chiaramente due differenti malattie.

Gran parte dei pazienti è comunque affetta dalla più comune forma di tipo 1, a cui si fa riferimento in questa tesi se non specificato il tipo.

### 2.3. La Malattia di Steinert: epidemiologia

La Distrofia Miotonica tipo 1 rappresenta la forma più comune di distrofia muscolare nell'adulto. Si tratta di un disordine genetico raro, ereditario, a trasmissione autosomica dominante in cui, oltre all'interessamento muscolare caratterizzato da atrofia e debolezza muscolare associate a miotonia, sono presenti anomalie sistemiche comprendenti aspetti cardiaci, respiratori, gastrointestinali, oculari, coinvolgimento del sistema nervoso centrale, endocrino-metabolico e/o riproduttivo.

Si manifesta in egual misura nei due sessi.

L'incidenza di malattia è stimata approssimativamente intorno a 1 caso su 8000 nati vivi. È una delle malattie neuromuscolari più comuni [Siciliano et al. 2001]. La prevalenza è variabile nelle diverse aree geografiche: è stimata intorno ai 2-14 casi per 100.000 abitanti. Con 733 milioni di persone in Europa, si stima siano affette da DM1 circa 75.000 persone in Europa [van Engelen, OPTIMISTIC Consortium 2015]. Una alta prevalenza è stata riportata nel nord della Svezia, nella regione basca della Spagna e in Quebec, regione del Canada [Udd & Krahe 2012].

I dati in letteratura sono spesso sottostimati a causa del riscontro di pazienti paucisintomatici.

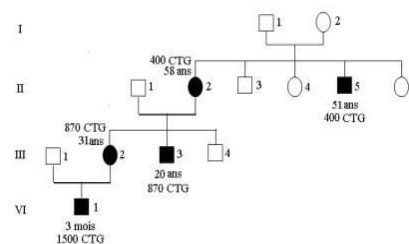
#### 2.3.1 Basi genetiche

La DM1 è una delle più comuni forme di distrofia muscolare.

È una malattia ereditaria che si trasmette con un meccanismo autosomico dominante: vengono cioè colpiti indistintamente maschi e femmine e ogni figlio di una persona affetta ha un rischio del 50% di essere a sua volta colpito dalla malattia (Fig. 3).

La mutazione responsabile della DM1 è stata identificata nel 1992 e ciò ha permesso di introdurre nella pratica clinica l'esame genetico molecolare, diagnostico per la forma di tipo 1. Il difetto genetico consiste nell'abnorme ripetizione instabile di una tripletta

trinucleotidica CTG (citosina-timina-guanina), definita amplificazione o espansione, a livello della regione 3' non tradotta di un gene localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19, nel locus 13.3 [Huang & Kuo 2005; Jorde et al. 2006; Finsterer et al. 2007].



**Figura 3:** albero genealogico (fenomeno dell'anticipazione genetica)

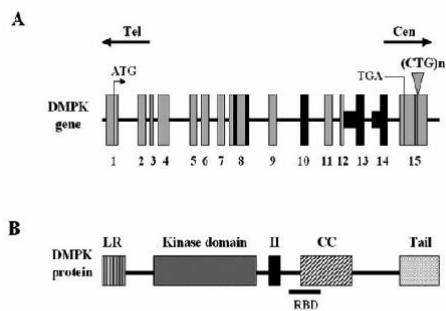


Fig. 4. A DMPK gene B DMPK protein. LR, leucine rich region, Kinase domain, II, substrate-specificity site, RBD, possible rho-binding domain, CC 'coiled-coil', subcellular localization domain (Moxid from Groenen GTA, Wansink DG, et al.)

Figura 4: A. gene DMPK; B. proteina DMPK

Il gene *DMPK* comprende 15 esoni, ha una grandezza di 14 Kb e codifica per una proteina di 629 aminoacidi, la quale mostra analogie con le protein-chinasi adenosin monofosfato (cAMP) dipendenti (Fig. 4). La proteina codificata dal gene coinvolto nella DM1, denominata DMPK (Myotonic Dystrophy Protein Kinase), è una serina-treonina chinasi, costituita da un dominio

catalitico di 43 kDa, seguito da una regione ad elica di 12 kDa e da una regione idrofobica, che sembra essere un dominio transmembrana nella regione C-terminale; questa proteina va incontro ad autofosforilazione ma, a differenza di altre protein chinasi come PKA e PKC, non è in grado di fosforilare altre proteine di membrana [Jansen et al. 1994]. DMPK sembra fosforilare, inibendone così l'azione, una miosina fosfatasi (MYPT1), portando così ad un aumento dei livelli di miosina fosforilata; ciò incrementa la sensibilità al calcio delle cellule muscolari lisce e porta ad alterazioni nel citoscheletro delle cellule non muscolari [Larkin & Fardaei 2001; Llagostera et al. 2007].

Mentre nella popolazione normale il numero di espansioni CTG varia da 5 a 37 volte, nei soggetti che presentano la malattia, possono ripetersi da alcune decine fino a migliaia di volte, compromettendo la funzione del gene e della proteina da esso codificata. E' stato visto che questo non riflette sempre la severità del quadro clinico: non sempre c'è una chiara correlazione tra fenotipo clinico e numero di triplette ripetute [Udd & Krahe 2012] poichè il grado di espansione del gene può variare nei diversi tessuti e organi. In generale, comunque, si ritiene che le espansioni ripetitive CTG più lunghe siano associate con un esordio di malattia più precoce e con una maggiore severità del quadro clinico.

I pazienti affetti da DM1 possono essere suddivisi in 3 classi di espansione in base al numero di triplette CTG ripetute:

- E1: 38-150 CTG
- E2: 150-1000 CTG
- E3: >1000 CTG

Le espansioni nel range tra 38 e 50 CTG sono considerate "premutazioni", mentre tra 51 e 100 CTG "protomutazioni": i soggetti portatori di tal numero di ripetizioni sono asintomatici o paucisintomatici (come cataratta in età precoce) e sono considerati a rischio di avere figli con sintomi conclamati.

Infatti, caratteristico delle malattie da espansione come la distrofia miotonica, è il “*fenomeno dell’anticipazione genetica*”: i figli dei soggetti affetti tendono ad avere un numero di ripetizioni maggiori dei genitori e a manifestare la malattia più precocemente e in forma più grave. Tale amplificazione intergenerazionale, dovuta alla peculiare instabilità del polinucleotide CTG, è indipendente dal sesso del genitore affetto e dalla lunghezza delle ripetizioni [The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC) 2000; Wong et al. 1995]. Sebbene sia gli alleli materni che quelli paterni vadano incontro ad espansione, la trasmissione per via paterna porta ad un incremento delle ripetizioni se la lunghezza delle triplette CTG trasmesse è inferiore a 100, mentre si osserva il solito meccanismo se le espansioni sono superiori a 500 per la trasmissione per via materna: ciò è dovuto ad una maggiore instabilità delle triplette di lunghezza ridotta nel sesso maschile, che, in seguito a piccoli incrementi nel numero delle ripetizioni iniziali, ancora nel range della normalità, può portare alla formazione di alleli alterati, e contribuire così a mantenere un serbatoio della mutazione DM1 nella popolazione [Savouret et al. 2004; Dean et al. 2006]. Il sesso del genitore che trasmette l’espansione risulta essere fondamentale però nel determinare la lunghezza delle ripetizioni trinucleotidiche CTG presenti nelle cellule germinali: classi di espansioni maggiori e maggiore gravità di malattia sono associate con la trasmissione per via materna.

Anche i casi di DM1 congenita, forma clinicamente più grave che esordisce già alla nascita o addirittura durante la vita intrauterina ed è caratterizzata da espansioni molto ampie (>750-1000 CTG), sono trasmessi quasi esclusivamente per via materna. Un inverso fenomeno di regressione intergenerazionale può accadere per alcuni casi di DM1 ad ereditarietà paterna, in cui si riduce il numero di ripetizioni CTG dello zigote verso un range normale, e lo stato clinico può regredire fino alla normalità o ad una forma lieve. Queste considerazioni sono state spiegate dalla possibile instabilità durante la gametogenesi o dalla presenza di specifici fattori regolatori, presenti negli oociti o negli spermatozoi, in grado di stabilizzare o amplificare l’espansione genica [Dean et al. 2006].

### **2.3.2. Meccanismi patogenetici**

Il gene – *DMPK* - responsabile della DM1 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19, nel locus 13.3, ed è espresso ubiquitariamente in vari tessuti, tra cui cuore, cervello, cristallino e muscolo scheletrico. Una regione del gene in cui c’è una sequenza ripetitiva di tre nucleotidi (una serie di triplette CTG) si espande finché il numero di ripetizioni eccede

il normale range (da 5 a 37), fino ad arrivare a valori di centinaia o migliaia. La struttura di *DMPK* suggerisce che esso codifichi per una serina-treonina protein chinasi denominata DMPK (Myotonic Dystrophy Protein Kinase). Questo potrebbe avere un senso perché le chinasi sono coinvolte nei meccanismi di comunicazione intercellulare, nel controllo dei canali ionici e nell'attivazione del sistema del secondo messaggero.

Il gene della DM contiene 15 esoni codificanti per un RNA messaggero (mRNA) di circa 2400 basi. La DMPK è costituita da 5 domini differenti: i 40 aminoacidi della coda N-terminale avrebbero funzione di peptide di segnale; gli esoni 2-8 codificano per il dominio catalitico caratteristico della famiglia delle serina-treonina protein-chinasi, immediatamente vicino c'è una sequenza peptidica costituita da 5 aminoacidi VSGGG con funzioni ancora sconosciute; gli esoni 9-12 per un dominio alfa-elicoideale capace di formare una struttura spiraliforme lievemente simile alla catena pesante della miosina e ad altre proteine miofibrillari; gli esoni 13 e 14 non hanno analogie note; l'esone 15 codifica per un dominio idrofobico C-terminale e contiene il prodotto aminoacidico dell'espansione CTG [Groenen et al. 2000].

Studi su RNA messaggeri hanno scoperto l'esistenza di 6 maggiori isoforme della DMPK, prodotte mediante tre diversi meccanismi di splicing alternativo, ognuno dei quali è specifico per un determinato tipo cellulare. Tutte le isoforme condividono il dominio N-terminale, il dominio chinasi e la regione spiraliforme, ma lo splicing alternativo determina la presenza (isoforme A, C, E) o l'assenza (isoforme B, D, F) dei 5 aminoacidi VSGGG e la costituzione del dominio C-terminale (3 diverse forme della coda C-terminale: la coda 3, composta da 2 aminoacidi, si ritrova nelle isoforme E ed F espresse nelle cellule muscolari lisce; le code più lunghe sono espresse a livello dei muscoli scheletrici, del cuore e del sistema nervoso e possono essere idrofiliche, nelle isoforme C e D, oppure idrofobiche, nelle isoforme A e B). Il motivo aminoacidico VSGGG sembra modulare l'attività di autofosforilazione della DMPK e la sua conformazione, mentre la natura del dominio C-terminale ne regolerebbe la localizzazione intracellulare e la specificità dei substrati [van Herpen et al. 2005; Wansink et al. 2003]. Le proteine con coda C-terminale idrofobica sono localizzate sul reticolo endoplasmatico, mentre proteine con coda idrofilica si trovano sulla membrana mitocondriale esterna; proteine con code molto corte presentano una localizzazione citosolica [Wansink et al. 2003].

Nella DM1 l'abnorme espansione della tripletta CTG è localizzata in una regione 3' non codificante del gene *DMPK*, per cui, a differenza di altre patologie a trasmissione autosomica dominante, il gene non codifica per una proteina con alterata funzione.

Nonostante le attuali conoscenze sulla genetica della DM, il meccanismo fisiopatologico responsabile del complesso e multisistemico quadro clinico di questa malattia risulta tuttora sconosciuto [Cho & Tapscott 2007].

Sono state postulate diverse ipotesi:

1) la DMPK prodotta, proteina che mostra analogie con le protein-chinasi c-AMP dipendenti, la cui funzione non è ad oggi del tutto nota, sarebbe alterata strutturalmente [Fu et al. 1993]. Questo potrebbe comportare:

- un'alterata omeostasi del calcio con conseguente alterazione negli eventi connessi all'accoppiamento eccitazione-contrazione;
- attivazione di endoproteasi che inducono morte cellulare;
- l'alterata proteina potrebbe causare miotonia attraverso alterazioni di fosforilazione di proteine che modulano l'eccitabilità di membrana nel muscolo scheletrico.

2) la mutazione genetica può alterare l'espressione di geni adiacenti al *DMPK*, i quali sarebbero perciò coinvolti nella patogenesi della malattia: alcuni modelli sperimentali, infatti, hanno ipotizzato che il grado di espansione trinucleotidica possa influenzare la formazione e la stabilità di nucleosomi che reprimono l'attività trascrizionale di geni localizzati nelle vicinanze del gene per la DM1 [Fu et al. 1993]. Tra i geni vicini che si ipotizzano coinvolti ci sono *DMWD*, che mappa in una regione immediatamente precedente a quella del gene *DMPK* ed è espresso a livello testicolare, potendo quindi spiegare l'infertilità spesso riscontrata in soggetti maschi; il gene codificante per FCGRT e quello codificante per il recettore delle IgG, che potrebbe spiegare il riscontro di bassi livelli di IgG nei pazienti miotonici [Cho & Tapscotte 2007; Day & Ranum 2005]; ed anche una diminuita espressione di "DM Associated Homeo domain Protein" (DMAHP), proteina codificata dal gene *Six-5* immediatamente distale a *DMPK* ed espressa in vari tessuti corporei, compresi muscolo scheletrico, cuore ed encefalo, la cui funzione non è ancora stata accertata [Gennarelli et al. 1999, Eriksson et al. 1999].

3) ipotesi della tossicità dell'RNA e mis-splicing. Diversi autori hanno considerato che il danno cellulare possa esser dovuto all'aumento progressivo di enormi quantità di RNA trascritti, contenenti alterate ripetizioni CUG (citosina-uracile-guanina), formanti accumuli tossici intranucleari. La ripetizione della tripletta CTG potrebbe infatti esercitare il suo effetto attraverso un'alterata processazione di un certo numero di mRNA, in relazione al numero di triplette, comportando non solo una ridotta quantità della DMPK, ma anche di

altre proteine [Krahe et al. 1995]. Modelli di topi transgenici, con l'espressione di RNA messaggeri con circa 250 sequenze CUG ripetute, hanno sviluppato miotonia e le caratteristiche miopatiche tipiche [Cho & Tapscotte 2007; Day & Ranum 2005]. Le teorie più recenti si sono concentrate su alterate sequenze CUG, espresse a livello dell'RNA codificante per DMPK, in grado di modulare in qualche modo anche la funzione di geni localizzati nel locus DM1, mediante legami con "binding-proteins" [Day & Ranum 2005; Ranum & Day 2004; Toscano et al. 2005]. La mutazione stessa del gene codificante per DMPK può influenzare l'espressione e le funzioni delle CUG-binding proteins (CUG-BPs). La prima di queste proteine identificata è stata chiamata CUG-BP1 ed appartiene a una famiglia di proteine nucleari denominata CELF (CUG-BP1 e fattori ETR-like), caratterizzate da tre domini con alta affinità di legame per gli mRNA, in grado di regolarne sia lo splicing, la traslocazione citosolica ed anche la stabilità [Timchenko 1999]. Successivamente sono state identificate altre proteine, appartenenti alla famiglia delle MBNL (muscleblind-like), in grado di legare le sequenze CUG su RNA a doppia catena: all'interno degli accumuli intranucleari ne sono state riconosciute tre isoforme (MBNL1, MBNL2, MBNL3); esperimenti su topi knock-out per MBNL1 ne hanno evidenziato lo sviluppo di miotonia, cataratta ed anomalie nello splicing dei geni della troponina T e CIC1 [Cho & Tapscott 2007]. All'inizio si pensò che l'abnorme espansione CUG nell'mRNA codificante per DMPK causasse una ridotta affinità di legame tra le CUG-BP1 e altre sequenze di mRNA. Successivamente, essendo la DM1 caratterizzata prevalentemente da atrofia muscolare nelle forme dell'adulto e da immaturità delle fibre muscolari nelle forme congenite, venne ipotizzato che fosse la lunghezza delle ripetizioni CUG a condizionare il mantenimento dello stato di differenziazione nelle miofibrille. L'RNA contenente espansioni CUG sembra inoltre essere alla base dell'interessamento multisistemico, in quanto i trascritti con sequenze CUG/CCUG possono alterare le funzioni e le localizzazioni delle RNA binding-proteins, portando infine ad un alterato splicing di diversi geni come troponina cardiaca T, recettore per insulina, proteina Tau, e la Miotubularina [Day & Ranum 2005].

4) ipotesi di una compromessa funzione ossidativa mitocondriale. Sebbene non sia ancora chiaro completamente il meccanismo tramite il quale le caratteristiche fenotipiche della DM1 possano essere indotte, alcuni studi hanno dimostrato un ruolo dello stress ossidativo come fattore condizionante. A tal proposito, l'analisi bioptica di campioni prelevati dal muscolo scheletrico di pazienti affetti da DM1 mostra talora reperti suggestivi di una disfunzione mitocondriale: "ragged red fibers", ridotta attività degli enzimi mitocondriali

(in particolare la citocromo C ossidasi), ed anomalie ultrastrutturali dei mitocondri [Siciliano et al. 2001].

Inoltre è stato dimostrato come si riscontrino effettivamente nel sangue dei pazienti miotonici ridotte concentrazioni di coenzima Q10 (CoQ10), una provitamina sita nella membrana mitocondriale esterna che, interagendo con diversi complessi enzimatici, svolge un ruolo decisivo nella sintesi dell'ATP cellulare [Tedeschi et al. 2000]; e di come tali livelli tendano a diminuire in modo proporzionale all'entità dell'espansione della tripletta CTG, avvalorando quindi l'ipotesi di un meccanismo implicante uno stress ossidativo precoce [Siciliano et al. 2001].

Queste osservazioni hanno condotto diversi autori a inquadrare la DM1 come una malattia da invecchiamento precoce con disfunzione dell'ossidazione mitocondriale, che potrebbe costituire uno dei possibili meccanismi patogenetici della malattia.

6) Disregolazione di microRNA: diverse molecole di microRNA muscolo-specifico (miRs) sono state implicate nella DM1. Le molecole identificate possono essere sia down-regolate (miR-1, miR-29b, miR-29c, miR-33) sia up-regolate (miR-206 e miR-335) e probabilmente contribuiscono a determinare il complesso fenotipo della Distrofia Miotonica. La down-regolazione di miR-1 nel muscolo cardiaco di pazienti miotonici determina la disregolazione della proteina gap-junction alfa1 (GJA1) e della proteina canale del calcio CACNA1C. RNA contenenti sequenze CUG mutate formano filamenti a doppia elica che in DM1 sono oggetto di clivaggio da parte delle ribonucleasi DICER1 [Udd & Krahe 2012].

### **2.3.3. Età d'esordio e forme cliniche**

Nella DM1 l'esordio della malattia è variabile da individuo ad individuo e può coinvolgere diversi organi e sistemi dell'organismo. I pazienti possono avere un decorso del tutto asintomatico oppure presentare le più frequenti manifestazioni, specie muscolari, di una malattia a decorso progressivo e lentamente ingravescente. I sintomi della DM1 possono manifestarsi in qualsiasi momento della vita, sin dall'infanzia o solo in età adulta, ma, solitamente, prima compaiono più si aggravano nel corso del tempo, fino al punto di minare l'autonomia del paziente.

Le forme cliniche di DM1 attualmente riconosciute sono 4 e si basano proprio sull'età di insorgenza della malattia: la forma ad esordio adulto o classica (la più comune); la forma ad esordio tardivo, paucisintomatica o del tutto asintomatica; la forma congenita, molto



grave, quando la malattia dà segno di sé già alla nascita; ed infine la forma ad esordio infantile.

Quando la Distrofia Miotonica di tipo 1 si presenta in forma congenita (forma che tuttora non è stata individuata nella DM2), il quadro clinico costituisce un'entità del tutto separata rispetto alla forma che esordisce nell'adulto, e non semplicemente una sua forma più grave; al contrario, la forma ad esordio infantile è del tutto simile a quella classica, ma con deficit cognitivi più marcati e con una prognosi peggiore.

L'espressione clinica della DM1 quindi varia ampiamente ed è multisistemica.

- La *Distrofia Miotonica congenita*, quando la malattia dà segno di sé già alla nascita, rappresenta la forma più grave e si osserva in circa il 25% dei neonati da madri affette; i bambini affetti da tale forma – spesso prematuri - presentano sintomi già alla nascita o addirittura in utero (riduzione dei movimenti fetali, polidramnios e varie deformità rilevabili con esame ultrasonografico). Il quadro è particolarmente grave sin dall'inizio, con severa ipotonia neonatale e debolezza generalizzata, importanti difficoltà di suzione e deglutizione, problemi respiratori e talora anche deformità scheletriche (piede equino e varo). Caratteristica è la piega verso l'alto, a V invertita, del labbro superiore dovuta a severa ipostenia dei muscoli facciali.

La mortalità neonatale è alta: la grave compromissione delle condizioni generali è spesso fatale, in particolare per le complicanze respiratorie.

Se si supera questa prima fase, generalmente l'ipotonia muscolare migliora nel tempo e i bambini acquisiscono, seppure in ritardo, le tappe motorie, mentre può rimanere grave il deficit intellettuale, presente nei 2/3 delle forme congenite.

- La forma di *Distrofia Miotonica tipo 1 ad esordio infantile* mostra aspetti clinici in comune con la forma congenita, in particolare il ritardo mentale, ma non sono presenti sintomi al momento della nascita. Tale forma è infatti stata a lungo trascurata a causa dei sintomi non caratteristici di distrofia muscolare: i bambini affetti presentano un ritardo dell'acquisizione delle capacità motorie (in genere con inizio della deambulazione oltre i due anni) e delle funzioni psichiche (ritardo della parola, alterazioni comportamentali), ma non debolezza, atrofia muscolare o miotonia. L'aspetto clinico più rilevante è costituito dal deficit cognitivo: presentano tipicamente difficoltà scolastiche che portano a consulenze da parte di neuropsichiatri infantili per ricercarne le cause. Con l'avanzare della malattia, tali bambini tenderanno a sviluppare sintomi muscolari nelle decadi successive, causanti disabilità fisiche proprio come nella forma classica ad esordio adulto.

- *DM1 ad esordio adulto*. I sintomi tipici della malattia classica comprendono progressiva debolezza e atrofia muscolare (solitamente coinvolgenti all'inizio i muscoli distali), miotonia, ptosi, ipostenia dei muscoli facciali e anteriori del collo, sonnolenza diurna, fatica e cataratta, generalmente ad esordio in età giovane-adulta, in associazione al vario interessamento multiorgano. Anche nella forma ad esordio in età adulta possono essere presenti problemi cognitivi e comportamentali di varia entità, ma, a differenza delle forme ad esordio nell'infanzia, rappresentano uno degli elementi del quadro clinico e non necessariamente l'aspetto dominante.

- *DM1 ad esordio tardivo, oligosintomatica*. La cataratta è il principale aspetto clinico. Il coinvolgimento muscolare è assente o lieve, con insorgenza in età tardiva (>50 anni). In rari casi l'esordio è caratterizzato da disturbi cardiaci e respiratori, soprattutto quando la miotonia è lieve e viene pertanto sottovalutata.

Questa espressione più mite della malattia nelle generazioni precedenti combinata con un quadro di malattia più severo nelle generazioni successive (di solito alla terza) ha rappresentato la base per la definizione del meccanismo dell'anticipazione genetica nella DM1 (Fig. 3), prima che il test genetico potesse essere applicato. Il grado di espansione dei nucleotidi può essere diverso nei vari tessuti e organi di uno stesso individuo e ciò spiega la variabilità clinica della malattia: quadri clinici più lievi sono stati correlati con minor numero di ripetizioni CTG [Udd & Krahe 2012].

#### **2.3.4. Forma classica: manifestazioni cliniche**

L'esordio della DM1 si colloca generalmente tra i 18 e i 35, è insidioso e può passare inosservato. Tuttavia in qualche caso un evento precipitante come una forte emozione, un trauma o una malattia intercorrente può rendere manifesta la forma morbosa. Il ritardo tra la comparsa dei primi sintomi e una corretta diagnosi è generalmente molto lungo, in media oltre 5 anni.

Le manifestazioni iniziali più comuni che, di solito, conducono ad eseguire accertamenti diagnostici sono: debolezza muscolare, miotonia e/o cataratta in età precoce (prima dei 50 anni di età); comunque in genere i pazienti giungono alla nostra osservazione per una anamnesi familiare positiva per DM1 in associazione con sintomi minori [Udd & Krahe 2012].

### ***Fenomeno miotonico e interessamento della muscolatura scheletrica.***

La miotonia è uno dei sintomi cardine e, quando presente, solitamente si rende manifesta già nell'infanzia-adolescenza tendendo poi a peggiorare progressivamente. Consiste, dopo contrazione muscolare volontaria, nel mantenimento prolungato della stessa a livello dei muscoli interessati, con successivo ritardato rilassamento, lento e graduale (Fig. 5). Tale

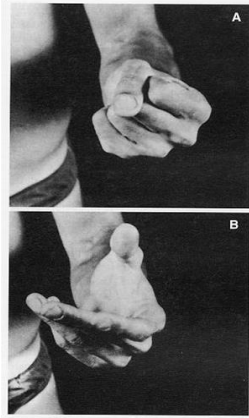


Fig. 34.12 - Miotonia volontaria. In A) chiusura energica del pugno. In B) all'apertura improvvisa dello stesso, impossibilità alla completa decontrazione.

**Figura 5: Miotonia volontaria**

fenomeno clinico definito *miotnico*, in genere più localizzato a mani e palpebre, è dimostrabile mediante la percussione con un martelletto da riflessi dell'eminenza tenar, della lingua, e dei muscoli estensori del polso (Fig. 6). A fine diagnostico, banalmente, è possibile riconoscere il lento rilassamento della stretta della mano dopo chiusura volontaria forzata del pugno (Fig. 6). Negli stadi più avanzati di malattia, tuttavia, l'atrofia muscolare può essere tale da render difficile l'identificazione del fenomeno miotonico. La miotonia causa difficoltà quotidiane al paziente che vanno dall'uso di strumenti di

qualsiasi tipo al semplice lasciare la presa sulla maniglia di una porta: sia la difficoltà nel rilasciamento sia il deficit di forza possono migliorare dopo una serie di contrazioni ripetute, fenomeno riconosciuto come *warm-up*.

Il fenomeno miotonico è dovuto ad un aumento della eccitabilità idiomuscolare in grado di causare la contrazione persistente del muscolo in risposta a stimoli di varia natura. In base a questo si distinguono diversi tipi di attività miotonica [Engel, 1994]:

- 1) *miotonia volontaria*: rallentato rilasciamento del muscolo dopo contrazione volontaria (più frequente nei muscoli dell'eminenza tenar, nei flessori delle dita della mano, nei muscoli orbicolari delle palpebre e nei muscoli della lingua) (Fig. 5);
- 2) *miotonia meccanica*: l'eccitazione meccanica diretta del muscolo (percussione) determina una contrazione locale tonica particolarmente persistente, evidente clinicamente come una depressione o nodosità del ventre muscolare che permane per qualche secondo (Fig. 6);
- 3) *miotonia elettrica*: la stimolazione elettrica del muscolo determina una contrazione che persiste per qualche secondo dopo la fine della stimolazione. Il fenomeno miotonico elettrico è evidenziato dall'esame elettromiografico: all'infissione dell'agolettrodo nel



Fig. 34.13 - Miotonia meccanica: la percussione della muscolatura tenar determina un'intensa e persistente contrazione della stessa.

**Figura 6: Miotonia meccanica (percussione eminenza tenar)**

muscolo, compare una scarica di potenziali d'azione involontari causati dall'ipereccitabilità della membrana (Fig. 7).

4) *miotonia chimica*: la somministrazione di acetilcolina, di cloruro di potassio e di prostigmina determina nei miotonici delle contrazioni muscolari prolungate.



Figura 7: Miotonia elettrica

Inoltre il fenomeno miotonico è generalmente esacerbato dal freddo; esso caratterizza altre forme di miotonia, quali la congenita e la paramiotonia, nelle quali appunto l'esacerbazione con il freddo è tipica.

E' dimostrato che tale fenomeno è determinato da una ipereccitabilità della fibra muscolare che mantiene uno stato di contrazione persistente per la presenza di una depolarizzazione ripetitiva della sua membrana. E' stata ipotizzata, quale causa di questa ipereccitabilità, una alterazione della permeabilità di membrana della fibra muscolare allo ione potassio, secondaria alla mutazione genetica, con persistente fuoriuscita dalla stessa dello ione potassio e conseguente abbassamento del potenziale di riposo, per cui i diversi stimoli produrrebbero una depolarizzazione prolungata e comparsa di scariche ripetitive. In effetti, il contenuto di potassio del muscolo miotonico è notevolmente diminuito, mentre la somministrazione a pazienti affetti da miotonia di sostanze come i glucocorticoidi, il glucosio e l'insulina, che favoriscono l'ingresso nella fibra muscolare del potassio, diminuiscono l'entità del fenomeno miotonico.

Nella patogenesi dell'ipereccitabilità delle fibre muscolari sono state anche implicate alterazioni, fino alla completa perdita, della funzionalità dei canali del cloro tipo 1 (ClC-1), espressi specificatamente a livello delle cellule muscolari e fondamentali per la stabilità elettrica della membrana stessa [Duffield et al. 2003]. I canali del cloro tipo 1 svolgono un ruolo importante nel mantenimento del potenziale di riposo delle cellule muscolari, inibendo la depolarizzazione conseguente ad un'aumentata conduttanza al potassio: un'aumentata attività di alcune proteine intranucleari leganti il trascritto espanso, corrispondente alla tripletta genica ripetuta citosina-uracile-guanina (CUG), le CUG-Binding Proteins 1 (CUG-BP1) che regolano i meccanismi di "splicing" alternativo dei trascritti mRNA, sarebbe responsabile dell'instabilità di questi ultimi e del conseguente deficit di espressione delle corrispondenti proteine, tra cui ClC-1, risultandone infine un'alterata conduttanza al cloro [Charlet-B et al. 2002].

Modelli di topi transgenici, esprimenti alterate triplette CUG a livello degli RNA trascritti, hanno sviluppato sia miotonia che simili alterazioni nei meccanismi di splicing della proteina ClC-1, ed una riduzione della conduttanza al cloro del 70-80%, in grado di

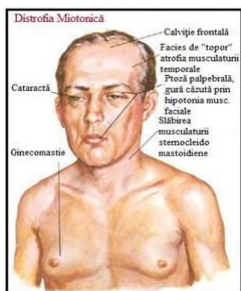
facilitare l'accumulo dello ione potassio a livello del sistema dei tubuli trasversi durante la contrazione muscolare, che innesca così la depolarizzazione cellulare ed i successivi potenziali di azione ripetitivi [Wheeler et al. 2012].

La distrofia miotonica è una delle rare forme di distrofia muscolare che sembra interessare in modo più grave i distretti distali degli arti. Infatti il sintomo predominante, accanto alla miotonia, è l'evidente debolezza delle mani e, spesso, piede cadente. C'è anche una predilezione per i muscoli della faccia e del collo.

Tipicamente colpiti sono i muscoli mimici facciali, l'elevatore superiore della palpebra, il temporale, lo sternocleidomastoideo, i muscoli distali dell'avambraccio e i dorsiflessori del piede. L'atrofia dei masseteri porta ad un assottigliamento della metà inferiore della faccia e la mandibola è debole e mal posizionata cosicché l'occlusione delle arcate dentarie risulta alterata. Può essere infatti osservata la dislocazione ricorrente della mandibola, particolarmente quando il paziente tende ad aprire molto la bocca, come per mordere una mela. Gli sternocleidomastoidei sono quasi sempre mal definiti, atrofici e indeboliti con conseguente assottigliamento e curvatura anteriore del collo ("collo di cigno"). La debolezza dei muscoli estensori del collo, che determina l'atteggiamento della "testa cadente", porta a difficoltà nel sostenere la posizione eretta della testa e/o nell'orientarla nello spazio. L'ipostenia degli estensori del polso, delle dita e dei muscoli intrinseci della mano ne pregiudica la funzionalità, causando difficoltà nell'eseguire compiti fini; mentre la debolezza dei muscoli dorsiflessori della caviglia si manifesta con la caduta del piede (*steppage*), compromettendo così la deambulazione. Nell'età media sono infatti frequenti cadute ripetute.

Col passare del tempo, può essere comunque interessata tutta la muscolatura scheletrica, specie nelle forme più severe, con debolezza generalizzata, ipotrofia muscolare e facile affaticabilità.

I riflessi osteotendinei sono assenti o ridotti. Sono rare le retrazioni articolari.



**Figura 8:** Facies  
paziente DM1

I pazienti da un punto di vista ispettivo (Fig. 8) presentano una tipica "faccia ad accetta" (viso lungo e magro, inespressivo), dovuta ad atrofia e ipostenia dei muscoli temporali, masseteri e facciali; la calvizie frontale precoce è caratteristica degli uomini colpiti da malattia, ma è possibile ritrovarla anche nelle donne affette; inoltre l'interessamento palpebrale è causa di ptosi.

Il coinvolgimento dei muscoli palatini, faringei, laringei e della lingua

è causa di eloquio disartrico, di voce nasale monotona e debole (rinolalia) e di alterazioni nella deglutizione.

### ***Interessamento multisistemico.***

*Coinvolgimento oculare.* Per quanto riguarda le manifestazioni sistemiche di malattia, di comune riscontro nei pazienti con distrofia muscolare è l'interessamento del corpo vitreo dell'occhio con comparsa di cataratta subcapsulare iridescente posteriore, che si manifesta in genere intorno ai 30-40 anni. Le opacità del cristallino si trovano infatti nel 90% dei casi nell'esame con la lampada a fessura e possono essere un primo sintomo giovanile di malattia, con comparsa poi successiva dei disturbi muscolari.

*Coinvolgimento respiratorio.* I pazienti possono presentare nel decorso di malattia ipostenia del diaframma e dei muscoli intercostali, con sviluppo d'insufficienza respiratoria.

Sintomo precoce e frequente nella DM1 è un'eccessiva sonnolenza diurna, che può essere determinata da una disfunzione primaria dei centri regolatori del sonno o dalla presenza di apnee notturne durante il sonno (OSAS), le quali possono avere sia una genesi periferica di tipo ostruttivo/restrittivo (a causa della compromissione della muscolatura respiratoria), sia essere di origine centrale, per probabile malfunzionamento dei centri del respiro [Dauvilliers et al. 2012; Laberge et al. 2013; Romigi et al. 2011].

Chi è affetto da DM1 non presenta infatti la usuale risposta iperventilatoria all'ipercapnia, ed è particolarmente sensibile ai farmaci usati in anestesia. Dopo anestesia generale infatti i pazienti possono andare incontro a complicazioni come depressione respiratoria prolungata o polmoniti postoperatorie, a causa di una anomala reattività ai barbiturici, alla morfina e ad altri farmaci che deprimono il sistema respiratorio.

*Coinvolgimento cardiaco.* I disturbi cardiaci sono frequenti tra i pazienti miotonici; l'interessamento patologico prominente è a livello del Nodo Seno-Atriale e del sistema di conduzione, che da un punto di vista istopatologico possono anche andare incontro a fibrosi, ipertrofia dei miociti e infiltrazione adiposa. Le alterazioni elettrocardiografiche di più frequente riscontro sono rappresentate da bradicardia sinusale, extrasistolia, tachiaritmia, allungamento del tratto P-R, del complesso QRS e del segmento ST. Anomalie elettrocardiografiche si evidenziano nel 60-70% dei casi con DM1 e possono contribuire significativamente, specie se non riconosciute e trattate, alla mortalità di questi pazienti [Bassez et al. 2004; Petri et al. 2013; Sovari et al. 2007].

Sono stati descritti flutter, fibrillazioni e blocchi atrio-ventricolari di 1° grado e c'è un maggior rischio di morte improvvisa per tachiaritmie ventricolari e blocco AV completo [Groh et al. 2008]. Tali aritmie possono comparire precocemente, quando i sintomi muscolari sono ancora blandi. È pertanto necessario prestare attenzione particolare nella prescrizione di esercizio muscolare e la diagnosi di DM dovrebbe essere presa in considerazione in pazienti che si rivolgono al cardiologo per una sospetta aritmia o per un blocco di conduzione.

Il prolasso della valvola mitrale e la disfunzione del ventricolo sinistro sono anomalie meno frequenti, tuttavia è stata riscontrata la presenza di un equivalente del fenomeno miotonico, tipico della muscolatura scheletrica, a livello cardiaco mediante analisi della funzione diastolica con Ecocolordoppler cardiaco (*miotonia miocardica*) [Pelargonio et al. 2002].

Nonostante si tratti di una distrofia muscolare, nella DM1 l'occorrenza di cardiomiopatia è poco frequente. Anche lo scompenso cardiocircolatorio non è frequente, comunque è possibile che si manifesti secondariamente al cuore polmonare, secondario all'insufficienza respiratoria.

Studi effettuati post-mortem e biopsie endomiocardiche di pazienti DM1 hanno evidenziato diversi gradi di alterazioni non specifiche, come fibrosi interstiziale, infiltrazioni lipidiche, ipertrofia dei cardiomiociti e focali infiltrati infiammatori: il reperto più comune rimane un selettivo e specifico coinvolgimento del sistema di conduzione. Qualsiasi parte del sistema di conduzione può essere interessato, ma nella maggior parte dei casi è coinvolto il sistema delle fibre del Purkinje; spesso nei pazienti asintomatici sono presenti difetti di conduzione minimi, rilevabili all'ECG su dodici derivazioni; la progressione dei difetti di conduzione di solito è lenta, anche se sono stati descritti casi di peggioramento veloci, che confermano così l'imprevedibilità del decorso clinico della malattia [Pelargonio et al. 2002].

*Coinvolgimento del tratto gastro-intestinale.* Il coinvolgimento della muscolatura liscia del tratto gastrointestinale rende ragione di numerosi problemi. Molto comune in questi pazienti è la disfagia, secondaria alla disfunzione della peristalsi dell'ipofaringe e dell'esofago prossimale, ma solo raramente e in stadio avanzato di malattia si arriva al punto da dover ricorrere all'alimentazione parenterale. Le alterazioni della deglutizione possono essere causa di aspirazione e polmonite ab ingestis, contribuendo significativamente all'insorgenza di complicazioni respiratorie [Ercolin et al. 2013].

Comuni sono episodi di colelitiasi e colecistiti.

Frequente è il riscontro di colon spastico con dolori addominali e costipazione; altri sintomi comuni sono svuotamento gastrico rallentato ed irregolarità dell'alvo con alternanza stipsi/diarrea e incontinenza fecale occasionale. I pazienti possono andare incontro a pseudo-ostruzione intestinale o megacolon, la causa può esser dovuta sia al fenomeno miotonico sia alla perdita di tessuto muscolare liscio nei visceri [Bellini et al. 2013].

*Coinvolgimento del sistema endocrino.* Le funzioni endocrino-metaboliche possono essere interessate in diversi modi negli adulti con DM1 [Ørngreen et al. 2012]. L'iperglicemia a digiuno dovuta a insulino-resistenza e l'aumentata suscettibilità al diabete mellito sono ben documentati. La dislipidemia può essere di frequente riscontro, così come i disturbi della funzionalità tiroidea con ipotiroidismo che è stato dimostrato peggiorare e mascherare i sintomi della DM1. In alcuni pazienti di sesso maschile si può osservare ipogonadismo per atrofia testicolare e scomparsa dei tubuli seminiferi, con conseguente deficit di androgeni, riduzione della libido, impotenza e sterilità. Nella donna sono riferite irregolarità mestruali, riduzione della fertilità, alte percentuali di aborti, complicanze durante la gravidanza, fibroma uterino e cisti ovariche [Udd & Krahe 2012].

*Coinvolgimento cutaneo e rischio neoplastico.* Nella DM1 ad esordio in età adulta anche la cute può essere colpita. Alopecia frontale progressiva ad inizio precoce è caratteristica degli uomini colpiti da malattia, ma è possibile ritrovarla anche nelle donne affette. Il rischio di cancro nei pazienti miotonici è incerto. Epiteliomi e pilomatricomi, anche multipli, non sono rari, ma frequentemente misconosciuti e non diagnosticati. Solo in recenti studi su un gran numero di pazienti affetti, è stato confermato un aumentato rischio relativo per vari tumori. Per alcuni tipi di cancro (endometrio, ovaie, cervello e colon-retto) il rischio è 7 volte maggiore rispetto alla popolazione generale sana, e tale rischio sembra essere associato più frequentemente ai pazienti miotonici di sesso femminile e non correlato al grado di espansione della tripletta CTG [Udd & Krahe 2012].

*Coinvolgimento del sistema nervoso centrale.* Anche il sistema nervoso centrale è coinvolto dalla malattia, risultando alterato sia a livello della sostanza bianca che della sostanza grigia. Sono stati descritti ammassi neurofibrillari (*neurofibrillary tangles, NFT*) nel sistema limbico e nel tronco encefalico dei soggetti affetti da DM1; non si riscontrano placche senili. Deficit intellettivi sono di più comune riscontro nelle forme DM1 a esordio congenito o infantile, ma è stato comunque descritto un declino cognitivo legato all'avanzare dell'età in chi soffre di DM1 e alcune funzioni risultano maggiormente compromesse di altre [Modoni et al. 2004].



L'aspettativa di vita è inferiore nei pazienti con DM1 e si assesta intorno a un'età compresa tra i 50 e i 60 anni. Le cause principali di morte sono l'insufficienza respiratoria, malattie cardiovascolari, aritmie e morte cardiaca improvvisa [Groh et al. 2008; Mathieu et al. 1999].

### **2.3.5. Aspetti neuropsicologici**

L'interessamento del sistema nervoso centrale nei pazienti affetti da DM1 si manifesta in maniera prevalente con un quadro di compromissione delle funzioni frontali.

Una valutazione neuropsicologica risulta pertanto utile in questi soggetti, in quanto consiste in una analisi estensiva delle funzioni cognitive al fine di individuare le componenti deficitarie e residue del soggetto, caratterizzando così il coinvolgimento del SNC da parte della malattia. Oltre ad avere un valore diagnostico e prognostico, l'impiego di test neuropsicologici ci permette di migliorare la gestione e l'assistenza del paziente e di verificare la compliance e l'efficacia di un trattamento in corso.

*Funzionamento cognitivo.* Una valutazione dell'intelligenza globale ha documentato un quoziente di intelligenza (QI) inferiore al normale per età nella popolazione DM1 rispetto ai soggetti sani, con chiara evidenza di un declino progressivo intellettuale [Meola G, Sansone V. 2007; Jean S. et al. 2014]. Diversi studi hanno dimostrato che i pazienti con DM1 mostrano un coinvolgimento selettivo delle funzioni cognitive, in particolare dei domini attentivi, visuo-spaziali, ed esecutivi [Meola et al. 2003, Winblad et al. 2010]. I deficit visuo-spaziali sono caratteristici della forma ad esordio in età adulta, diversamente dalla forma congenita in cui è predominante un deficit intellettuale. Nel 2004 Modoni e collaboratori hanno rafforzato questo problema studiando un'ampia coorte di pazienti stratificati per dimensione dell'espansione trinucleotidica CTG: hanno dimostrato che i deficit visuo-spaziali sono elementi ricorrenti nel profilo neuropsicologico di pazienti adulti con DM1, indipendentemente dalla loro classe di espansione. Nello studio delle funzioni frontali, si evidenziano fluttuazioni attentive, riduzione della capacità di concentrazione, riduzione della capacità di gestire stimoli tra loro interferenti con una conseguente prevalenza di comportamenti di tipo automatico. Inattività e riduzione dell'iniziativa sono tipiche delle malattie croniche progressive muscolari, ma nella DM1 sono particolarmente pronunciati. L'insieme delle alterazioni cognitive tipiche della malattia può suggerire in alcuni casi una sindrome disesecutiva dovuta a compromissione dei lobi frontali [Gaul et al. 2006]. Nel 2007, Meola e Sansone hanno a tal proposito

proposto il concetto di "sindrome disesecutiva - *DM1 related*" per definire il coinvolgimento neuropsicologico eterogeneo in questa complessa patologia: un ulteriore elemento caratteristico della sindrome disesecutiva è il temperamento apatico, osservabile clinicamente nei pazienti miotonici ma spesso riferito anche dai familiari dei pazienti [Rubinsztein et al. 1998]. Questo può essere il risultato non solo di una flessione del tono dell'umore, ma anche di un processo degenerativo a carico dei circuiti neurali preposti al comportamento finalizzato. Tuttavia, non è ancora chiaro se in questi pazienti vi è una progressione del declino cognitivo nel tempo [Wilson et al. 1999], e se le anomalie cerebrali evolvano nella sindrome di demenza. La funzione di linguaggio viene generalmente conservata nei pazienti adulti con DM1 [Meola et al. 1999, Meola et al. 2003], anche se anomalie del linguaggio (disartria), causate dalla ipostenia dei muscoli facciali e dalla miotonia della lingua e del muscolo massetere, possono portare a difficoltà nella comunicazione orale e isolamento sociale, con conseguente preoccupazione per i pazienti e per le loro famiglie.

*Coinvolgimento Neuropsichiatrico.* Accanto a deficit cognitivi, frequentemente i pazienti affetti da DM1 presentano disturbi neuropsicologici con un quadro tipico di alterazioni della personalità (evitante, passivo-aggressiva, ossessivo-compulsiva, paranoide) ed del tono dell'umore, con conseguente riduzione degli interessi, scarsa spinta motivazionale e ridotta compliance ai trattamenti medici [Winblad et al. 2005; Meola et al. 2003; Peric et al. 2014]. È tuttora dibattuto se ansia e depressione siano più frequenti in questi pazienti piuttosto che nella popolazione generale [Winblad et al. 2010] perché, in realtà, solo pochi pazienti rientrano pienamente nei criteri diagnostici per un disturbo depressivo maggiore [Meola et al. 2003, Bungener et al. 1998]. Invece comuni sono manifestazioni di tipo disforico, difficilmente misurabili con gli strumenti attualmente disponibili, comportamento apatico, diminuzione della partecipazione emotiva e maggiore irritabilità.

*Consapevolezza della malattia.* Nella pratica clinica, è comunemente osservato che i soggetti affetti da DM1 mostrano una ridotta consapevolezza di malattia e della sua progressione, definita anche come *Anosognosia* o mancanza di comprensione ("Unawareness"), condizione che conduce ad una falsa attribuzione secondaria di sintomi, ritardi in procedure diagnostiche e bassa compliance ai trattamenti [Meola, Sansone 2007; Kobayakawa et al. 2012]. Può esser dovuta a diversi fattori ma non è presente, al momento, una teoria eziopatogenetica accreditata [Vogel et al. 2005] e la sua l'incidenza nella DM1 non è mai stata indagata.

Fu Babinski a coniare il termine *Anosognosia* per definire tale condizione nei pazienti emiplegici [Langer & Levine 2014]; nel tempo questo termine ha acquisito un significato sempre più generalizzato.

L'inconsapevolezza della malattia può essere osservata in individui con lesioni cerebrali o malattie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer, anche nelle fasi premorbose - *Mild Cognitive Impairment* (MCI). Ciò conduce ad ipotizzare che esista un legame tra meccanismi patogenetici di neurodegenerazione e di consapevolezza di malattia [Mograbi et al. 2009].

Allo stato attuale delle conoscenze, una caratterizzazione sistematica del verificarsi di questa condizione e della sua correlazione con le disfunzioni neuropsicologiche in individui con DM1 non è disponibile.

### 2.3.6. Approccio diagnostico

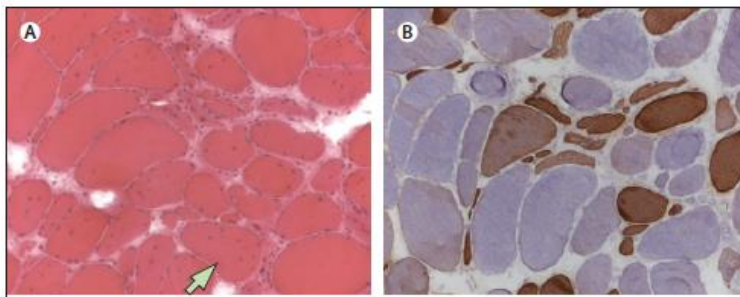
La diagnosi di DM1 è complicata dal fatto che le patologie muscolari sono malattie rare; ne sono state individuate più di 40, con relativi sottotipi, e i loro quadri sintomatici possono in parte sovrapporsi. Inoltre bisogna sottolineare che la malattia di Steinert si presenta con un'ampia variabilità fenotipica, potendosi talvolta presentare con forme oligo o apparentemente asintomatiche, che rendono difficile e spesso ritardano la diagnosi [Schara & Schoser 2006]. Infatti questi pazienti possono essere indirizzati per la valutazione di un ritardo mentale, presentarsi al pronto soccorso per fratture o essere ricoverati in un reparto per il mancato recupero dopo una colecistectomia.

Per una corretta diagnosi di distrofia miotonica di tipo 1 è fondamentale *in primis* una corretta anamnesi personale e familiare ed un accurato esame obiettivo neurologico atto a riconoscere quelli che sono gli elementi caratteristici della malattia come ad esempio il fenomeno miotonico ed un'ipostenia muscolare che inizia a livello distale e successivamente coinvolge anche il comparto muscolare prossimale. Una volta posto il sospetto clinico di malattia è necessario un approfondimento diagnostico con indagini di laboratorio e strumentali.

- Esami di laboratorio: in questa categoria di pazienti, i livelli sierici di creatinfosfochinasi (CPK) possono essere normali o moderatamente elevati. Un aumento degli enzimi epatici, in particolare delle gamma-glutamyl-transferasi ( $\gamma$ GT), è piuttosto frequente in questa patologia, come anche l'ipogammaglobulinemia IgG, entrambi per motivi sconosciuti. Nei quadri con

ipogonadismo maschile, ormone luteinizzante (LH) e follicolo stimolante (FSH) sono spesso aumentati, come anche nell'ipogonadismo subclinico.

- Studi elettrofisiologici: Prima che fosse disponibile il test genetico, l'esame più impiegato a scopo diagnostico era l'esame elettromiografico che all'inserzione dell'ago nel muscolo documenta, nella maggior parte dei casi, combinazione di segni miopatici ed evidenze di miotonia, ovvero scariche ripetitive spontanee ad alta frequenza che alla traduzione sonora si rivelano come "fasi di tempesta" o "ad accelerazione di un motore di motocicletta" o "mitragliatrice" (Fig. 7). Gli studi di conduzione dei nervi risultano normali nei pazienti miotonici.
- Istopatologia muscolare: la biopsia muscolare non è di per sé necessaria per la diagnosi di Distrofia di Steinert e raramente in questi pazienti si arriva ad eseguirla. Tale esame invasivo evidenzia un'atrofia selettiva delle fibre di tipo I nel 50% dei casi. Tipicamente, si riscontra un aumento del numero dei nuclei centrali (Fig. 9). Le fibre ad anello sono numerose, caratterizzate da una sottile striscia periferica di miofibrille orientate a 90° rispetto al resto della fibra. La necrosi delle fibre muscolari e l'aumento del tessuto connettivale, comuni nelle altre distrofie, non si osservano abitualmente nella DM1.



**Figura 9:** Caratteristiche istopatologiche rilevate alla biopsia muscolare. A. Ematossilina-eosina. B.

- Tecniche di imaging: nella DM1, in parallelo con il quadro clinico di debolezza e atrofia muscolare, i muscoli vanno incontro a grossolani fenomeni di degenerazione adiposa, individuabili mediante RM muscolare. I cambiamenti iniziali in genere si osservano nel soleo e gastrocnemio mediale: questi muscoli nella parte inferiore della gamba vengono completamente sostituiti da infiltrazione adiposa (alterazioni degenerative). Altre volte, le prime alterazioni si evidenziano nella parte superiore della gamba, vicino alla coscia.

Il coinvolgimento dell'encefalo nella DM1 è stato dimostrato tramite MRI e PET con FDG. Atrofia corticale modesta (solitamente più pronunciata ai lobi frontali e temporali), dilatazione dei ventricoli e degli spazi di Virchow-Robin, e lesioni iperintense della sostanza bianca sono caratteristici in questi pazienti. Frequenza, localizzazione, diffusione

e morfologia di queste lesioni rimangono tuttavia ancora controverse, così come la loro possibile correlazione con declino cognitivo, età d'esordio, durata di malattia, stato neuromuscolare e background genetico [Udd & Krahe 2012].

La diagnosi di certezza di DM1 viene posta attraverso l'analisi molecolare del DNA genomico estratto dai linfociti, mediante l'individuazione dell'espansione del trinucleotide CTG. La diagnosi molecolare si avvale di tecniche di diagnostica molecolare attraverso PCR (Polymerase Chain Reaction) per evidenziare piccole espansioni, ed analisi di Southern Blot per i casi con espansioni di dimensioni maggiori [Guida et al. 1995]. Per mezzo di tali tecniche è possibile quantificare l'entità dell'espansione trinucleotidica nell'allele mutato dominante o viceversa accertare uno stato di normalità in soggetti a rischio di ricorrenza familiare.

Nel caso che un soggetto venga identificato come affetto da distrofia miotonica, è importante che gli altri parenti consanguinei eseguano una visita neurologica presso un Centro Specializzato. Il neurologo deciderà nei singoli casi se eseguire esami più approfonditi (come l'elettromiografia e l'analisi molecolare del DNA genomico). In ogni caso, è importante effettuare questo controllo prima di programmare una gravidanza, sia per le donne che per gli uomini. La malattia ha infatti un'ereditarietà autosomica dominante ad alta penetranza.

E' possibile effettuare diagnosi prenatale quando uno dei genitori è affetto e la diagnosi genetica è stata confermata. In tal caso, è effettuato un prelievo di villi coriali (frammenti di tessuto destinato a diventare placenta) alla decima-undicesima settimana di gravidanza. Tale indagine può evidenziare la presenza dell'anomala espansione di nucleotidi nel feto, con risultati affidabili che permettono di stabilire se il bambino possa diventare affetto e, in base all'entità dell'espansione, fornire indicazioni generali sulla severità clinica, anche se essendo il grado di espansione diverso nei vari tessuti e organi, non è ad oggi possibile predire con certezza la gravità di malattia [Savić Pavićević et al. 2013].

### **2.3.7. Gestione terapeutica**

Ad oggi non esiste una terapia risolutiva per la DM, anche se sono in fase di studio avanzato nuove strategie terapeutiche molto promettenti. La progressione della ricerca nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base della malattia ha infatti permesso un avanzamento nello studio di terapie geniche, che hanno già dimostrato un'efficacia sperimentale sia in modelli in vitro che su modelli animali.

Allo stato attuale, nella pratica clinica la terapia dei pazienti con DM1 rimane essenzialmente sintomatica, basata sulla prevenzione delle complicanze e sul monitoraggio a lungo termine, con particolare attenzione rivolta ai disturbi cardiorespiratori che sono causa del 70% dei decessi nei pazienti miotonici.

E' molto importante intervenire precocemente con terapie preventive e conservative cardiologiche, respiratorie, endocrinologiche, ortopediche, fisiatriche, foniatriche e dietologiche, al fine di migliorare le prestazioni e la qualità della vita.

Il fenomeno miotonico, quando significativamente invalidante, può migliorare in alcuni soggetti con l'uso di farmaci come la mexiletina [Groh WJ. 2011]; altri farmaci utilizzati, soprattutto in passato, sono il chinino, la difenilidantoina oppure la procainamide. Comunque, poiché queste sostanze possono produrre effetti collaterali secondari depressivi sul ritmo cardiaco, l'opportunità del loro utilizzo terapeutico va valutata caso per caso in relazione all'effettiva gravità del fenomeno miotonico.

A livello cardiologico, si utilizzano farmaci antiaritmici, inotropi, antipertensivi e diuretici; è molto importante valutare in ogni singolo caso il rischio di comparsa di bradicardia o di aritmie ventricolari, che vanno trattate con l'impianto di pacemaker o di defibrillatori intracardiaci [Lau et al. 2015].

Sono necessari periodici controlli della funzionalità respiratoria, sia durante la veglia (spirometria) sia durante il sonno (saturimetria notturna, polisonnografia), al fine di rilevare la necessità di una terapia ventilatoria di supporto quando compaiono ipercapnia e ipossie diurne e/o notturne per ridotta forza dei muscoli respiratori.

L'eccessiva sonnolenza diurna può essere fastidiosa e importante in pazienti con DM1. Farmaci specifici come il Modafinil possono essere d'aiuto, anche se gli effetti di trattamento sono stati modesti [Hilton-Jones et al. 2012].

La cataratta può essere trattata con l'intervento chirurgico. Dal punto di vista nutrizionale, l'alimentazione va ottimizzata al fine di evitare sovraccarichi di peso; non è controindicata una regolare attività fisica, ma essa deve essere submassimale.

Riassumendo, il paziente affetto da distrofia miotonica, anche se non presenta complicazioni significative, è importante si sottoponga a controlli annuali neurologici, cardiologici - con elettrocardiogramma, ECG-Holter ed ecocardiogramma - e pneumologici. Sono inoltre necessarie la valutazione oculistica ed endocrinologica, con un controllo del profilo glicemico, epatico, lipidico, e degli ormoni tiroidei. In caso di alterazione del profilo lipidico, cautela deve essere impiegata nella prescrizione di farmaci

quali statine o fibrati, con attenta valutazione del rapporto rischio/beneficio in ogni singolo caso, per la loro possibile tossicità muscolare.

In molti casi può essere utile un supporto psicologico, anche per la famiglia, quando prevalgono alterazioni delle personalità e del tono dell'umore. In tali condizioni, non sono controindicati in modo assoluto i farmaci antidepressivi, come gli SSRI.

Infine, è importante segnalare che il rischio anestetico durante anestesia generale è aumentato nei pazienti miotonici, a causa di un prolungato recupero respiratorio nel post-operatorio e dell'aumentato rischio di complicanze infettive polmonari.

## **2.4. La Fatica Muscolare**

### **2.4.1. Il concetto di Fatica**

L'uso intenso dei muscoli, che sono gli elementi motori dei movimenti e della forza, porta ad un progressivo calo della performance motoria; affinché ci sia un recupero di tale performance, è necessario un periodo di riposo. Questo fenomeno reversibile è denominato "affaticamento muscolare".

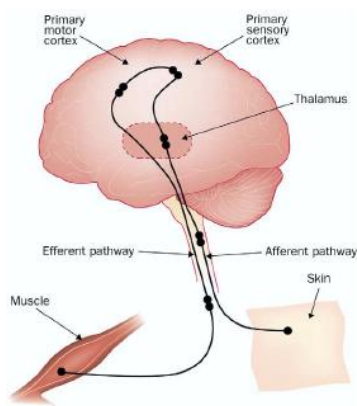
La percezione della fatica è soggettiva: non esiste una definizione universalmente condivisa [Chaudhuri & Behan 2004] nonostante sia uno dei problemi più comuni incontrati nella pratica clinica della popolazione generale [Miller 2006]. Da un punto di vista clinico, la fatica può essere definita come stanchezza fisica e/o mentale risultante da uno sforzo, cioè un'incapacità di continuare un esercizio alla stessa intensità con conseguente riduzione della performance motoria [Evans & Lambert 2007]. I pazienti descrivono la fatica come un opprimente senso di stanchezza, mancanza di energia, e sensazione di esaurimento fisico [Kalkman et al. 2005]. Questo sintomo viene distinto dalla debolezza e non necessariamente correla con la cosiddetta fatica "fisiologica", la quale è definita come una riduzione esercizio-indotta nella forza muscolare volontaria massimale [Gandevia 2001].

La fatica, è un sintomo comune e disabilitante in numerosi disturbi neurologici, e diventa un fattore determinante di disabilità, influenzando negativamente i pazienti nelle attività di vita quotidiana.

Nelle malattie neuromuscolari, la fatica è un sintomo comune e molto frequente; nonostante questo dato, larga parte degli studi di neuropsicologia si è focalizzata maggiormente sul concetto di invalidità o sulla perdita di qualità della vita, e non è stato affrontato con strumenti validati il problema della fatica sperimentata nelle diverse malattie

neuromuscolari [Kalkman et al. 2005]. Sebbene siano stati fatti studi in pazienti con particolari patologie neuromuscolari, l'impatto della fatica sullo stato di salute connesso alla qualità della vita in questi pazienti non è stato ancora ben studiato.

La fatica muscolare è la conseguenza di fenomeni di diverso tipo che avvengono a livello del sistema nervoso centrale, periferico, e del tessuto muscolare.



**Figura 10:** Integrazione delle vie sensoriali e motorie coinvolte nell'attività fisica.

Per comprendere il concetto di fatica [Chaudhuri & Behan 2004], potremmo considerare lo sforzo volontario come una variabile controllata che è influenzata da molti sistemi di controllo rappresentati da input motivazionali (interni ed esterni) e meccanismi a feedback provenienti dai sistemi motori, sensoriali e cognitivi. Sistemi di controllo supplementari sono rappresentati da fattori ambientali, quali la temperatura, e dall'omeostasi interna. Lo sforzo percepito è un importante feedback per il livello di sforzo applicato. Nell'attività volontaria quindi intervengono sia sistemi sensoriali che motori, e la loro integrità strutturale e

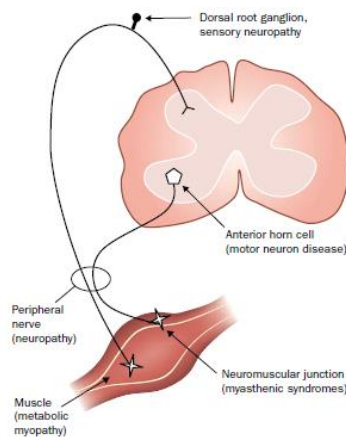
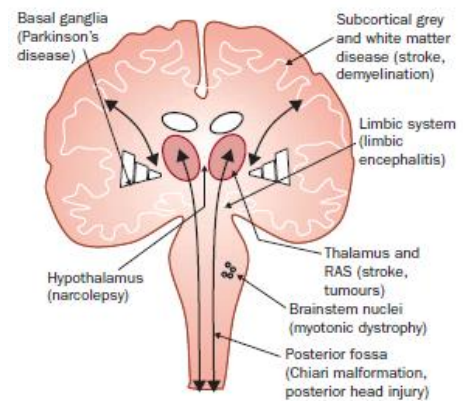
funzionale è fondamentale. Stimoli sensoriali da cute, sistema cardiorespiratorio, apparato muscolo-scheletrico, e organi di senso "speciali" (occhi ed orecchie), forniscono input afferenti. Dopo l'elaborazione cognitiva di queste informazioni, la corteccia motoria primaria attiva i nuclei motori del tronco cerebrale e i motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale (via efferente) (Fig. 10). Il segnale poi dal motoneurone inferiore del midollo spinale raggiunge il muscolo. All'interno del muscolo poi, una serie di eventi metabolici fornisce l'energia chimica necessaria per la contrazione.

Qualsiasi interruzione in questa complessa catena di eventi potrebbe influenzare il livello di sforzo applicato e percepito. La fatica patologica è quindi intesa come un'amplificazione della normale (fisiologica) percezione di fatica che può essere indotta da cambiamenti in una o più variabili regolanti il lavoro in uscita. Quando vi è perdita di interesse e di motivazione, come nella depressione, la percezione personale di fatica è generata principalmente dalla riduzione dell'input interno. Anche con livelli normali di motivazione, di controllo motorio e di input sensoriale, una prematura fatica potrebbe sorgere a causa di una temperatura ambientale sgradevole, di disautonomia, o di un disturbo endocrino sottostante.



La forza, generata dal muscolo scheletrico durante la contrazione, è quindi il risultato di una complessa e concatenata serie di eventi la cui compromissione, a qualunque livello, può contribuire all'insorgenza della fatica muscolare. In base alle cause che la determinano, possiamo distinguere due forme di fatica: centrale e periferica. Si parla di “fatica centrale”, quando la fatica è imputabile a meccanismi che originano nel sistema nervoso centrale, ovvero ad una insufficiente eccitazione-attivazione in tutte quelle strutture nervose corticali e sottocorticali i cui compiti vanno dall'ideazione del movimento, alla conduzione dell'impulso fino al motoneurone spinale (Fig. 11). Non si intende semplicemente un senso di esaurimento fisico: ha anche una componente cognitiva importante (infatti è anche detta fatica mentale). In alcuni pazienti, questa componente è generalmente l'aspetto più invalidante del sintomo, perché si ritrovano limitati nella loro capacità di sostenere la concentrazione e di sopportare compiti mentali. Anche se è un percezione soggettiva, gli effetti della fatica centrale possono essere misurati con una valutazione cognitiva e con l'elaborazione di un compito motorio in un determinato periodo. Negli individui sani, la “fatica centrale” può essere causata da mancanza di motivazione, di energia, disattenzione, o dal dolore.

**Figura 11:** meccanismi fisiologici implicati nella Fatica Centrale.



**Figura 12:** meccanismi fisiologici implicati della fatica muscolare periferica.

Si parla invece “fatica periferica”, quando i fenomeni che la determinano si verificano nel motoneurone spinale inferiore, nella giunzione neuromuscolare (esempio tipico, la Miastenia Gravis) o nella fibrocellula muscolare scheletrica (Fig. 12). In tali casi, la riduzione dell'output di forza muscolare è di solito associato ad ipostenia muscolare, ed è infatti stata chiamata fatica muscolare o miopatica. Riduzione oggettiva della performance motoria, nella fatica muscolare, può essere misurata come il tasso di declino del picco di forza generato durante la massima contrazione muscolare volontaria [Chaudhuri & Behan 2004]. Tra le

cause di fatica periferica possiamo considerare anomalie dell'accoppiamento elettromeccanico, la mancata disponibilità di substrati energetici, un flusso ematico ridotto e il

mancato adattamento all'esercizio che normalmente prevede la vasodilatazione indotta dall'ossido nitrico (NO), nonché le eventuali modificazioni dell'ambiente intracellulare e la rottura dell'apparato contrattile [Angelini & Tasca 2012].

La fatica può essere inoltre classificata in “acuta”, cioè la fatica che segue un sforzo, o essere un fenomeno “cronico”. Nel paziente miopatico, la fatica “acuta”, può insorgere dopo uno sforzo muscolare richiesto per la realizzazione di un determinato compito (come ad esempio salire le scale). Invece, la fatica “cronica” è la conseguenza della perdita di forza muscolare o della capacità di mantenere un certo livello di forza massimale. La fatica acuta può essere conseguente ad un carico eccessivo di lavoro eseguito in breve tempo. C'è spesso la rottura del sarcolemma e la perdita di enzimi sarcoplasmatici, come il CPK. Tuttavia, se tali carichi sono ripetuti e se il recupero muscolare è insufficiente, il paziente può presentare una stanchezza generalizzata, caratterizzata da una debolezza permanente, fino ad arrivare ad uno stato di esaurimento cronico, definito come "fenomeno burnout", che costituisce lo stato ultimo, in cui la sensazione di fatica muscolare può persistere alcune settimane nonostante apparente recupero [Angelini & Tasca 2012].

#### **2.4.2. La fatica nelle malattie neuromuscolari**

Le malattie neuromuscolari (NMDs) sono patologie ereditarie eterogenee del muscolo scheletrico, ma possono coinvolgere anche il sistema nervoso centrale (Distrofia Miotonica) [Angelini & Tasca 2012]. Sono caratterizzate da una progressiva perdita di unità motorie dovuta a differenti meccanismi di degenerazione che si manifestano con una ampia variabilità fenotipica. Oltre il 60% di tutti i pazienti neuromuscolari lamentano fatica muscolare come sintomo comune e precoce di malattia. Tale disturbo ha ripercussioni importanti sulla vita quotidiana, con maggiori problemi sia fisici, di percezione del proprio stato di salute generale, sia sociali [Kalkman et al 2005], portando i pazienti a condurre una vita sempre più sedentaria [Ørngreen et al. 2005].

La fatica muscolare è definita come “*l'incapacità di mantenere il livello atteso di performance motoria nel tempo*” (Allen et al, 2008). È ben noto che i pazienti miopatici hanno difficoltà a sostenere un'attività fisica eccessiva o prolungata; d'altra parte la faticabilità, conosciuta durante l'esercizio di intensità lieve-moderata o di breve durata imposto dalla vita quotidiana, rimane misconosciuta [Angelini & Tasca 2012]. Fatta eccezione per alcuni rari disordini neuromuscolari, caratterizzati da specifiche alterazioni metaboliche che determinano affaticamento muscolare indotto dall'esercizio, ad oggi non

sono ancora del tutto chiari i meccanismi che inducono la fatica periferica in questa popolazione di pazienti.

Molteplici fattori infatti contribuiscono a ridurre le capacità motorie e ad incrementare il comportamento sedentario dei pazienti affetti da malattie neuromuscolari: l'atrofia muscolare secondaria al processo distrofia muscolare stessa; la paura di un maggior danno muscolare che porta sempre più a limitare la mobilità; problemi biomeccanici tra cui retrazione del tendine di Achille, scarso equilibrio, deformità di piede e/o ginocchia; l'aumento della massa grassa corporea indotta dall'inattività fisica. Inoltre, diversi pazienti muscolari presentano una marcata riduzione della capacità polmonare, riduzione dei picchi di consumo di ossigeno, una ridotta funzione cardiaca, per una cardiomiopatia progressiva, e sintomi dovuti alla desaturazione notturna, nell'insieme causanti sonnolenza diurna e fatica muscolare.

Esaurimento fisico durante l'esercizio e fatica, sono tra i più comuni sintomi iniziali riferiti nelle visite mediche dai pazienti con distrofia muscolare, e rappresentano i fattori più significativi nell'influenzare negativamente la qualità della vita dei pazienti miopatici. Scale specifiche per la valutazione della fatica muscolare sono quindi utili negli studi clinici e dovrebbero esser aggiunte nella pratica clinica di gestione del paziente.

Una valutazione quantitativa della fatica muscolare non viene comunemente eseguita, forse a causa della natura complessa e della difficoltà di definire e misurare la fatica. Pochi studi hanno esaminato il problema utilizzando tecniche di misurazione oggettiva (RM con sequenze STIR [Angelini & Tasca 2012]: fatica indotta da esercizio, effetto vascolare nel post-esercizio sulla produzione di ossido nitrico, flusso di sangue pre- e post-esercizio). Inoltre, la variabilità dei meccanismi patogenetici alla base delle diverse forme di distrofia muscolare è ben conosciuto e può giocare un ruolo diverso nel determinare modifiche muscolari.

### **2.4.3. Meccanismi fisiopatologici**

Sebbene molti dei meccanismi responsabili della fatica muscolare siano stati ampiamente descritti in letteratura, alcuni aspetti sono tuttora oggetto di studio e di discussione.

La fatica muscolare "periferica" ha un'eziologia multifattoriale e complessa, ancora oggi in parte ignota; coinvolge diversi meccanismi biochimici e dipende fondamentalmente dal tipo di esercizio svolto, dalla durata, dall'intensità dello stesso, e quindi dal tipo di fibre muscolari attivate.

Nella sua genesi sono state proposte ed individuate diverse vie neurobiologiche, (tra cui l'alterazione dell'eccitabilità sarcolemmale, la disponibilità di energia metabolica e l'efficienza della contrazione muscolare [Montes et al. 2011]) spesso interconnesse, che possono determinare un danno a carico del motoneurone, della giunzione neuromuscolare e del muscolo scheletrico stesso.

Poiché l'infiammazione secondaria può essere una caratteristica delle distrofinopatie, si può ipotizzare che la fatica sia associata al dolore muscolare o al rilascio di citochine e CPK. Durante gli studi condotti su pazienti con Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) in terapia con Deflazacort o Prednisone [Angelini & Tasca 2012], l'esagerata risposta di fatica in questi pazienti non è stata attribuita a infiammazione o dolore ma ad una mancanza di forza e debolezza muscolare permanente. Risultati simili si sono osservati in pazienti con alcune forme di sarcoglicanopatia, trattati con Deflazacort.

Evidenze che il ciclo degli acidi tricarbossilici e alcune reazioni di glicolisi dipendano dall'integrità del citoscheletro possono suggerire la presenza di un deficit del metabolismo energetico nella fibra muscolare in degenerazione. È interessante notare che studi di risonanza magnetica spettroscopica al fosforo-31 (31P-MRS) in pazienti con una forma severa di Distrofia Muscolare di Becker (BMD) hanno messo in evidenza un più basso stato energetico dovuto a difetti dell'attività glicolitica nel muscolo scheletrico [Banerjee et al 2010], mentre un altro recente lavoro ha indagato il metabolismo muscolare nei pazienti BMD colpiti in maniera lieve in associazione all'esercizio muscolare. Da questo studio è emerso che i pazienti BMD presentano un incremento del metabolismo anaerobico durante la contrazione submassimale sostenuta e il mantenimento della funzione ossidativa durante il recupero [Tosetti et al, 2011].

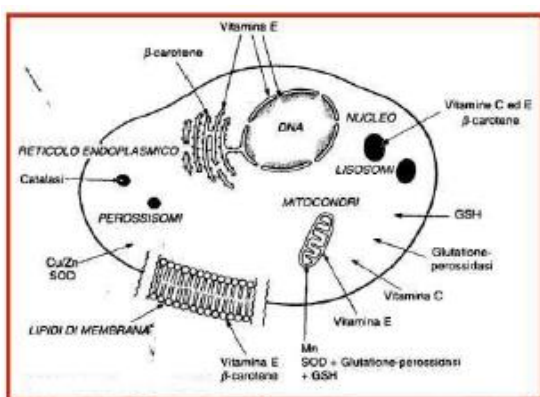
È stato suggerito che l'aumento del lattato nel sangue e la conseguente acidosi lattica dei muscoli scheletrici durante l'esercizio possa essere una delle principali cause di affaticamento muscolare; per almeno 100 anni, il lattato è stato quindi ritenuto meccanismo causale della fatica muscolare. Tuttavia, studi recenti che utilizzano RMN spettroscopica hanno dimostrato che l'acido lattico non ha un effetto negativo sulla contrazione muscolare [Robergs et al, 2004], suggerendo invece che la riduzione del pH intracellulare e l'accumulo di prodotti di idrolisi dell'ATP, in particolare la forma di monovalente del fosfato inorganico, possano svolgere un ruolo inibitorio sulla contrazione muscolare e produrre fatica [Miller 2006].

In alternativa, è stato proposto che variazioni nella concentrazione ionica, per esempio i cambiamenti nella omeostasi del  $Ca^{2+}$  e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel

sarcoplasma, siano responsabili dell'affaticamento muscolare. Numerosi dati di letteratura suggeriscono che il cosiddetto *stress ossidativo* sia la principale causa dell'affaticamento muscolare [Reid, 2008]. Tuttavia, i meccanismi attraverso i quali le ROS possano contribuire alla fatica muscolare risultano essere ancora poco chiari.

Lo stress ossidativo è un meccanismo che sembra essere coinvolto in molti processi patologici umani, implicando uno squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) e le difese antiossidanti dell'organismo [Selmeçci et al. 2005].

Alla base di questo fenomeno c'è la produzione di un grande quantità di specie chimiche ossidanti in grado di interagire sia a livello tissutale che a livello cellulare: tra questi si riconoscono il radicale idrossile ( $\bullet\text{OH}$ ), il superossido e lo ione perossido.



**Figura 13:** Rappresentazione schematica dello stress ossidativo.

In condizioni normali, i livelli e le attività dei ROS sono regolati sia da meccanismi di difesa antiossidanti enzimatici, come la superossido dismutasi (SOD), la glutazione perossidasi (GPX) e la catalasi, sia da dispositivi non enzimatici, come l'acido ascorbico, la vitamina E e il glutathione (Fig. 13) [Siciliano et al. 2002].

Uno studio condotto da Mancuso et al. nel 2006, ha dimostrato che tessuti diversi presentano differente suscettibilità allo stress ossidativo: alcuni, come SNC e muscolo scheletrico, sono molto più vulnerabili a causa del loro elevato consumo di  $\text{O}_2$ . Inoltre, rispetto ad altri tessuti, l'encefalo ha un'inferiore attività di enzimi antiossidanti come la GPX e la catalasi, e contiene elevate concentrazioni di acidi grassi polinsaturi, altamente sensibili alla perossidazione.

Una delle principali fonti di ROS è l'anione superossido ( $\text{O}_2 \bullet^-$ ), il quale può reagire con l'ossido nitrico (NO) per produrre perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), una specie reattiva dell'azoto (RNS) altamente dannosa per il DNA. Il danno ossidativo sul DNA è ritenuto essere altamente deleterio sulle cellule post-mitotiche (come neuroni e miociti), non potendo essere rimpiazzate tramite meccanismi di divisione cellulare.

Un eccesso nella produzione di ROS/RNS nei muscoli induce quindi una condizione di stress ossidativo che danneggia componenti cellulari come DNA, proteine e lipidi, questi eventi si ripercuotono sulla funzione e sull'integrità cellulare. Poiché la contrazione

muscolare richiede una grande quantità di ATP e la maggior parte di ATP viene prodotta dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale, i mitocondri, a livello del muscolo, consumano una quantità di O<sub>2</sub> 100 volte maggiore durante l'esercizio intenso rispetto a quella utilizzata durante il riposo. L'alto tasso di consumo di O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) nei muscoli scheletrici può causare una dispersione di elettroni dalla catena di trasporto mitocondriale durante il processo di fosforilazione ossidativa, portando alla produzione di O<sub>2</sub>- [Kuwahara et al. 2010].

I ROS sono state identificati come mediatori endogeni di fatica muscolare, mettendo in evidenza l'importanza di studi futuri, atti a definire il meccanismo cellulare di azione delle ROS con l'obiettivo di identificare nuove molecole antiossidanti a scopo terapeutico [Kuwahara et al. 2010; Leelarungrayub et al, 2011] .

La via dell'ossido nitrico (NO) è implicata anche nella genesi della fatica muscolare in pazienti affetti da NMDs.

L'ossido nitrico, sintetizzato a partire da L-arginina attraverso una reazione catalizzata dall'ossido nitrico sintasi (NOS), è un mediatore biologico implicato in molteplici funzioni tra cui la trasduzione del segnale e la protezione delle cellule dall'intermedio reattivo dell'ossigeno; inoltre, a livello del muscolo, regola la vasodilatazione e il flusso sanguigno. E' stato ipotizzato che la perdita della normale produzione di NO nel muscolo distrofico possa avere un effetto negativo sulla funzione muscolare [Tidball & Wehling-Henricks 2004].

E' stato inoltre dimostrato che modificatori genetici possono essere implicati nel complesso meccanismo dei diversi gradi di fatica muscolare. Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA1) è un trasportatore Ca<sup>2+</sup>/ATPasi-dipendente situato nel reticolo sarcoplasmatico (SR) delle fibre di tipo II a contrazione rapida, come mostrato in pazienti affetti da malattia di McArdle [Nogales-Gaeta et al, 2012]. Il corepressore-1 nucleare (NCoR1) gioca un ruolo adattativo nella fisiologia del muscolo, controllando l'attività di molti fattori di trascrizione; lo spegnimento del gene NCoR1 potrebbe essere utilizzato per migliorare la funzione muscolare. La perdita muscolo-specifica di NCoR1 in modelli murini, induce una miglior resistenza fisica grazie ad un aumento sia della massa muscolare che ad un aumento del numero dei mitocondri e dell'attività mitocondriale [Yamamoto et al, 2011].

#### **2.4.4. Componenti Centrali e Periferiche della Fatica nella DM1**

Nella DM1 una diminuita resistenza alla fatica può rappresentare un significativo aspetto funzionale. Quale che sia il meccanismo patogenetico alla base della malattia, nella comprensione dei meccanismi della fatica muscolare, oltre alle alterazioni della contrattilità muscolare connesse al processo distrofico, va considerata la simultanea presenza dell'anomalia del rilasciamento muscolare imputabile al fenomeno miotonico.

Tra le varie manifestazioni cliniche di questa complessa patologia neuromuscolare, la maggior parte dei pazienti con DM1 riferiscono, come sintomi precoci, sonnolenza diurna e fatica muscolare, ovvero un anormale senso di stanchezza indotta da un compito mentale o fisico.

Muscolo e SNC sono coinvolti indipendentemente nella DM1, di conseguenza, due forme distinte di fatica muscolare sono possibili nella DM1: una fatica "centrale" dovuta ad atrofia corticale ed a lesioni della sostanza bianca (Fig. 11), ed una fatica "periferica" causata da atrofia delle fibre muscolari (Fig. 12). Queste due componenti di fatica muscolare sono variamente espresse nei pazienti miotonici.

Durante compiti motori, la fatica è definita come 'incapacità a mantenere lo sforzo richiesto' e nella DM1 le due componenti della fatica, centrale e periferica, spesso coesistono [Angelini & Tasca 2012]. Come precedentemente spiegato, per fatica 'centrale' si intende una progressiva riduzione dell'attivazione muscolare volontaria durante l'esercizio relativa a fattori corticali. È presente un peggioramento dell'attivazione centrale durante una contrazione sostenuta massimale e ciò può essere relazionato alla sonnolenza diurna, all'apatia ed ai disturbi del tono dell'umore di cui questi pazienti soffrono [Orngreen 2005].

Invece l'altra componente della fatica, detta "periferica", deriva da un alterata funzione muscolare. Varie tecniche elettrofisiologiche sono state sviluppate per valutare il rispettivo coinvolgimento di questi diversi fattori nello spiegare la fatica muscolare in questa patologia. Studi anatomopatologici di tessuto muscolare in soggetti con DM1 hanno mostrato sia atrofia preferenziale delle fibre di tipo I sia perdita selettiva delle fibre tipo II, probabilmente a seconda dei muscoli sede di biopsia e dello stadio di severità di malattia, ma l'entità della fatica muscolare non è proporzionale al coinvolgimento muscolare o all'atrofia delle fibre.

Accentuazione della sonnolenza diurna e della fatica sono tra i più frequenti disturbi riferiti dai pazienti miotonici. L'ipostenia dei muscoli orofaringei e respiratori porta allo sviluppo della sindrome delle apnee ostruttive del sonno (OSAS) e ad ipoventilazione alveolare che

vengono considerati come fattori causali di sonnolenza diurna. Comunque, vi è una sempre maggior evidenza che tale senso di debolezza risulti soprattutto da una disfunzione del sistema nervoso centrale, piuttosto che da una debolezza respiratoria progressiva. Queste considerazioni suggeriscono che uno studio in parallelo sul coinvolgimento di sistema nervoso centrale e il muscolo sia necessario per definire la fatica muscolare nella DM1. L'unico studio che collega NOS e distrofia miotonica suggerisce che, anche se per l'induzione di DMPK, espressa durante miogenesi, NOS sia necessaria, c'è solo una debole implicazione funzionale nel generare e successivamente mantenere l'espressione di DMPK [Angelini & Tasca 2012]. Al fine di approfondire la simultanea compromissione muscolare e cerebrale nei pazienti con DM1, Angelini e Tasca (2012) hanno studiato un campione di pazienti miotonici suddivisi per classi di espansione CTG sottoponendoli per il quadro muscolare a biopsia (evidenza di centralizzazione dei nuclei e atrofia delle fibre tipo 1) e per la compromissione cerebrale a MRI (evidenza di atrofia corticale e lesioni diffuse a carico della sostanza bianca), concludendo che una maggiore classe di espansione CTG è un fattore di rischio confermato per un più esteso coinvolgimento cerebrale e muscolare.

Sono stati identificati oligonucleotidi antisenso (AON), la maggior parte di loro complementari con l'espansione del nucleotide CUG coinvolto nella DM1 che riducono i foci ribonucleari intranucleari sequestranti MBNL e che sono alla base dello splicing aberrante/alternativo. Questi AON in modelli animali entrano nel muscolo scheletrico in maniera molto efficiente, ma il problema della componente centrale della fatica in DM1 non viene risolto da tale approccio.

Quando a un paziente viene diagnosticata una distrofia muscolare, le domande che tipicamente sorgono riguardano la prognosi, i possibili interventi e la genetica. Debolezza fisica e funzione cardio-polmonare compromessa sono comuni nei pazienti con distrofie muscolari. I benefici del praticare strength training o esercizio aerobico nelle distrofie non è stato ancora del tutto chiarito. Le sole due condizioni in cui strength training è stato studiato sono la DM1 e la Distrofia facio-scapolo-omero-merale (FSHD) [Angelini & Tasca 2012], in cui tali attività non sembrano danneggiare il muscolo ma allo stesso tempo non ci sono prove sufficienti per concludere che offrano benefici. Ørngreen et al. (2005) hanno comunque documentato che l'allenamento fisico aerobico è importante nei pazienti DM1 perché aumenta significativamente la performance cardiovascolare, la resistenza, e le attività di vita quotidiana autovalutate dai pazienti, oltre a prevenire una conseguente atrofia muscolare da disuso.



## **2.5. Creazione di un Registro Nazionale di malattia**

La difficoltà nella caratterizzazione e nel reclutamento dei pazienti è stato uno degli ostacoli nella conduzione di studi di storia naturale di malattia, di correlazione genotipo-fenotipo e nella selezione dei pazienti per i trials clinici nell'ambito delle malattie neuromuscolari [Tawil et al., 2010]. Negli ultimi anni, è emersa pertanto la necessità di creare Registri dedicati alla raccolta di informazioni in merito ai pazienti affetti da malattie rare e già numerosi Registri sono attivi in Italia nell'ambito delle malattie neuromuscolari. Per quanto concerne la DM1, attualmente esiste un modello di Registro negli Stati Uniti e sono in corso di definizione Registri di malattia in altri paesi della Comunità Europea. In Italia, un Registro Nazionale per le Distrofie Miotoniche è in fase di realizzazione, nell'ambito di un progetto multicentrico nazionale del Ministero della Salute (Protocollo N. RF-2010-2314711 RIDM) che vede coinvolto anche il Centro per le Malattie Neuromuscolari della Clinica Neurologica di Pisa.

Nello specifico, il progetto ha l'obiettivo di creare un Registro informatico che raccolga dati anagrafici, clinici, genetici e relativi alla qualità di vita dei pazienti affetti da DM1, senza limiti di età, al fine di fornire una fonte globale ed unificata di informazioni aggiornate su tali pazienti nel territorio italiano. La creazione di questo Registro fornirà gli strumenti per stabilire un contatto tra le persone con DM1 e i medici e i ricercatori che si occupano di questa patologia, facilitando questi ultimi nelle loro attività di studio, assistenza e cura. In particolare, con questo progetto si intendono ottenere dati clinici e molecolari utili per identificare un ampio numero di pazienti potenzialmente idonei per prender parte a studi di ricerca, così da porre le basi per la creazione di trials clinici nazionali e internazionali, finalizzati al raggiungimento di standard diagnostici ed assistenziali di livello elevato. Lo scopo è inoltre quello di raccogliere ordinatamente notizie aggiornate che possano contribuire a effettuare studi epidemiologici, a definire la storia naturale della DM1 e ad assicurare ai pazienti la presa in carico globale della loro malattia, oltre che a mantenerli regolarmente informati in merito ai progressi della ricerca scientifica. Infatti ai singoli pazienti, dopo la creazione del proprio account personale, verrà assegnato automaticamente un codice identificativo, che garantirà l'anonimato dei propri dati, e grazie ad esso potranno accedere in ogni momento al sito del Registro informatico per rimuovere o modificare i propri dati.

I dati richiesti, previa acquisizione di consenso informato, sono relativi alla raccolta di informazioni inerenti l'anamnesi personale e familiare del paziente e agli esiti delle valutazioni cliniche, degli esami di laboratorio e delle indagini e strumentali la cui

esecuzione è normalmente raccomandata per il follow-up delle persone affette da patologie che comportano un interessamento multisistemico come la DM1.

I benefici di tale studio riguardano aggiornamento, approfondimento ed ampliamento delle attuali conoscenze nell'ambito della DM1; facilitazione dello sviluppo e della realizzazione di nuovi studi di ricerca e trials clinici; miglioramento della qualità dell'assistenza e delle cure ai pazienti affetti da questa malattia e assicurazione del miglior standard delle stesse al maggior numero di persone possibile; incremento della possibilità di trovare nuove strategie terapeutiche per la lotta alla malattia.

### **3. OBIETTIVI E DISEGNO DELLO STUDIO**

Nell'ambito del progetto multicentrico finalizzato alla creazione di un Registro Nazionale di malattia per le distrofie miotoniche, l'obiettivo della presente tesi è stato quello di definire un protocollo per la caratterizzazione clinica e funzionale della fatica muscolare nei pazienti affetti da DM1.

Nello specifico, il presente studio si è proposto di indagare, in un gruppo di pazienti DM1 seguiti presso l'Ambulatorio per le Malattie Neuromuscolari della Clinica Neurologica di Pisa, la dimensione clinimetrica della "fatica muscolare" e l'interferenza che ha sulla qualità di vita, attraverso l'utilizzo di scale cliniche dedicate e standardizzate. E' stato inoltre utilizzato un protocollo di esercizio fisico per la fatica muscolare mediante un protocollo di test da sforzo incrementale dinamico con miometro che ha valutato parametri biometrici e biochimici connessi alla contrazione muscolare e al fenomeno della fatica, fornendo un profilo oggettivo di quest'ultimo, da correlare con le scale soggettive di valutazione clinica utilizzate.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1. Reclutamento pazienti

Sono stati inclusi nello studio descritto in questa tesi 26 soggetti con diagnosi clinica e genetica di Distrofia Miotonica tipo 1, 17 maschi (età media in anni  $\pm$  deviazione standard:  $40,53 \pm 14,69$ ) e 9 femmine (età media in anni  $\pm$  deviazione standard:  $43,78 \pm 11,37$ ), seguiti presso l'Ambulatorio per le Malattie Neuromuscolari della Clinica Neurologica di Pisa (Tab. 1).

### 4.2. Protocollo di studio

#### *Valutazione clinica e Questionari.*

Ciascun paziente è stato valutato presso l'Ambulatorio per le Malattie Neuromuscolari della Clinica Neurologica dell'Università di Pisa, con anamnesi ed esame obiettivo neurologico, comprensivo della scala MRC (Tab. 1) [Medical Research Council, 1943], eseguita su 17 gruppi muscolari degli arti superiori, degli arti inferiori e del collo, per la valutazione clinica della forza muscolare.

Il deficit motorio è stato quindi classificato sulla base della Muscular Impairment Rating Scale (MIRS) (Tab. 1-2) [Mathieu et al. 2001].

**Tab. 2: Muscular Impairment Rating Scale (MIRS)**

Grado	Descrizione
1	Non deficit neuromuscolare
2	Segni minimi (miotonia, ipotrofia masseterino-temporale, deficit mm. mimici del volto, debolezza dei flessori del collo, ptosi, rinolalia, non deficit distale tranne debolezza dei flessori delle dita)
3	Debolezza distale (non debolezza prossimale eccetto deficit isolato del tricipite brachiale)
4	Deficit di forza prossimale, da lieve a moderato
5	Severo ( $MRC \leq 3/5$ ) deficit di forza prossimale

Ai soggetti in studio sono stati somministrati questionari per una valutazione della esperienza soggettiva di fatica muscolare nella DM1:

- INQoL - Individualized Neuromuscular Quality of Life [Sansone et al 2010], questionario clinico standardizzato formulato per determinare come e quanto il disturbo muscolare condizioni la vita del paziente. Di interesse nel nostro studio, in particolare, sono stati i domini indaganti gli aspetti di “Debolezza” e “Stanchezza” (domande 1 e 4);

- FSS - Fatigue Severity Scale [Krupp et al. 1989], scala clinica che permette una valutazione della severità della fatica muscolare percepita;
- ESS - Epworth Sleepiness Scale [Vignatelli et al. 2003], scala di valutazione della sonnolenza diurna, come possibile fattore concomitante al sintomo fatica muscolare.

### *INQoL- Individualized Neuromuscular Quality of Life*

Al fine di comprendere l'esperienza personale del sintomo fatica muscolare nei pazienti affetti da DM1, abbiamo sottoposto il nostro campione in studio all'Individualized Neuromuscular Quality Of Life - INQoL- questionario specifico per la qualità di vita in pazienti affetti da malattie neuromuscolari [Sansone et al 2010]. In particolare, di nostro interesse sono state le domande 1 e 4 che, rispettivamente, indagano in maniera specifica la debolezza e la fatica muscolare soggettivamente percepite.

L'INQoL è composto da 10 elementi o "items" mirati a valutare le compromissioni fisiche e psicosociali del paziente legate alla malattia muscolare stessa. Nel processo di validazione in Italia, INQoL dimostrato buona affidabilità, coerenza interna e validità psicométrica [Sansone et al. 2010]. Alcune domande dello stesso questionario sono state somministrate ai familiari non affetti del paziente (o a una figura accudente di riferimento), perché esprimessero un parere obiettivo sulle condizioni del paziente.

Il punteggio totale (da 0 a 298) dell'INQoL si calcola sommando i punteggi dei singoli "items" e indica l'impatto della malattia percepito dal paziente sulla propria qualità di vita. La disabilità fisica è valutata dagli "items" (1-4) che si riferiscono all'impatto dei sintomi più comuni della malattia muscolare, come debolezza, dolore e fatica. Limitazioni psicosociali nelle attività quotidiane sono indagati dagli "items" (5-9) che si riferiscono all'impatto di sintomi muscolari sui domini di vita quotidiana, come attività, indipendenza, relazioni sociali, emozioni e immagine corporea. L'ultima sezione (10) riguarda il trattamento, i suoi effetti e le aspettative. I partecipanti rispondono ai vari quesiti utilizzando i sette punti della Scala Likert, permettendo così di ottenere un punteggio ponderato per ogni paziente in ciascuna sezione [Sansone et al. 2012]. I punteggi assoluti per singola sezione e totali vengono abitualmente espressi come percentuale sul punteggio massimo per rendere più facile l'interpretazione: una percentuale maggiore è indicativa di un maggiore impatto negativo sulla qualità della vita.

Non essendo attualmente disponibile un test formulato per indagare l'anosognosia come aspetto specifico, questa è stata valutata tramite il calcolo dei punteggi di discrepanza tra le risposte del paziente e quelle del familiare al questionario InQoL.

#### *FSS-Fatigue Severity Scale*

La "Fatigue Severity Scale" (FSS) è la scala di valutazione più utilizzata dai neurologi per valutare l'entità della fatica. Serve per stimare la gravità del sintomo, valutando l'impatto della fatica muscolare sulle attività di vita quotidiana [Krupp et al. 1989]. È composta da nove "items" (I-IX), selezionati per identificare caratteristiche comuni di affaticabilità quotidiana, ai quali il paziente risponde, con un punteggio da 1 ('scarso accordo') a 7 ('forte accordo') della scala Likert, in base a quanto ciascuna delle 9 frasi elencate concordi col proprio stato di salute attuale.

Il cut-off per stabilire se la percezione soggettiva di fatica muscolare sia da considerare molto o poco rilevante è stato stabilito a 4,6 [Krupp et al. 1989; Flachenecker et al. 2002; Zifko et al. 2002].

Questa scala ha dimostrato elevata coerenza interna, validità adeguata e buona affidabilità nella valutazione del sintomo "fatica muscolare" percepito dai pazienti affetti da DM1 [Hermans et al. 2013].

#### *ESS-Epworth Sleepiness Scale*

La scala di valutazione ESS è stata sviluppata per valutare il livello generale di sonnolenza diurna, concettualmente definito come propensione al appisolarsi o addormentarsi. Essa si compone di otto "items" (a-h), ciascuno dei quali si riferisce alla probabilità di addormentarsi in 8 situazioni di usuali abitudini di vita dell'ultimo periodo, indipendentemente dalla sensazione di stanchezza.

I pazienti hanno dovuto scegliere il punteggio più adatto ad ogni situazione riportata (0= non mi addormento mai; 1=qualche probabilità; 2=discreta probabilità; 3=alta probabilità di addormentarmi).

È stato stabilito come cut-off indicativo di sonnolenza diurna eccessiva un punteggio totale > 10 [Johns MW. 1992].

Una buona affidabilità è stata dimostrata per la ESS in soggetti con disturbi respiratori del sonno, disturbi primari del sonno, e in soggetti sani. Tuttavia, nella DM1, una debole validità interna è stata segnalata, forse perché alcuni elementi risultano irrilevanti o inappropriati per pazienti affetti da DM1 [Hermans et al. 2013].

### ***Protocollo di esercizio muscolare.***

Al fine di valutare l'andamento dei valori ematici di acido lattico, CPK e parametri di stress ossidativo in relazione all'esercizio muscolare, ai pazienti è stato proposto un test da sforzo intermittente dei muscoli dell'avambraccio, a carico incrementale, eseguito con l'ausilio di un miometro connesso ad un "hand-grip" (Fig. 14) (digital Multi-Myometer, MIE Medical

**Figura 14:** Miometro connesso ad un "hand-grip"



research Ltd., Leeds, UK). L'esercizio doveva essere effettuato in posizione seduta e possibilmente con l'arto dominante, in condizioni di digiuno. L'arto testato è stato fatto appoggiare su un piano con imbottitura, in maniera tale che si trovasse approssimativamente a livello del cuore, con l'avambraccio esteso sul braccio e con la superficie volare di quest'ultimo rivolta verso l'alto.

Dopo aver chiesto al paziente di compiere alcune lievi contrazioni di apertura e chiusura della mano per circa due-tre minuti, al fine di ridurre l'entità del fenomeno miotonico (fenomeno del "warm-up"), è stato determinato il livello di Contrazione Volontaria Massimale (CVM), invitando il paziente ad impugnare l'"hand-grip" del miometro e a contrarre massivamente la mano contro la resistenza offerta dallo stesso. È stato quindi determinato il livello di CVM di ciascun paziente, espresso in Newton, come la media dei tre valori di forza massimali ottenuti in tre tentativi della durata di cinque secondi ciascuno, eseguiti a distanza di cinque minuti l'uno dall'altro. Dopo un periodo di riposo della durata di 20 minuti, i pazienti sono stati nuovamente invitati a compiere alcune lievi contrazioni di apertura e chiusura della mano per circa due-tre minuti per ridurre l'entità del fenomeno miotonico (fenomeno del "warm-up") prima di iniziare il test da sforzo muscolare. Il protocollo di esercizio muscolare a carico incrementale consisteva nell'esecuzione di una serie di fasi contrattili o "steps" condotte in maniera intermittente per un periodo di 1 minuto ciascuna, con intervalli di riposo di 2 minuti tra uno "step" e l'altro. In ciascuno "step", al paziente veniva richiesto di stringere in modo intermittente l'"hand-grip" contro la resistenza offerta dal miometro, alla frequenza di una contrazione al secondo. L'esercizio prevedeva un primo "step" al 20% della CVM, un secondo "step" al 40% ed un ultimo "step" al 60%. Il paziente poteva seguire su un display luminoso il livello di forza generato in ogni contrazione. Dopo 3-4 minuti dal termine dell'esercizio, è stata quindi rivalutata la CVM del paziente con un singolo tentativo della durata di 5 secondi.

Questo tipo di esercizio è principalmente aerobico all'inizio del test e diviene progressivamente anaerobico man mano che aumenta la forza esercitata per progressivo reclutamento delle unità motorie rapide [Milner-Brown et al. 1973].

### 4.3. Valutazione di parametri biochimici

Ciascun paziente è stato sottoposto a prelievi ematici venosi dalle vene antecubitali del braccio in condizioni basali e al termine del protocollo di esercizio. Sono stati valutati i seguenti parametri biochimici: acido lattico, CPK e *markers* di stress ossidativo quali prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP), capacità ferro-riducente del plasma (FRAP) e tioli plasmatici totali (-SH).

#### *Dosaggio plasmatico dell'acido lattico*

L'acido lattico è il risultato finale della glicolisi anaerobica. È prodotto dai muscoli al raggiungimento della soglia anaerobica sotto sforzo e rappresenta la fonte principale di energia di alcuni tessuti. La tecnica impiegata per la determinazione dell'acido lattico si basa su una metodica colorimetrica enzimatica (*Metodo Trinder*) e il campione impiegato è plasma raccolto in provette contenente eparina o EDTA.

Il lattato è un metabolita intermedio della glicolisi coinvolto nel mantenimento del pH del sangue.

La lattato ossidasi libera perossido d'idrogeno che, in presenza di perossido e con 4-aminoantipirina (4- AAP) e N-etil-N-sulfopropil-m-amisidina (ESPAS), può produrre un composto colorato.

L'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di lattato presente nel campione e viene misurata mediante uno spettrofotometro (valori di riferimento del laboratorio: v.n. basale 4,5-19,8 mg/dl).

#### *Dosaggio plasmatico dei Prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP)*

La determinazione di AOPP è una metodica che consente di stimare la quantità di proteine che hanno subito un processo di ossidazione, a livello di specifici residui amminoacidici, da parte di specie chimiche reattive.

Il sangue venoso dei pazienti, prelevato a digiuno, è stato centrifugato (3000 rpm) per 10 minuti. Il plasma così ottenuto è stato conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento del dosaggio, che è stato effettuato entro un mese dalla raccolta del campione. La determinazione dei



AOPP è stata eseguita su una piastra da 96 pozzetti (Costar), con l'ausilio di un lettore di piastre (VICTOR3, Perkin Elmer), seguendo il protocollo descritto da Witko-Sarsat et al. (1996). Brevemente, a 200 µl di plasma diluiti 1:5 in tampone fosfato di Dulbecco (PBS) sono stati aggiunti 20 µl di acido acetico seguiti da 10 µl di ioduro di potassio 1,16 M. Il valore di assorbanza a 340 nm di tale miscela di reazione è stato immediatamente determinato. A quest'ultimo è stato sottratto il valore di assorbanza di un bianco, costituito da 200 µl di PBS, al quale sono stati aggiunti 20 µl di acido acetico e 10 µl di ioduro di potassio 1,16 M. La curva di calibrazione è stata allestita utilizzando diluizioni scalari di una soluzione di cloramina T 0,1 mM in PSB, ed i valori di AOPP sono stati espressi come nmol/ml di equivalenti di cloramina T. (Valori di riferimento del laboratorio: v.n. basale 124,5-190,5 nmoli/ml).

#### *Dosaggio plasmatico della Attività ferro-riducente del plasma (FRAP)*

La determinazione della FRAP è una metodica che permette di valutare la capacità anti-ossidante del plasma, intesa come capacità di ridurre lo ione ferrico, presente nel reattivo FRAP, in ione ferroso. Il sangue venoso dei pazienti, prelevato a digiuno, è stato centrifugato (3000 rpm) per 10 minuti per ottenere il plasma, il quale è stato conservato a -80°C fino al momento del dosaggio, che è stato effettuato entro un mese dalla raccolta del campione. La determinazione della FRAP è stata eseguita su una piastra da 96 pozzetti (Costar), con l'ausilio di un lettore di piastre ELISA (VICTOR3, Perkin Elmer) seguendo il protocollo descritto da Benzie e Strain (1996). Per la preparazione del reattivo FRAP sono stati miscelati i seguenti reagenti:

- 10 volumi di tampone sodio-acetato 300 mM, pH 3,6;
- 1 volume di tripiridiltriazina 10 mM, disciolta in acido cloridrico 40 mM;
- 1 volume di cloruro ferrico 20 mM, disciolto in acqua.

Il reattivo ottenuto è stato scaldato per 10 minuti a 37°C, quindi 250 µl sono stati aggiunti a 8 µl di plasma di ciascun campione. L'assorbanza della miscela di reazione è stata valutata alla lunghezza d'onda di 620 nm, quindi è stato sottratto il valore di un bianco costituito da 100 µl di acido cloridrico 10 mM, ai quali sono stati aggiunti 250 µl di reattivo FRAP. La curva di calibrazione è stata allestita utilizzando una diluizione scalare di una soluzione di solfato di ferro 4 mM in acido cloridrico 10 mM. I valori della FRAP sono stati espressi in mmol/L (Valori di Riferimento del laboratorio: v.n. basale >0,7 mmoli/l).

#### *Dosaggio plasmatico dei Gruppi tiolici plasmatici totali (-SH)*

Il contenuto delle proteine plasmatiche, allo stato ridotto, è stato stimato tramite la determinazione della concentrazione dei gruppi sulfidrilici (-SH) presenti nelle molecole, seguendo il protocollo descritto da Hu (1994).

Il sangue venoso dei pazienti, prelevato a digiuno, è stato centrifugato (3000 rpm) per 10 minuti per ottenere il plasma, il quale è stato conservato a -80°C fino al momento del dosaggio, che è stato eseguito entro un mese dalla raccolta del campione. Al momento della determinazione, a 50 µl di plasma sono stati aggiunti 150 µl di Tris-EDTA, 10 µl di acido 2,2-ditiobisnitrobenzoico (DTNB) e 3,16 ml di metanolo assoluto. Successivamente è stata effettuata un'incubazione a temperatura ambiente di 15 minuti, alla fine della quale il campione è stato centrifugato a 5400 rpm per 10 minuti. L'assorbanza del supernatante di ciascun campione è stata valutata, mediante l'ausilio di un lettore di piastre ELISA (VICTOR3, Perkin Elmer), ad una lunghezza d'onda di 412 nm, alla quale è stato sottratto il valore di un bianco costituito da DTNB. I valori dei tioli sono stati espressi in nmoli/µl. (valori di riferimento del laboratorio: v.n. basale 0,4-0,6 µmol/l)

#### **4.4. Analisi Statistica dei risultati**

Per ciascun parametro clinico-laboratoristico è stato calcolato il valore medio e la deviazione standard. Il confronto dei valori plasmatici di ciascun parametro biochimico analizzato, dei pazienti vs controlli in condizioni basali e dei valori misurati al tempo 0 vs al 60% della CVM, è stato eseguito per mezzo del test “*t di Student*” per campioni indipendenti a dati appaiati.

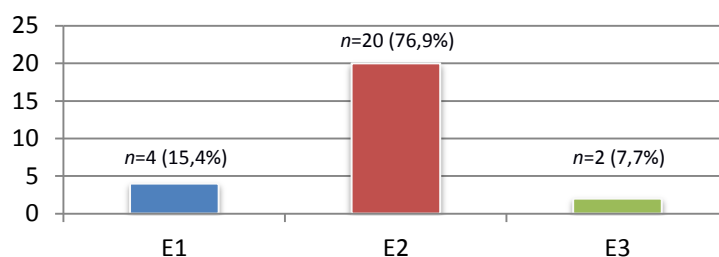
L'analisi statistica e l'elaborazione dei dati è stata condotta con il programma SPSS per Windows (versione 11.0). Statistiche descrittive sono stati usate per descrivere la campione. Abbiamo utilizzato test t, test chi quadrato, e le analisi della varianza (ANOVA) per verificare le differenze tra i gruppi. Le correlazioni sono state calcolate con il Coefficiente di Pearson (*r*) per le variabili parametriche e con il Coefficiente di Spearman (*rho*) per le variabili non parametriche. Per analizzare la relazione tra gli aspetti fisici, psichici e sociali della fatica muscolare, è stato calcolato un modello di regressione lineare. La significatività statistica è stata fissata per  $p < 0,05$  (5%),  $p < 0,01$  (1%) e  $p < 0,001$  (0.1%)

## 5. Risultati

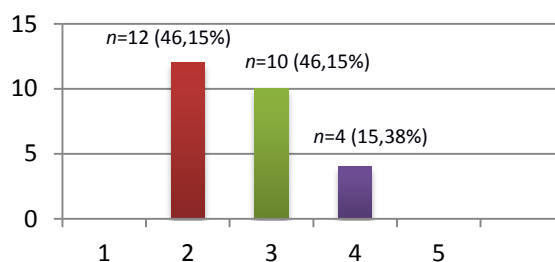
Il campione preso in esame era caratterizzato da 17 maschi e 9 femmine con un'età (in anni, media  $\pm$  deviazione standard) di  $41,65 \pm 12,74$  ed un BMI (in Kg/m<sup>2</sup>, media  $\pm$  deviazione standard medio) di  $24,9 \pm 5,63$  affetti da Distrofia Miotonica tipo 1, diagnosticata sulla base del quadro clinico, della storia familiare, dei dati strumentali e dell'analisi genetica (Tab. 1).

L'analisi del DNA genomico ci ha permesso di stratificare il campione in base al tipo di mutazione: - classe E1: pazienti con espansioni CTG < 150 (4 pazienti, 15,4%); - classe E2: pazienti con 150-1000 espansioni CTG (20 pazienti, 76,9%); - classe E3: pazienti con espansioni CTG > 1000 (2 pazienti, 7,7%) (Fig. 15).

**Figura 15: Classe espansione trinucleotidica CTG**



**Figura 16: MIRS**



Iniziali Pz	Sesso	Classe Espansione Trinucleotidica	Età Esordio Sintomi Muscolari (Anni)	Età Valutazione (Anni)	Mirs	Mrc Muscoli Arto Superiore Testato	Bmi (Kg/M²)	Comorbidità	Terapia
1. F.A.	M	E1	36	52	2	fa:5; ea:5; fp:5; ep:5; fd: 5; ed: 5	29,99	Disfagia lieve, BAV 1°, cataratta operata, patologia tiroidea, alvo irregolare, sonnolenza diurna.	Mexiletina, Eutirox, Carnitina
2. F.I.	F	E1	7	46	2	fa:5; ea:5; fp: 4+; ep: 4+; fp: 4; ep: 4	25,35	Disfagia lieve, dislipidemia, lieve >GGT, alvo irregolare, noduli tiroidei, sonnolenza diurna, endometriosi. Colectomia.	-
3. P.J.	M	E1	15	30	2	fa:5; ea:5; fp:5; ep:5; fd: 5; ed: 5	27,68	OSAS, VMNI	-
4. C.M.	M	E2	13	30	2	fa:5; ea:5; fp:5; ep:5; fd: 5; ed: 5	25,95	Appendicectomia	-
5. F.B.	F	E1	55	55	2	fa:5; ea:5; fp:5; ep:4; fd: 5; ed: 4	20,80	Nodulo tiroideo	-
6. B.E.	M	E2	15	18	3	fa:5; ea:5; fp: 4; ep: 4; fd: 3; ed: 3	21,55	Disfagia, incontinenza fecale, rara extrasistolia sopraventricolare.	-
7. B.M.	M	E2	49	51	3	fa: 5; ea: 5; fp: 3; ep:4; fd: 3; ed: 3	23,94	HIV, anemia, iperomocisteinemia, TVP, lieve disfagia, rara extrasistolia ventricolare e sopraventricolare, lieve sonnolenza diurna, >GGT.	Etravirina, Darunavir, Ritonavir, Pantoprazolo, Ferroso solfato, Acido folico, Vitamina B12 e B6, terapia ipocolesterolemizzante
8. C.N.	F	E2	20	32	2	fa: 5; ea: 5; fp: 5; ep: 5; fd: 5; ed: 5	21,08	Lieve tachicardia sinusale, cataratta, sonnolenza diurna, gozzo nodulare normofunzionante, colelitiasi, stipsi, asma. Appendicectomia, 2 aborti.	Aliflus. Carnitina, Gabapentin
9. C.V.	F	E2	12	23	2	fa: 5; ea: 5; fp: 4; ep: 4; fd: 4; ed: 4	19,05	-	Terapia estrogenica
10. C.A.	M	E2	9	34	3	fa: 5; ea: 4; fp: 4; ep: 4; fd: 4; ed: 4	19,95	Disfagia, lieve sonnolenza diurna, alvo irregolare	Carnitina
11. C.R.	M	E2	40	67	3	fa: 5; ea: 5; fp: 4; ep: 4; fd: 3; ed: 3	23,98	Cardiopatia ischemica (2 pregressi IMA), diabete mellito, dislipidemia, >GGT, sonnolenza diurna. Colectomia.	Sitagliptin+Metformina, Glimepiride, Esteri ac. grassi polinsaturi, Paroxetina, Cardioaspirina, Lansoprazolo
12. B.C.	F	E2	10	52	3	fa: 5; ea: 4; fp: 3; ep: 3; fd: 3; ed: 3	27,09	Pacemaker, cataratta operata, disfagia, gozzo tiroideo multinodulare, adenoma paratiroideo operato, alvo irregolare. VMNI	Mexiletina, Fosinopril, Vitamina D, Escitalopram
13. B.A.	M	E2	nascita	19	3	fa: 5; ea: 5; fp: 4; ep: 4; fd: 4; ed: 4	22,50	Iniziale lieve ipercapnia, stipsi	-
14. F.N.	M	E2	33	35	2	fa: 5; ea: 5; fp: 4; ep: 4; fd: 4; ed: 4	42,2	Cardiomiopatia biventricolare, extrasistolia ventricolare e sopraventricolare, OSAS, ipotiroidismo, disfagia, sonnolenza diurna. VMNI, Sleeve Gastrectomy.	Eutirox, Bisoprololo, Carnitina, Coenzima Q10
15. F.P.	M	E2	42	49	3	fa: 5 ; ea: 5; fp: 5; ep: 5; fd: 4+; ed: 4+	23,66	BAV 1°,dislipidemia, psoriasi, ernia iatale, ipotiroidismo, cataratta operata. Colectomia.	Eutirox, pantoprazolo, ezetimibe
16. G.M.	M	E2	14	37	2	fa: 5; ea:5 ; fp: 5; ep: 4; fd: 5; ed: 4	22,14	>GGT	Carnitina
17. M.G.	M	E2	37	52	3	fa: 5; ea: 4; fp:4 ; ep: 4; fd: 4; ed: 4	20,76	Cataratta operata, dislipidemia, sonnolenza diurna, oligo/azospermia. VMNI	Carnitina
18. M.E.	F	E2	16	56	4	fa: 4; ea:4 ; fp: 3; ep: 4; fd: 3; ed: 3	34,89	Pacemaker, cataratta, diabete mellito, tiroidite di hashimoto, alvo irregolare.	Insulina, eutirox, warfarin, bisoprololo, esomeprazolo, carnitina
19. M.F.	M	E2	14	54	2	fa: 5; ea: 5; fp: 5; ep: 5; fd: 5; ed: 5	22,76	Disfagia, cataratta operata, >GGT, oligo/azospermia, sonnolenza diurna. Colectomia.	-
20. N.F.	F	E2	18	38	3	fa: 5; ea: 5; fp: 5; ep: 5; fd: 5; ed: 5	17,63	Lieve dislipidemia.	Terapia estrogenica
21. P.M.	M	E2	10	28	2	fa: 5; ea: 4; fp: 4; ep: 4; fd: 4; ed: 4	28,41	Rara tachicardia sinusale, sonnolenza diurna. VMNI	Mexiletina, paroxetina, creatina
22. S.R.	M	E2	31	32	2	fa: 5; ea: 5; fp: 5; ep: 5; fd: 5; ed: 5	23,24	Lievissima iniziale ipercapnia.	-
23. T.B.	F	E2	23	40	4	fa: 5; ea: 4; fp: 4; ep: 4; fd: 4; ed: 4	33,31	Pacemaker, nodulo tiroideo, endometriosi. Colectomia, ablazione BBdx, un aborto.	Carnitina.
24. C.M.	M	E2	56	65	3	fa: 5; ea: 4+; fp: 3; ep: 3; fd: 3; ed: 3; prensione: 1	26,25	BAV 1° e 2°, dislipidemia, patologia tiroidea, >GGT. VMNI. A breve impianto PM	Carnitina, coenzima Q10.
25. M.L.	F	E3	40	52	4	fa: 4; ea: 4; fp: 4; ep: 4; fd: 4; ed: 4	26,22	VMNI	ASA, lansoprazolo, verapamil, carnitina,
26. G.D.	M	E3	4	36	4	fa: 4; ea: 4; fp: 3; ep: 3; fd: 3; ed: 3	16,40	Sonnolenza diurna. VMNI	Carnitina

**Tab. 1:** caratteristiche clinico-demografiche dei soggetti reclutati.

Dal punto di vista del deficit motorio, i pazienti sono stati classificati utilizzando la Muscular Impairment Rating Scale (MIRS) (Tab. 2): in particolare, 12 pazienti (46,1%) hanno ricevuto un punteggio pari a 2, 10 pazienti (38,5%) un punteggio pari a 3 e 4 pazienti (15,4%) un punteggio pari a 4 (Fig. 16).

Tutti i pazienti sono risultati affetti dalla forma classica di DM1 con insorgenza in età adulta, ad eccezione del paziente n° 13 che ha presentato un esordio congenito di malattia. L'età d'esordio di malattia è risultata (in anni, media  $\pm$  deviazione standard) pari a  $23,81 \pm 16,14$  e la storia di malattia (in anni, media  $\pm$  deviazione standard)  $17,85 \pm 12,71$ .

Dei 26 pazienti miotonici selezionati per lo studio, 12 pazienti (46,1%) presentano coinvolgimento cardiaco e 3 di questi sono portatori di pacemaker; 10 (38,5%) presentano coinvolgimento respiratorio e di questi 8 eseguono ventilazione meccanica non invasiva (VMNI).

Per quanto riguarda il coinvolgimento multisistemico di malattia, il 26,9% dei pazienti presenta problemi oculari (nella maggior parte dei casi cataratta), il 30,8% lamenta disturbi della deglutizione, il 34,6% è seguito dai colleghi Endocrinologi per patologia tiroidea ed il 46,1% presenta disturbi gastro-enterici (prevalentemente colelitiasi ed alternanza stipsi-diarrea). La sindrome delle apnee ostruttive del sonno (OSAS), ad oggi, è nota soltanto in due pazienti (n° 3 e 14) che però non si sono mai sottoposti a trattamento con ventilazione meccanica a pressione positiva (Tab. 1).

### **5.1. Valutazione della Qualità di Vita**

Per comprendere 'come e quanto' debolezza e fatica muscolare soggettivamente percepite condizionano la vita quotidiana dei pazienti, abbiamo sottoposto il gruppo DM1 in studio al questionario clinico INQoL, formulato specificatamente per soggetti affetti da malattie neuromuscolari [Sansone et al. 2010].

Lo scopo di questo studio esula da una analisi dettagliata della qualità di vita, ma da uno studio pilota in corso presso il nostro Centro si evince che il valore totale dell'impatto medio generale della malattia sulla qualità di vita ottenuto dai pazienti (INQoL tot) risulta pari a 19,1%.

In particolare, di nostro interesse sono state le domande 1a e 4a che, rispettivamente, indagano in maniera specifica gli aspetti di Debolezza e Fatica; per ciascuno dei domini indagati i punteggi riportati indicano la risposta riportata dal paziente.

Dall'analisi dell'“item” INQoL1a, in cui viene chiesto ai pazienti “che grado di debolezza ritengono di avere nei muscoli interessati dalla malattia” e di rispondere utilizzando i sette punti della Scala Likert, è emerso che: due pazienti (7,7%) hanno risposto con un punteggio pari a 1 (‘trascurabile’); tre (11,5%) con un punteggio pari a 3 (‘poca’); dieci (38,5%) con un punteggio pari a 4 (‘abbastanza’); quattro (15,4%) con un punteggio pari a 5 (‘considerevole’); cinque (19,2%) con un punteggio pari a 6 (‘notevole’) ed infine due (7,7%) con punteggio pari a 7 (‘estrema’).

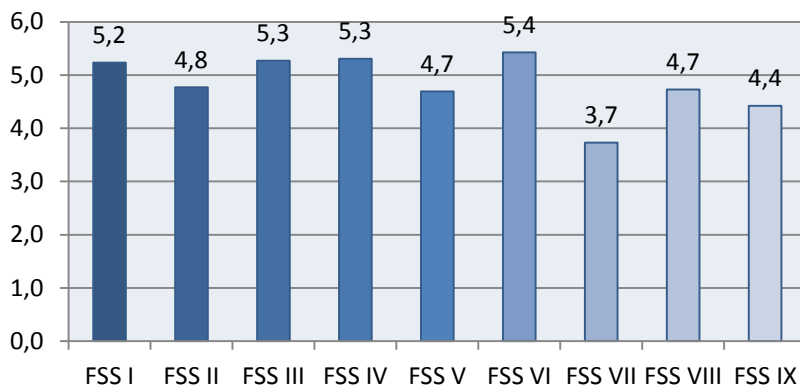
L'analisi dell'“item” INQoL4a, indagante “che grado di affaticamento il paziente ritiene di avere in questa fase di malattia”, ha invece evidenziato che: due pazienti (7,7%) hanno risposto con un punteggio pari a 1 (‘assente’); sei (23,1%) con un punteggio pari a 2 (‘relativamente presente’); tre (11,5%) con un punteggio pari a 3 (‘abbastanza presente’), uno (3,8%) con un punteggio pari a 4 (‘moderatamente presente’); due (7,7%) con un punteggio pari a 5 (‘considerevolmente presente’); sette (26,9%) con un punteggio pari a 6 (‘notevolmente presente’) ed infine cinque pazienti (19,2%) con un punteggio pari a 7 (‘estremamente presente’).

Dall'analisi statistica eseguita su variabili non parametriche mediante Indice di correlazione  $\rho$  per ranghi di Spearman, emerge che l'“item” INQoL1a correla positivamente con la classe di espansione trinucleotidica CTG della mutazione genetica (DNA) ( $\rho = 0,459$ ;  $p < 0,05$ ) e con il deficit motorio dei pazienti espresso in termini di MIRS ( $\rho = 0,519$ ;  $p < 0,01$ ).

INQoL4a invece non correla significativamente con nessuna delle variabili indagate ( $\rho > 0,05$ ).

## **5.2. Valutazione della percezione soggettiva di fatica muscolare mediante l'utilizzo della scala clinica FSS-*Fatigue Severity Scale***

Alla *Fatigue Severity Scale* (FSS), i pazienti hanno riportato un punteggio di risposta ai singoli elementi (media  $\pm$  deviazione standard) pari a  $4,84 \pm 0,22$  (Fig. 17).

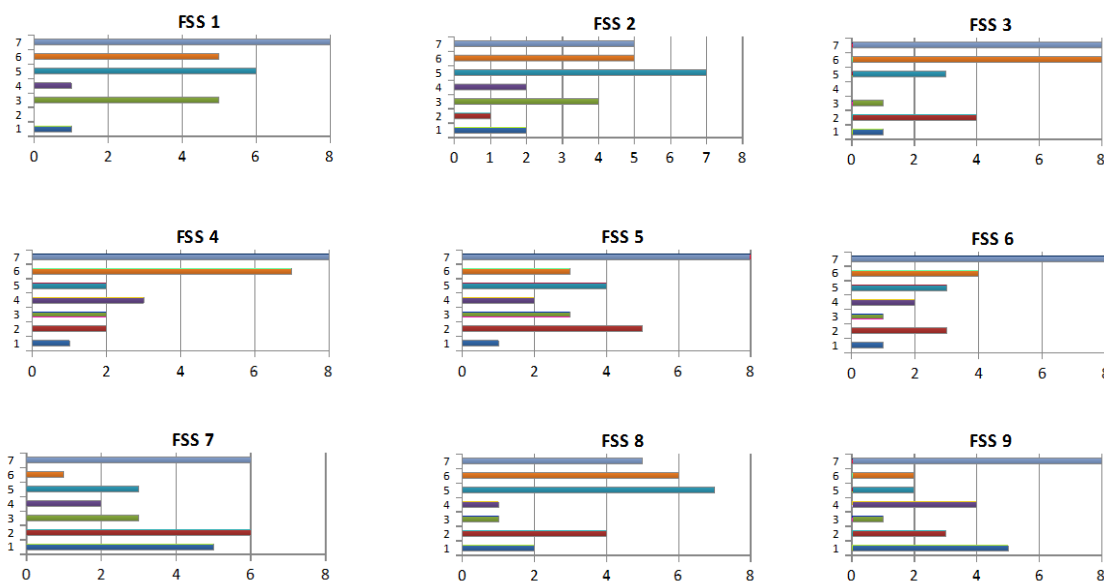


**Figura 17:** Punteggi medi di risposta totalizzati dai pazienti ai singoli “items” del questionario FSS

Dall’analisi dei singoli “items”, in base al cut-off stabilito, sono risultati:

- > 4,6 (indicativo di ‘eccessiva fatica’): gli “items” FSSI (19 pazienti, 73,1%), FSSIII (20 pazienti, 76,9%), FSSV (15 pazienti, 57,7%), FSSVI (19 pazienti, 73,1%) e FSSVIII (18 pazienti, 69,2%);
- < 4,6 (indicativo di ‘non eccessiva fatica’): gli “items” FSSIV (18 pazienti, 69,2%) e FSSVII (16 pazienti, 61,5%).

L’unico *item* che non ha dimostrato differenza (13 pazienti, 50%), collocandosi quindi su livelli borderline, è stato FSSIX (Fig. 18).



**Figura 18:** Rappresentazione grafica della distribuzione delle risposte dei pazienti ai singoli “items” della scala FSS

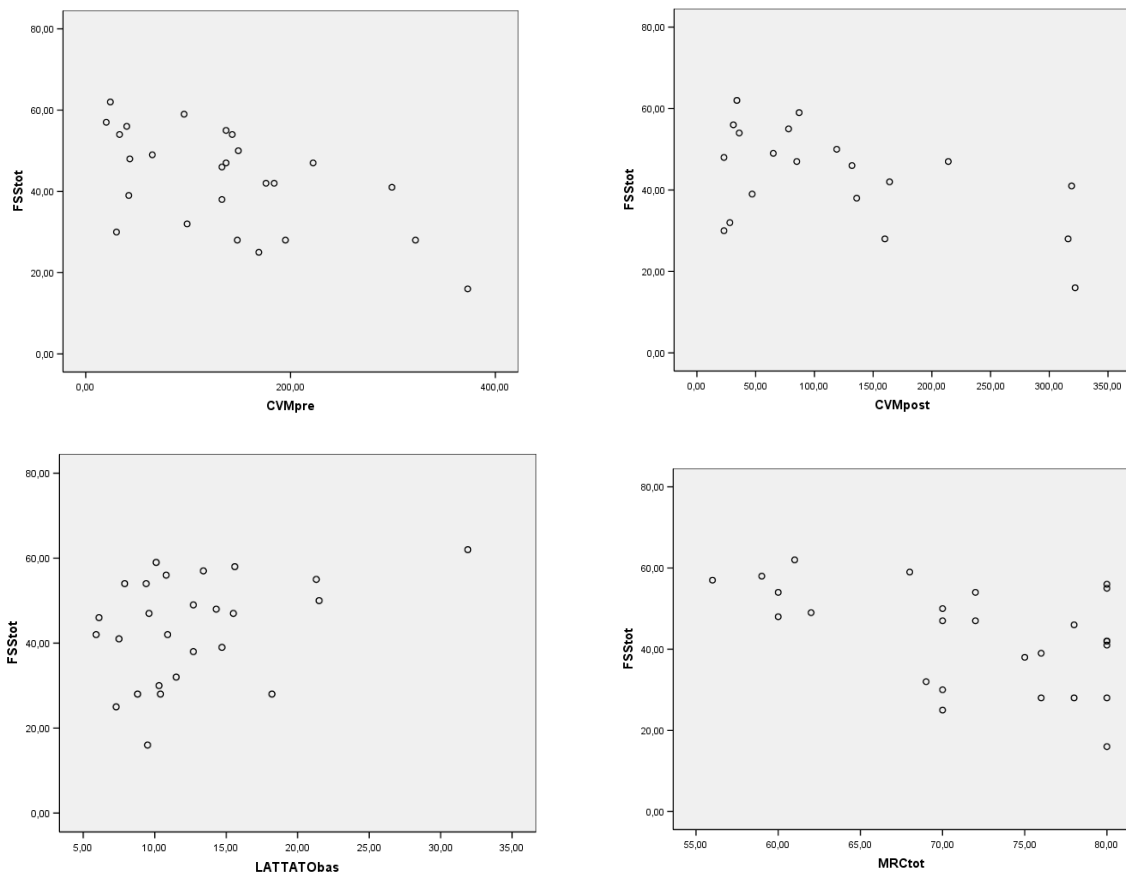
L’analisi statistica del valore totale della FSS (media ± deviazione standard: 43,6 ± 12,4), utilizzando l’Indice di correlazione lineare *r* di Pearson, evidenzia una correlazione

statisticamente significativa tra la fatica muscolare percepita e diverse variabili indaganti la forza muscolare.

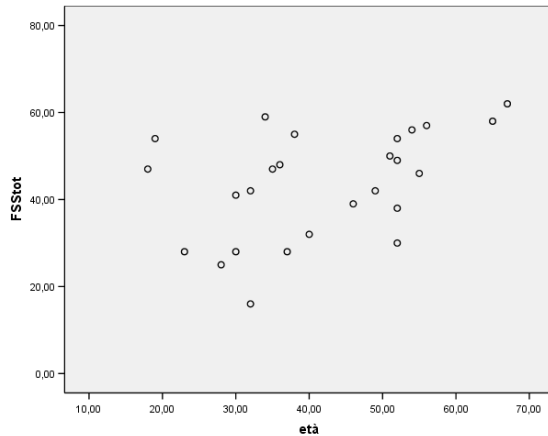
FSS totale correla:

- col grado di forza muscolare espresso in termini di MRC totale ( $r = -0,496$ ;  $p = 0,010$ );
- con la CVM pre-test da sforzo ( $r = -0,583$ ;  $p < 0,01$ );
- con la CVM post-test da sforzo ( $r = -0,534$ ;  $p < 0,05$ );
- con l'età media dei pazienti ( $r = 0,428$ ;  $p < 0,05$ ). In particolare, è stata evidenziata una correlazione statisticamente significativa tra alcuni singoli *item* della scala clinica FSS e l'età media dei pazienti: FSSI ( $r = 0.519$ ;  $p < 0,01$ ), FSSII ( $r = 0.470$ ;  $p < 0.05$ ) e FSSIX ( $r = 0.396$ ;  $p < 0.05$ ).

Inoltre è presente una forte tendenza alla significatività per la correlazione tra FSS totale e valore medio basale di acido lattico ( $r = 0,378$ ;  $p = 0,057$ ) (Fig. 19).







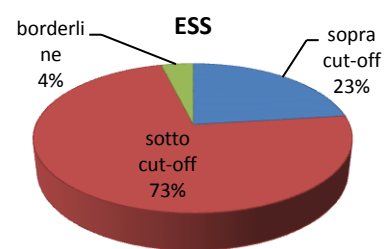
**Figura 19:** rappresentazione grafica della correlazione statistica tra il punteggio totale della scala FSS e alcune variabili legate allo sforzo muscolare.

### 5.3. Valutazione della percezione soggettiva della sonnolenza diurna mediante l'utilizzo della scala clinica ESS-*Epworth Sleepiness Scale*

Alla Epworth Sleepiness Scale (ESS), il punteggio totale dei pazienti inclusi nello studio è risultato (media  $\pm$  deviazione standard) pari a  $7,9 \pm 3,4$ ; in particolare solo 6 dei pazienti (23,1%), rispettivamente i paz. n° 2, 5, 8, 10, 11 e 13 hanno presentato un punteggio  $>$  di 10, indicativo di eccessiva sonnolenza diurna. [Nguyen AT et al. 2002; Murray JW et al 1991; Boari L et al. 2004].

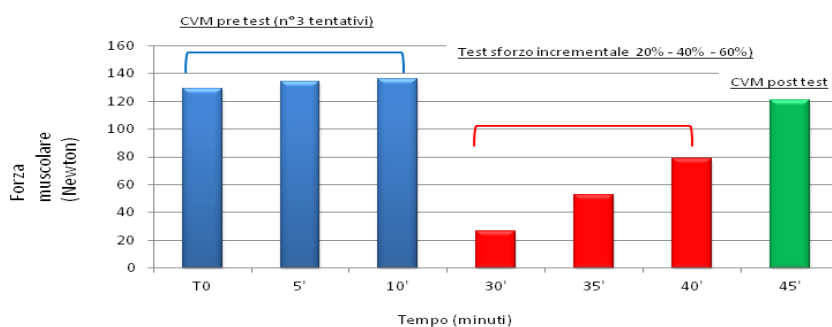
I singoli "items" ESSa-ESSc-ESSf-ESSg-ESSh hanno ottenuto un punteggio medio  $<$  1 (range 0-3); ESSb un punteggio (media  $\pm$  deviazione standard) pari a  $1,8 \pm 1,0$ ; ESSd un punteggio (media  $\pm$  deviazione standard) pari a  $1,3 \pm 1,2$ . L'unico "item" che ha ottenuto un punteggio (media  $\pm$  deviazione standard) di  $2,6 \pm 0,9$  è risultato ESSe.

Non sono state evidenziate correlazioni statisticamente significative tra la scala di valutazione ESS e le altre variabili cliniche oggetto dell'indagine.



**Figura 20:** 19 soggetti (73,1%) hanno ottenuto un punteggio  $<$  10; 6 soggetti un punteggio  $>$  10 (23,1%); ed infine un solo soggetto (paz. n°26) ha totalizzato un punteggio di 10 (3,8%) collocandosi su livelli borderline di sonnolenza diurna.

## 5.4. Test da sforzo muscolare con “hand-grip”



**Figura 21:** Rappresentazione grafica (a barre) del protocollo di test da sforzo con miometro con medie dei valori di forza muscolare (in Newton) ottenuti dai pazienti.

Dopo una seduta di circa 2'-3' di riscaldamento dell'arto superiore scelto per l'esercizio (fenomeno del warm-up), l'esaminatore procede alla valutazione della CVM pre-test. Le fasi di lavoro sono così descrivibili.

1) 3 contrazioni volontarie massimali della durata di 5" caduna, eseguite a distanza di 5' l'una dall'altra.

2) l'esaminatore calcola la CVM media per ogni paziente (barre in **blu**: valori totali medi±DS T0=129,1±94,1; T5' =134,2±100,7; T10'=136±96,6); Dalla media di questi 3 valori è stato ottenuto il valore di CVM pre-test.

3) dopo una fase di riposo (15'-20') si effettua il primo prelievo ematico;

4) T30': "test con miometro". Impugnando l'hand-grip, sono state eseguite tre step di contrazioni manuali intermittenti, della durata di 1' ciascuno e intervallati da 2' di riposo, a livelli incrementali di sforzo: 20%-40%-60% della CVM-pre-test. (barre in **rosso**: valori totali medi±DS T30'(20% CVM)=26,3±19,3; T35'(40% CVM)=52,5±38,7; T40'(60% CVM)=78,7±58,0);

5) prelievo ematico post-sforzo;

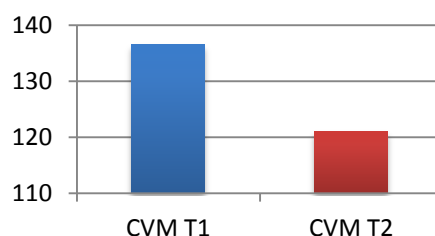
6) Dopo 3'-4', determinazione della CVM post-test con un singolo tentativo (barra in **verde**: valore totale medio±DS T45'=120,9±100,9, (in un sottogruppo di 20 paz.).

Tutti i pazienti reclutati sono stati in grado di effettuare il protocollo di esercizio muscolare (Fig. 21), ad eccezione del paziente n° 24, il quale non ha potuto compiere l'esercizio per un severo deficit motorio a livello distale agli arti superiori. I pazienti n° 23 e 25 non hanno eseguito il prelievo ematico al termine del protocollo di esercizio per un problema di accesso venoso dalle vene antecubitali dell'avambraccio; i pazienti n° 18 e 20 hanno effettuato al termine dell'esercizio solo il dosaggio dell'acido lattico, e non dei parametri di stress ossidativo, sempre per difficoltà di accesso venoso (Tab 1).

L'esercizio è stato effettuato con l'arto dominante in 17 pazienti, mentre è stato testato l'arto non dominante in 8 pazienti per l'impossibilità ad eseguire prelievi ematici dalle vene antecubitali dell'avambraccio controlaterale.

In un sottogruppo di 20 pazienti del campione in studio, il valore di CVM determinato alla *base-line* T1 (CVM pre-test, in Newton, media  $\pm$  deviazione standard: 135,45  $\pm$  101,69) è stato poi confrontato col valore di CVM rivalutato dopo 3-4 minuti dal termine dell'esercizio, T2 (CVM post-test, in Newton, media  $\pm$  deviazione standard: 120,95  $\pm$  100,96): tale differenza ( $\Delta$  CVM) è risultata statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Fig. 22).

**Figura 22.**  
Medie (Newton)  
CVMpre=135.4  
CVMpost=120.9  
  
DS  
CVMpre=101.7  
CVMpost=100.9  
( $p < 0,05$ )

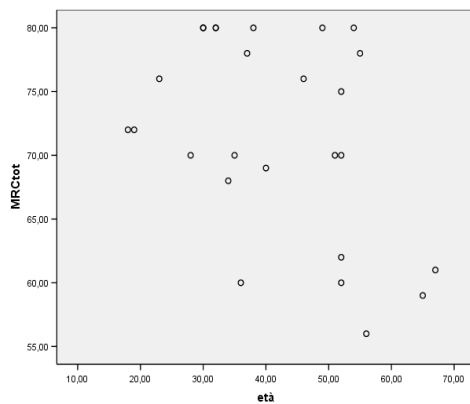
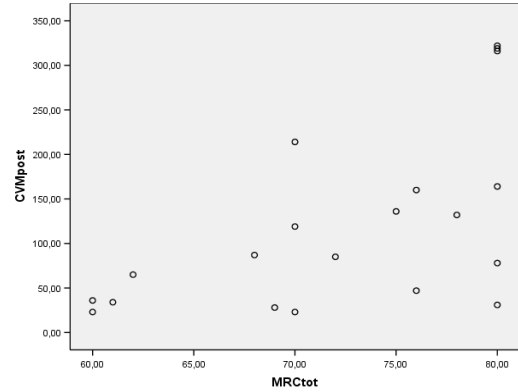
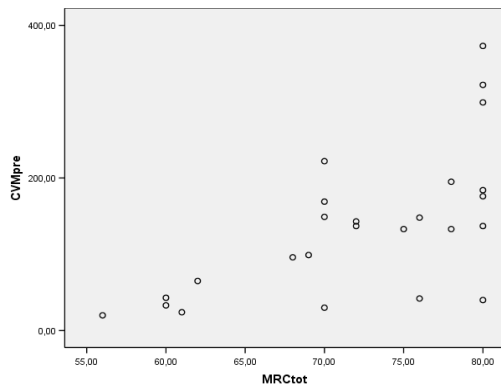


L'analisi statistica della differenza del  $\Delta$  CVM, eseguita mediante Indice di correlazione lineare  $r$  di Pearson, non mostra correlazioni statisticamente significative con le variabili indagate, fatta eccezione per l'età ( $r = -0,439$ ;  $p < 0,05$ ).

Da un punto di vista del fenotipo clinico dei pazienti in studio, è stato sottolineato che la classe di espansione trinucleotidica CTG della mutazione genetica (DNA) correla in maniera statisticamente significativa:

- con il deficit motorio classificato con la scala MIRS ( $r = 0,640$ ;  $p < 0,01$ ) e
- con il grado di forza muscolare espresso in termini di MRC totale ( $r = -0,536$ ;  $p < 0,01$ ).

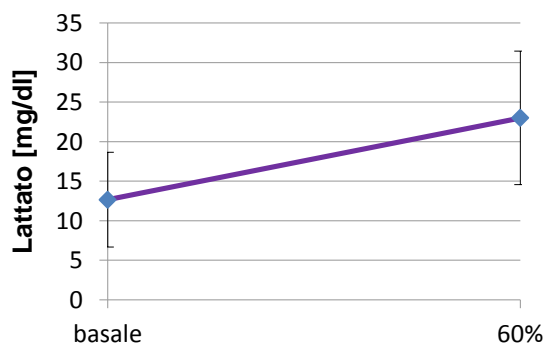
Inoltre, MRC totale correla significativamente con l'età media dei pazienti ( $r = -0,425$ ;  $p < 0,05$ ); con la CVM pre-test ( $r = 0,640$ ;  $p < 0,01$ ) e con la CVM post-test ( $r = 0,584$ ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 23).



**Figura 23:** Rappresentazione grafica della correlazione tra la forza muscolare, misurata tramite MRC, con le variabili legate allo sforzo (CVM pre e post- test) e con l'età.

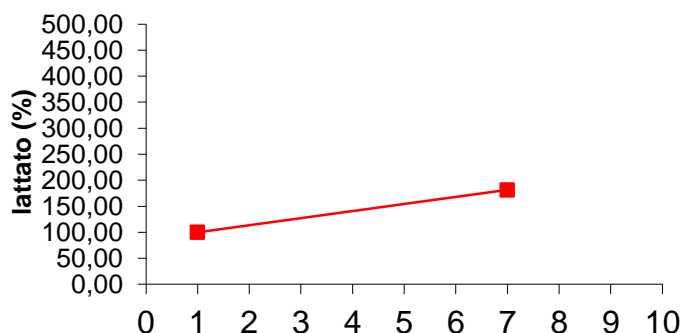
### 5.5. Parametri biochimici: acido lattico e *markers* di stress ossidativo

In condizioni basali i valori di acido lattico sono risultati (in mg/dl, media  $\pm$  deviazione standard) pari a  $12,665 \pm 6,001$  (v.n. acido lattico: 4,5-19,8 mg/dl). Al 60% della CVM tali valori sono risultati (in mg/dl, media  $\pm$  deviazione standard)  $23,004 \pm 8,443$  (Fig. 24): si è osservato un incremento statisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) dei valori medi dell'acido lattico pari a 81,63% rispetto ai valore basali, indicativo del raggiungimento della soglia anaerobica (Fig. 25).

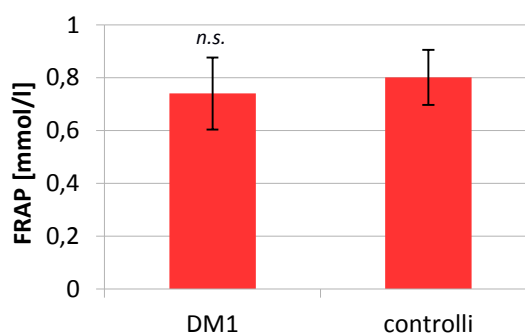
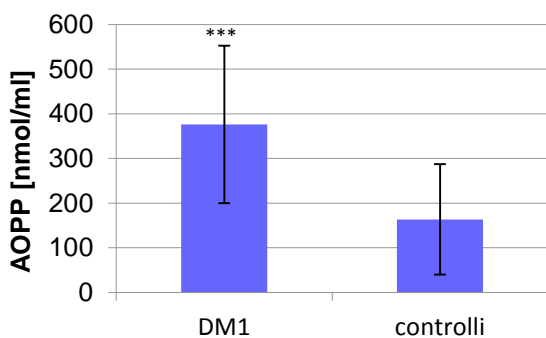


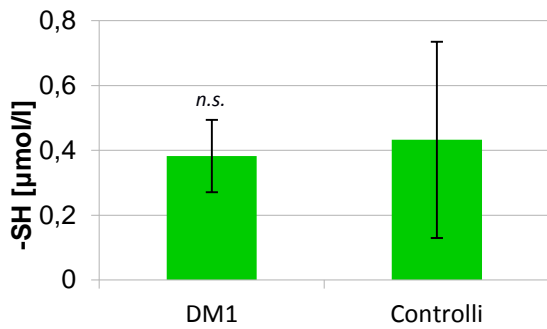
**Figura 24:** Incremento statisticamente significativo del valore medio di acido lattico al 60% della CVM rispetto al valore medio basale ( $p < 0,001$ ).

**Figura 25:** Incremento del 81,63% dei valori medi di acido lattico al 60% del carico massimale teorico rispetto ai valori basali



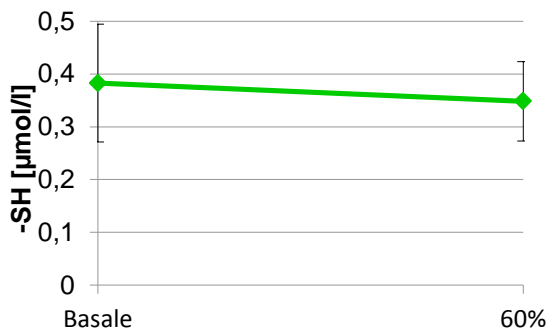
I valori basali dei *markers* di stress ossidativo dei pazienti sono stati confrontati con quelli ottenuti in un gruppo di 15 soggetti sani omogenei per età e sesso. Tale analisi ha documentato in media un incremento statisticamente significativo ( $p=0.0002$ ) dei valori basali di AOPP nei pazienti (in nmol/ml, media  $\pm$  deviazione standard:  $375,95 \pm 176,21$ ) rispetto ai controlli (in nmol/ml, media  $\pm$  deviazione standard:  $163,59 \pm 123,34$ ), indicativi di una aumentata condizione di stress ossidativo. Al contrario, non è stata osservata una differenza statisticamente significativa dei livelli basali di FRAP e dei tioli plasmatici totali tra pazienti DM1 (FRAP in mmol/l, media  $\pm$  deviazione standard:  $0,7403 \pm 0,1367$ ; tioli plasmatici totali in  $\mu\text{mol/l}$ , media  $\pm$  deviazione standard:  $0,3827 \pm 0,112$ ) e controlli (FRAP in mmol/l, media  $\pm$  deviazione standard:  $0,801 \pm 0,104$ ; tioli plasmatici totali in  $\mu\text{mol/l}$ , media  $\pm$  deviazione standard:  $0,432 \pm 0,303$ ) (Fig. 26).





**Figura 26:** Livelli plasmatici degli AOPP, della FRAP e dei gruppi tiolici plasmatici totali nei pazienti affetti da DM1 e nei controlli; \*\*\*  $p < 0,001$ ; n.s. non significativo

Al 60% della CVM, i parametri di stress ossidativo non variano in modo statisticamente significativo rispetto ai valori basali nei pazienti testati (Fig. 27).



**Figura 27:** Variazione dei livelli plasmatici degli AOPP, della FRAP, dei gruppi tiolici plasmatici totali nei pazienti DM1 sottoposti a test da sforzo incrementale ai muscoli dell'avambraccio tra il valore basale e il valore al 60% della CVM. (Test t di student non significativo. CVM: Contrazione Volontaria Massimale).

## 6. DISCUSSIONE

La DM1, malattia ad ereditarietà autosomica dominante, è la più comune forma di distrofia muscolare nell'adulto ed è causata dalla espansione instabile di ripetizioni trinucleotidiche CTG nella regione 3' non tradotta del gene *DMPK* localizzato sul cromosoma 19q13.3.

Il decorso di questa patologia muscolare è progressivo, caratterizzato da miotonia, debolezza e atrofia muscolare, solitamente coinvolgenti all'inizio i muscoli distali. È inoltre presente anche un coinvolgimento multisistemico comprendente cataratta, aritmie cardiache, disordini della motilità gastrointestinale, disfunzioni endocrine e deficit cognitivi [Ørngreen et al. 2005].

Tra i sintomi più comuni di questa complessa patologia neuromuscolare, la maggior parte dei pazienti riferiscono, fin dall'esordio, una precoce affaticabilità.

Il sintomo *fatica muscolare* può essere definito come 'l'incapacità di mantenere il livello atteso di performance motoria nel tempo' [Allen & Lamb 2008].

L'importanza di indagare questo aspetto nella DM1 deriva dall'evidenza che oltre il 60% di tutti i pazienti neuromuscolari lamentano fatica muscolare come sintomo comune e precoce di malattia. Sebbene la fatica sia un disturbo importante in ogni patologia cronica, progressiva e fisicamente invalidante, viene riferito più comunemente nella DM1 che in altre malattie neuromuscolari e può anche essere prominente, in assenza di una stretta correlazione con la disabilità motoria oggettiva [Laberge et al. 2009].

La presenza di fatica muscolare può avere un grande impatto sulla vita quotidiana, sul benessere generale e sulla partecipazione sociale dei pazienti neuromuscolari. [Hermans et al. 2013], portandoli a condurre una vita sempre più sedentaria [Ørngreen et al. 2005]. La percezione di tale disturbo è soggettiva e quindi la definizione stessa di fatica muscolare in realtà non è universalmente condivisa [Miller 2006]. Sia il SNC che il muscolo scheletrico possono essere coinvolti in modo indipendente nella DM1, di conseguenza due forme distinte di fatica muscolare sono possibili in questa malattia. Una fatica 'centrale' secondaria ad atrofia corticale e a lesioni della sostanza bianca, e relazionata alla sonnolenza diurna, alla apatia e ai disturbi del tono dell'umore di cui questi pazienti soffrono [Ørngreen et al. 2005], e una fatica 'periferica' causata da atrofia delle fibrocellule muscolari scheletriche. Queste due componenti possono concomitare ed essere variamente espresse nei pazienti miotonici. Inoltre, evidenze recenti [Bray et al. 2012] suggeriscono che l'affaticamento può essere influenzato anche da meccanismi di origine centrale, in modo particolare da un dispendio di risorse da parte del SNC.

Oltre ai sistemi motori, il SNC e l'apparato neuromuscolare, altre strutture dovrebbero essere prese in considerazione nello studio della fatica, quali l'apparato respiratorio, il sistema cardio-circolatorio, le vie nervose sensitive.

Nonostante il fatto che la fatica indotta dall'esercizio fisico sia un sintomo importante nei pazienti con DM1, limitandone le attività di vita quotidiana e la ripercussione che ciò ha sulla loro qualità di vita, questo fenomeno rimane scarsamente documentato.

Il presente studio ha portato alla definizione di un protocollo per la caratterizzazione clinica e funzionale della fatica muscolare in un gruppo di pazienti affetti da DM1, seguiti presso il Centro per le Malattie Neuromuscolari della U.O. Neurologia dell'Università di Pisa. Tale protocollo è risultato facilmente eseguibile in ambiente ambulatoriale da parte dei pazienti e potrà essere proposto nell'ambito del progetto multicentrico finalizzato alla creazione di un Registro Nazionale di malattia per la caratterizzazione clinimetrica della dimensione "fatica muscolare" nei pazienti affetti da DM1.

#### ***Valutazione soggettiva della dimensione "fatica muscolare"***

Il presente studio analizza il livello di fatica percepito soggettivamente, in primo luogo attraverso la somministrazione di scale cliniche e questionari validati per l'inquadramento del sintomo "fatica muscolare" e delle eventuali ripercussioni sulla qualità di vita.

Come dimostrato da Peric et al. 2013, sia l'aspetto muscolare che il coinvolgimento multisistemico hanno un sensibile impatto sulla percezione della qualità di vita dei pazienti. Rakocevic-Stojanovic et al. (2014) suggeriscono inoltre il ruolo di aspetti funzionali di origine centrale come il temperamento ed il deterioramento cognitivo sulla qualità di vita. Tipiche di questi pazienti sono infatti alterazioni della personalità (evitante, passivo-aggressiva, ossessivo-compulsiva, paranoide) e del tono dell'umore, con un quadro caratterizzato da riduzione degli interessi, sintomi pseudo-depressivi e ridotta spinta motivazionale che conducono sempre più il paziente ad isolarsi da un punto di vista sociale [Winblad et al. 2005].

Nel nostro studio l'impatto medio generale della malattia sulla qualità di vita appare piuttosto moderato (INQoL tot=19.1%), in linea con quanto mostrato da alcuni recenti studi in cui i pazienti totalizzavano punteggi complessivamente moderati nelle scale sulla qualità di vita, nonostante l'oggettivo carico psico-fisico portato dalla precoce disabilità fisica e socio-relazionale [Peric et al. 2013], discostandosi così da altre malattie neuromuscolari. Alcuni studiosi hanno suggerito l'ipotesi di un coinvolgimento del lobo



frontale con ripercussioni sulle capacità di comprensione e di pensiero critico nei pazienti affetti da questa patologia [Meola et al. 2003; Meola e Sansone 2007]. Questo potrebbe almeno in parte spiegare la distorsione nella capacità di giudizio sulla percezione della propria qualità di vita. Nella pratica clinica si osserva frequentemente una ridotta consapevolezza della propria malattia. Poiché tale condizione, definita come Anosognosia, è di riscontro piuttosto frequente tra coloro che soffrono di malattie neurodegenerative, anche nelle fasi premorbuse, possiamo ipotizzare che esista un legame tra meccanismi patogenetici, che causano la comparsa dei segni clinici precoci di decadimento cognitivo, ed i meccanismi di consapevolezza di malattia [Mograbi et al. 2009]. La mancanza di consapevolezza di malattia fra i pazienti miotonici può rendere meno efficace la rilevazione della percezione soggettiva di fatica.

Facendo riferimento ad uno studio pilota riguardante la qualità di vita nei pazienti affetti da DM1, si evince che tra i sintomi fisici “Debolezza” (49,3%) e “Fatica muscolare” (44,6%) sono stati i più invalidanti per i pazienti; una rilevante compromissione della QoL si rileva anche nei domini socio-relazionali come “Attività” (38,2%) e “Indipendenza” (30,4%) .

Il questionario INQoL [Sansone et al. 2010] permette di studiare anche aspetti sintomo-specifici, di solito trascurati nelle comuni scale cliniche. Di particolare interesse per il nostro studio sono state le domande 1a e 4a indaganti la percezione soggettiva di ‘Debolezza’ e ‘Stanchezza’. Come descritto nei Risultati, la maggior parte dei pazienti riferisce un livello moderato di debolezza muscolare ma ha una percezione rilevante della fatica muscolare, come sintomo invalidante nella vita quotidiana.

L’analisi statistica non ha mostrato associazioni statisticamente rilevanti tra INQoL4 e le altre variabili di interesse; INQoL1 correla invece con l’espansione genetica [CTG]<sub>n</sub> e con il grado di disabilità motoria misurato mediante scala MIRS. Nessuna di queste dimensioni correla con variabili fisiologiche di risposta allo sforzo indicando che probabilmente questo tipo di scala ha come focus primario quello di rilevare dati specifici sulla vita quotidiana dei pazienti, fornendo solo informazioni indirette sulla sintomatologia.

Facendo riferimento alla rilevazione di parametri oggettivi di fatica analizzati in questo studio, il confronto fra la CVM espressa prima e dopo il test ( $\Delta$  CVM) mostra valori statisticamente significativi, evidenziando quindi una sostanziale efficacia del protocollo proposto nel generare affaticamento in questi pazienti (Fig. 22). Dall’analisi dei singoli “items” della Fatigue Severity Scale (FSS), emerge che la percezione di fatica globale si associa principalmente ad alcune dimensioni indagate dal questionario. In particolare i pazienti riferiscono che nel 73.1% dei casi la fatica percepita si associa ad una ridotta

motivazione-FSSI; il 76,9% dei pazienti riferisce di sentirsi facilmente affaticato-FSSIII; mentre per il 73,1% dei pazienti l'affaticamento impedisce attività fisiche impegnative-FSSVI. Al contrario, altri "items" evidenziano un minor impatto del sintomo fatica percepito sullo stato di salute generale (punteggio < 4,6): per il 69,2% dei pazienti l'affaticamento non interferisce con le loro attività fisiche-FSSIV; mentre per il 61,5% non interferisce con l'esecuzione di determinati compiti o impegni-FSSVII (Fig. 18).

La percezione soggettiva di fatica muscolare (Fig. 19) è associata al grado di disabilità motoria misurato mediante scala MRC. Quindi i soggetti che presentano valori di MRC più bassi, indicativi di maggior deficit di forza, hanno anche una percezione più marcata di fatica. Di questo abbiamo un riscontro anche dallo studio della relazione tra FSS e CVM espressa prima e dopo lo sforzo.

E' da notare, inoltre, che è stata rilevata una forte tendenza alla significatività tra la FSS totale ed il valore medio basale di lattato, prodotto finale della glicolisi anaerobica. Probabilmente il campione troppo esiguo di pazienti reclutato per lo studio non ha permesso di raggiungere la significatività statistica. Sarebbe quindi importante avere la possibilità di estendere l'indagine ad una casistica più ampia di pazienti per indagare ulteriormente il rapporto tra valutazione funzionale del sintomo "fatica" e valutazione oggettiva mediante test da sforzo.

A questo proposito, è importante notare che più del 25% dei pazienti riferisce un grado medio-alto di sonnolenza diurna, come mostrato dalla Epworth Sleepiness Scale (ESS); la restante parte del campione, tuttavia, mostra livelli di sonnolenza diurna di grado lieve (Fig. 20). La sonnolenza diurna ha ricevuto una attenzione relativamente scarsa nella comunità scientifica a causa delle difficoltà di valutazione, ma nella pratica clinica costituisce un aspetto comunemente riferito dai pazienti [Rubinsztein et al 1998; Laberge et al. 2009]. Per tale motivo, nel presente studio è stato deciso di indagare anche il grado di sonnolenza diurna dei pazienti, come possibile fattore concomitante al sintomo fatica muscolare. L'analisi di correlazione tra la sonnolenza diurna, misurata tramite scala ESS, e la fatica muscolare, misurata tramite scala FSS, è risultata complessivamente non significativa. L'insieme di queste osservazioni suggerisce che la possibile anosognosia dei pazienti interferisca con l'affidabilità delle risposte ai questionari auto-somministrati, non consentendo di quantificare correttamente il fenomeno della sonnolenza diurna. Inoltre, fatica muscolare e sonnolenza diurna hanno caratteristiche che spesso si sovrappongono [Hermans et al. 2013], di conseguenza i pazienti possono avere difficoltà a distinguerle, e i medici possono non disporre di una metodologia validata e condivisa per discriminarle.

### ***Valutazione oggettiva della fatica muscolare mediante il protocollo di esercizio***

Per indagare oggettivamente la dimensione “fatica muscolare” nei pazienti in studio affetti da DM1, è stato attuato un protocollo di test da sforzo con miometro, a carico incrementale, finalizzato alla caratterizzazione della prestazione motoria. L’esercizio-test è stato facilmente eseguibile e riproducibile in pazienti con conservata la forza muscolare distale. Non può invece essere proposto a pazienti in fase avanzata di malattia e/o con un severo deficit distale per impossibilità ad eseguirlo.

In tutti i pazienti che hanno effettuato lo sforzo muscolare il protocollo di esercizio ha permesso di raggiungere la soglia anaerobica come dimostrato dall’incremento dei valori di acido lattico: al 60% della CVM si è osservato un incremento medio statisticamente significativo dei livelli di acido lattico pari a 81,63% rispetto ai valori basali. Questo tipo di esercizio è principalmente aerobico all’inizio del test e diviene progressivamente anaerobico man mano che aumenta la forza esercitata per progressivo reclutamento delle unità motorie rapide [Milner-Brown et al. 1973].

Una forte tendenza alla significatività statistica, forse non raggiunta per il campione esiguo di pazienti analizzato, si è osservata nella correlazione tra FSS totale e valore medio basale di acido lattico: all’aumentare dei valori basali di lattato, i pazienti in studio riferivano una maggiore fatica percepita (scala FSS) (Fig. 19). Si può ipotizzare che questo possa essere ricondotto al fatto che i pazienti affetti da DM1, con stile di vita più sedentario a causa della malattia muscolare, abbiano un metabolismo mitocondriale compromesso, con precoce attivazione del metabolismo anaerobico. In accordo con tale ipotesi, un precedente studio condotto da Siciliano e collaboratori (2002) riportò livelli di acido lattico sierici nei pazienti miotonici maggiori rispetto a quelli osservati in controlli sani, sia a riposo sia al il picco dello sforzo di un protocollo di esercizio incrementale su cicloergometro, suggerendo una precoce attivazione del metabolismo anaerobico nei muscoli scheletrici di questi pazienti.

La *soglia anaerobica* dell’acido lattico rappresenta il punto critico in cui si realizzano modificazioni metaboliche circa la transizione della domanda energetica da un esercizio di tipo aerobico ad uno di tipo anaerobico. Nel passaggio al metabolismo anaerobico durante la contrazione muscolare intervengono una serie di fattori quali il tipo di fibre muscolari reclutate, la disponibilità di substrati energetici, le risposte ormonali, i parametri cardio-circolatori e respiratori [Siciliano et al. 2001].

Indicativo dello shift aerobico-anaerobico durante l'esercizio è il picco nella produzione muscolare di acido lattico, prodotto finale della glicolisi anaerobica. Tale processo avviene al raggiungimento del 60-70% della normale potenza massima teorica del soggetto.

L'esistenza di due domini di intensità di esercizio è ad oggi appurata, ma la natura di tale transizione e la sua corretta terminologia sono state a lungo dibattute. Esiste ancora oggi una aperta controversia riguardo l'utilizzo dei termini 'Aerobico' e 'Anaerobico' per descrivere la risposta fisiologica all'esercizio perché durante un esercizio incrementale non si osserva un improvviso e netto passaggio dal metabolismo aerobico a quello anaerobico quando l'apporto di ossigeno si riduce. Quindi questi due termini possono essere utilizzati per descrivere i processi metabolici che rispettivamente utilizzano ossigeno o non lo utilizzano, indipendentemente dalla sua disponibilità. Distinguiamo quindi due domini d'intensità di esercizio: a bassi livelli, il metabolismo è prevalentemente aerobico (con produzione della molecola energetica ATP - adenosin trifosfato - grazie al processo biochimico mitocondriale della fosforilazione ossidativa); sopra un certo livello di intensità di esercizio, l'organismo utilizza una combinazione di metabolismo aerobico ed anaerobico, con conseguente produzione di acido lattico, al fine di produrre sufficienti quantitativi di ATP.

In realtà, anche durante l'esercizio a bassa intensità si nota un piccolo incremento dell'acido lattico: ciò riflette un equilibrio esistente tra l'acido lattico prodotto dall'esercizio muscolare e quello smaltito da altri tessuti (come fegato, cuore, cervello e muscoli non sotto sforzo), testimone del fatto che metabolismo aerobico ed anaerobico coesistono a tutti gli stadi di intensità di esercizio [Siciliano et al. 2002].

Al fine di valutare sia la presenza sia il grado di affaticamento muscolare, dopo 3-4 minuti dal termine dell'esercizio è stata rivalutata la CVM (CVM T2) in ciascun paziente. L'analisi della forza muscolare al termine del test da sforzo ha dimostrato un decremento statisticamente significativo della CVM ( $\Delta$  CVM), indicativo di un processo di effettivo affaticamento muscolare (Fig. 22). Questo protocollo di esercizio ci permette quindi di documentare oggettivamente la fatica muscolare.

Come atteso, l'analisi statistica ha evidenziato anche una correlazione tra valori di CVM (sia pre-test sia post-test) e la percezione soggettiva di fatica: pazienti con valori di forza massimali più bassi, riferivano maggiore senso di fatica muscolare (Fig. 19).

La fatica muscolare è un processo complesso e nella sua genesi sono state proposte ed individuate diverse vie neurobiologiche, spesso interconnesse, tra cui l'alterazione dell'eccitabilità sarcolemmale, l'accoppiamento elettro-meccanico, la disponibilità di

substrati energetici, il flusso ematico e l'adattamento all'esercizio con la vasodilatazione indotta dall'ossido nitrico (NO), nonché le eventuali modificazioni dell'ambiente intracellulare, alterazione dell'apparato contrattile e lo stress ossidativo [Angelini & Tasca 2012; Montes et al. 2011]. Tra queste ipotesi fisiopatologiche, numerosi dati di letteratura sembrano indicare uno stato di stress ossidativo come uno dei principali meccanismi implicato nella genesi della fatica muscolare [Reid, 2008].

Il termine “stress ossidativo” descrive una condizione di status quo di squilibrio in cui le difese antiossidanti cellulari non riescono a mantenere i livelli di specie altamente reattive dell'ossigeno (ROS), normalmente prodotte dal metabolismo aerobio, al di sotto di un livello soglia di tossicità, come risultato o di una eccessiva produzione delle ROS, o di una perdita delle naturali difese antiossidanti, oppure di entrambi i fattori [Selmecci et al. 2005]. Le specie reattive dell'ossigeno sono state identificate come mediatori endogeni di fatica muscolare, mettendo in evidenza l'importanza di studi futuri atti a definire il meccanismo cellulare di azione dei ROS con l'obiettivo di identificare nuove molecole antiossidanti a scopo terapeutico [Kuwahara et al, 2010; Leelarungrayub et al, 2011]. Tuttavia, i meccanismi attraverso i quali i ROS possano contribuire alla fatica muscolare nella DM1 risultano essere ancora poco chiari. La produzione dei radicali liberi avviene nei mitocondri durante i processi metabolici ossigeno-dipendenti che servono a produrre l'energia necessaria per i vari processi cellulari. Si tratta di molecole instabili perché presentano un elettrone spaiato, per cui sono altamente reattivi e creano legami con una qualunque altra molecola che vi entri in contatto e che possa fornire loro un elettrone, raggiungendo quindi la stabilità ma innescando in questo modo un circolo vizioso perché, a sua volta, la molecola donatrice di elettroni diventa essa stessa un radicale libero.

I radicali liberi, attraverso la loro estrema reattività, interferiscono con i normali costituenti cellulari. Ne sono bersaglio i lipidi di membrana (lipoperossidazione), gli zuccheri e i fosfati, le proteine, gli acidi nucleici, e la loro azione dannosa è proporzionale non solo alla quantità di radicali prodotti ma anche alla loro azione protratta nel tempo, come si evidenzia nel processo di invecchiamento precoce e nell'insorgenza di molti processi patologici umani [Tedeschi et al. 2000].

In condizioni normali, i livelli e le attività dei ROS sono regolati sia da meccanismi di difesa antiossidanti enzimatici, come la superossido dismutasi (SOD), la glutazione perossidasi (GPX) e la catalasi, sia da dispositivi non enzimatici, come l'acido ascorbico, la vitamina E e il glutazione [Toscano et al. 2005].

Studi “in vivo” su soggetti affetti da Distrofia Miotonica [Culebras, 1992] hanno evidenziato livelli ematici di radicali liberi e perossidi lipidici aumentati rispetto ai controlli, in assenza di una significativa alterazione dell’attività dell’enzima superossido dismutasi. I livelli aumentati di radicali liberi e di perossidi lipidici potrebbero avere un ruolo nella patogenesi della Malattia di Steinert.

Inoltre, da un altro studio condotto su 39 pazienti si è riscontrato un aumento effettivo di alcuni parametri ematici come AOPP e  $\gamma$ -glutamilttransferasi (GGT) nei pazienti affetti da DM1, rispetto ai controlli sani; per di più i valori sierici dell’AOPP correlavano significativamente con l’impegno extramuscolare dei pazienti reclutati, [Siciliano et al, 2005].

In uno studio di Toscano et al. (2005), si sono peraltro rilevati aumentati valori ematici di altri marcatori dello stress ossidativo, quali malondialdeide (MAL), vitamina E, radicali idrossilici come l’acido 2,5 diidrossibenzoico (2,5-DHBA), SOD e il sistema antiossidante totale, avvalorando quindi l’ipotesi che lo stress ossidativo possa svolgere un ruolo fondamentale nella progressione del danno cellulare nella patologia.

Usuki et al. (2000) hanno ipotizzato che le ripetizioni CTG potessero influenzare la suscettibilità delle cellule allo stress ossidativo, ed inoltre hanno osservato che l’entità dell’espansione delle triplette può attivare diverse vie alternative di trasduzione del segnale a seguito dell’aumento dello stress ossidativo.

Alla luce dei dati di letteratura sopra esposti, nel corso del presente studio abbiamo a tal fine deciso di indagare alcuni parametri di stress ossidativo nel plasma dei 26 soggetti affetti da DM-1 reclutati, sia in condizioni basali che al termine del protocollo di esercizio muscolare.

I parametri analizzati, per quanto riguarda le sostanze anti-ossidanti, sono stati rappresentati da:

- Tioli plasmatici, anti-ossidanti di natura non enzimatica;
- FRAP, che rappresenta una stima della capacità antiossidante ferro riducente del plasma;

Per quanto riguarda le sostanze pro-ossidanti, sono stati analizzati i seguenti parametri:

- AOPP, prodotti di ossidazione proteica avanzata;

Gli AOPP sono il prodotto di ossidazione delle proteine da parte di specie reattive dell’ossigeno. Consistono di un insieme di proteine, la tireoglobulina, la  $\gamma$ -globulina,

l'albumina e la mioglobulina. È stato dimostrato che soprattutto l'albumina modificata dai processi di ossidazione conduce alla formazione degli AOPP [Witko-Sarsat et al., 1996].

Esistono due forme di AOPP: una ad alto peso molecolare ed una a basso peso molecolare. L'elettroforesi delle proteine mostra che il picco di AOPP ad alto peso molecolare è prevalentemente dovuto all'albumina che appare sotto forma di aggregati che probabilmente derivano da ponti disolfuro e/o da "cross-linking" della tirosina; al contrario il picco di AOPP a basso peso molecolare contiene albumina nella sua forma monomerică. In "vivo" i livelli plasmatici di AOPP correlano con i livelli di dimeri di tirosina, un marcatore di danno ossidativo delle proteine, e con la pentossidina, un prodotto di glicosilazione strettamente associato al danno ossidativo delle proteine. La relazione tra gli AOPP e i prodotti di perossidazione lipidica appare, invece, poco chiara. Le attuali conoscenze sembrano indicare che i lipidi non sono necessari per la formazione degli AOPP, ma che in "vivo" possono aumentare tale processo [Selmeçci et al. 2005]. L'incremento dei livelli plasmatici di AOPP è stato osservato in malattie neurodegenerative, coinvolgenti la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo, come la sclerosi laterale amiotrofica [Siciliano et al., 2007]. Lo studio della capacità ferro-riducente (FRA) è uno dei metodi sviluppati per misurare la capacità anti-ossidante totale di un dato liquido biologico [Guohua & Prior, 1998; Ronald & Guohua, 1999] nel caso specifico il plasma (FRAP), e quindi valutare il grado di attivazione dei meccanismi anti-ossidanti in risposta a processi pro-ossidanti. Al valore della FRAP contribuiscono diverse molecole con attività antiossidante presenti nel plasma: per circa il 60% l'acido urico, per il 15% l'acido ascorbico, per il 5% l' $\alpha$ -tocoferolo, per il 10% le proteine e per il 5% la bilirubina [Benzie & Strain, 1996].

Infine, la determinazione dei tioli ci dà una valutazione dei gruppi -SH legati alle proteine plasmatiche; in particolare i gruppi -SH si ritrovano per la maggior parte, circa il 90%, all'interno della struttura del glutatione allo stato ridotto. Per cui misurando i tioli si ha una stima indiretta del valore di glutatione ridotto nel plasma. Il restante 10% è costituito da tioli legati alle altre proteine plasmatiche, ad esempio l'albumina. I tioli rappresentano una componente qualitativamente significativa della barriera antiossidante plasmatica. Infatti, i gruppi sulfidrilici delle molecole dei componenti plasmatici (quali, ad esempio, le proteine, P-SH), ossidandosi, possono contrastare l'attacco di alcuni radicali liberi; ma, quando si formano nel contesto di molecole proteiche, possono avere conseguenze indesiderate. È infatti possibile che le proteine coinvolte nella formazione di legami -S-S- subiscano

un'alterazione delle proprie capacità funzionali, modificando stabilmente la loro conformazione [Hu, 1994].

I marcatori di stress ossidativo rappresentano degli strumenti utili, non invasivi, per monitorare lo stato di malattia e per valutare l'entità dello squilibrio redox nei pazienti con Distrofia Miotonica.

Il presente lavoro di tesi ha documentato in media un incremento statisticamente significativo ( $p=0.0002$ ) dei livelli plasmatici basali degli AOPP nei pazienti DM1 vs controlli, indicativo di una aumentata condizione di stress ossidativo. Al contrario, in condizioni di riposo, non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nei livelli medi plasmatici di FRAP e Tioli tra pazienti DM1 e controlli (Fig. 26). La mancanza di differenze statisticamente significative tra i livelli degli antiossidanti non enzimatici dei pazienti rispetto ai controlli potrebbe dipendere dal fatto che i pazienti affetti da DM1 presentano una eccessiva produzione di ROS con conseguente incremento del danno ossidativo (documentata dai livelli basali di AOPP più elevati nei pazienti rispetto ai controlli sani); nei soggetti analizzati potrebbe quindi verificarsi un meccanismo compensatorio tale da indurre un incremento dei meccanismi di difesa antiossidante in grado di controbilanciare l'eccessiva produzione di ROS.

Al 60% della CVM, i parametri di stress ossidativo non variano in modo statisticamente significativo rispetto ai valori basali nei pazienti testati (Fig. 27). Questo può essere ricondotto alla motivazione per cui l'attività fisica, in condizioni fisiologiche, di per sé determina nell'immediato un aumento della produzione di ROS ma anche un parallelo aumento delle difese anti-ossidanti. Probabilmente gli AOPP, prodotto di ossidazione degli aminoacidi delle proteine da parte dei ROS, non aumentano in maniera statisticamente significativa al 60% della CVM rispetto ai valori basali, dove invece risultano statisticamente più elevati rispetto ai controlli, perché la durata del protocollo di esercizio non è sufficiente ad attivare la via biochimica che induce un danneggiamento delle proteine da parte dei ROS così come un miglioramento dei meccanismi di difesa antiossidante. Si ipotizza siano necessari, come cinetiche, tempi più lunghi per avere variazioni apprezzabili nei biomarcatori di stress ossidativo: andrebbero rivalutati in fasi tardive rispetto alla fine dell'esercizio (2-6-9-24 ore dopo).



## 7. CONCLUSIONI

Il risultati del presente studio di tesi hanno portato alla definizione di un protocollo per la caratterizzazione clinica e funzionale della fatica muscolare nei pazienti miotonici e l'impatto che tale disturbo può avere sulla qualità di vita di un paziente affetto da DM1. Il test di esercizio muscolare con miometro ha permesso di analizzare parametri biometrici e biochimici connessi alla contrazione muscolare e al fenomeno della fatica, fornendo un profilo oggettivo di quest'ultimo, confrontabile con le scale soggettive di valutazione clinica. Nello specifico, il suddetto protocollo è stato in grado di correlare in modo statisticamente significativo la percezione soggettiva di fatica con il dato oggettivo di compromissione della forza muscolare quale evento correlato all'affaticamento, mentre non sono state rilevate correlazioni né con il livello ematico dell'acido lattico, quale marcatore metabolico, né con i parametri biochimici di stress ossidativo prima e dopo lo sforzo. L'utilità, pertanto, del protocollo di fatica utilizzato permette di presupporre una possibile applicazione nella valutazione clinica della fatica muscolare nella distrofia miotonica, all'interno di schede di raccolta dati utilizzabili nei Registri di malattia, quale riferimento di valutazione per lo stadio di malattia, decorso temporale e risposta ai trattamenti.

Sebbene si renderà necessario un ulteriore processo di validazione che includa l'analisi della variabilità intra- e inter-osservatore e su una più ampia casistica, il protocollo di fatica utilizzato si propone quale utile strumento di valutazione della dimensione clinimetrica della "fatica muscolare" nei pazienti affetti da distrofia miotonica di Steinert, da inserire tra i parametri clinico-funzionali nell'ambito di un Registro Nazionale, da applicare nella definizione della storia naturale di malattia e di misure di "outcome" sensibili e riproducibili, in vista di interventi terapeutici nei vari ambiti, neuropsicologico, riabilitativo e farmacologico.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 2008; 88(1):287-332.
- Angelini C, Tasca E. Fatigue in muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 2012; 22 Suppl 3:S214-20.
- Banerjee B, Sharma U, Balasubramanian K, Kalaivani M, Kalra V, Jagannathan NR. Effect of creatine monohydrate in improving cellular energetics and muscle strength in ambulatory Duchenne muscular dystrophy patients: a randomized, placebo-controlled 31P MRS study. *Magn Reson Imaging.* 2010;28(5):698-707.
- Bassez G, Lazarus A, Desguerre I, Varin J, Laforêt P, Bécane HM, Meune C, Arne-Bes MC, Ounnoughene Z, Radvanyi H, Eymard B, Duboc D. Severe cardiac arrhythmias in young patients with myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 2004; 63(10):1939-41.
- Bellini M, Biagi S, Stasi C, et al. Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy. *World Journal of Gastroenterology* 2006.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239(1):70-6.
- Bungener C, Jouvent R, Delaporte C. Psychopathological and emotional deficits in myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65(3):353-6.
- Charlet-B N, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell.* 2002; 10(1): 45-53.
- Chaudhuri A, Behan PO. Fatigue in neurological disorders. *Lancet.* 2004; 363(9413):978-88.
- Cho DH, Tapscott S.J. Myotonic dystrophy: emerging mechanism for DM1 and DM2. *Biochimica et Biophysica acta.* 2007; 1772 (2):195-204;
- Culebras A. The neurology of sleep. Introduction. *Neurology.* 1992;42(7 Suppl 6):6-8.
- Dauvilliers YA, Laberge L. Myotonic dystrophy type 1, daytime sleepiness and REM sleep dysregulation. *Sleep Med Rev.* 2012; 16(6):539-45.
- Day JW, Ranum LP. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 2005; 15(1):5-16.
- Dean NL, Tan SL, Ao A. Instability in the transmission of the myotonic dystrophy CTG repeat in human oocytes and preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 2006; 86(1): 98-105.
- Duffield M, Rychkov G, Bretag A, Roberts M. Involvement of helices at the dimer interface in ClC-1 common gating. *J Gen Physiol.* 2003; 121(2): 149-61.
- Engel, Andrew G MD. "Myology – Basic and Clinical" 1994; Vol II.40:1267-1292.

- Ercolin B, Sassi FC, Mangilli LD, Mendonça LI, Limongi SC, de Andrade CR. Oral motor movements and swallowing in patients with myotonic dystrophy type 1. *Dysphagia*. 2013; 28(3):446-54.
- Eriksson M, Ansved T, Edström L, Anvret M, Carey N. Simultaneous analysis of expression of the three myotonic dystrophy locus genes in adult skeletal muscle samples: the CTG expansion correlates inversely with DMPK and 59 expression levels, but not DMAHP levels. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(6):1053-60.
- Evans WJ, Lambert CP. Physiological basis of fatigue. *Am J Phys Med Rehabil*. 2007; 86(1 Suppl):S29-46.
- Flachenecker P, Kümpfel T, Kallmann B, Gottschalk M, Grauer O, Rieckmann P, Trenkwalder C, Toyka KV. Fatigue in multiple sclerosis: a comparison of different rating scales and correlation to clinical parameters. *Mult Scler*. 2002; 8(6):523-6.
- Finsterer J, Stollberger C, Blazek G, Kunafer M & Prager E.. Cardiac involvement over 10 years in myotonic and Becker muscular dystrophy and mitochondrial disorder. *Int J Cardiol.*, 2007; 119: 176–184.
- Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RG Jr. et al. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science*. 1993; 260(5105):235-8.
- Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev*. 2001; 81(4):1725-89.
- Gaul C, Schmidt T, Windisch G, Wieser T, Müller T, Vielhaber S, Zierz S, Leplow B. Subtle cognitive dysfunction in adult onset myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2). *Neurology*. 2006; 67(2):350-2.
- Gennarelli M, Pavoni M, Amicucci P, Angelini C, Menegazzo E, Zelano G, Novelli G, Dallapiccola B. Reduction of the DM-associated homeo domain protein (DMAHP) mRNA in different brain areas of myotonic dystrophy patients. *Neuromuscul Disord*. 1999; 9(4):215-9.
- Groenen PJ, Wansink DG, Coerwlnkel M, van der Broek W, Jansen G, Wieringa B. Constitutive and regulated modes of splicing produce six major myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) isoforms with distinct properties. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(4):605-16.
- Groh WJ. Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 2011; 76(4):409
- Groh WJ, Groh MR, Saha C, Kincaid JC, Simmons Z, Ciafaloni E, Pourmand R, Otten RF, Bhakta D, Nair GV, Marashdeh MM, Zipes DP, Pascuzzi RM. Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N Engl J Med*. 2008; 358(25):2688-97.
- Groh WJ, Groh MR, Shen C. et al. Survival and CTG repeat expansion in adults with myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve* 2008.

- Guida M, Marger RS, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Kissel JT, Mendell JR, Prior TW. A molecular protocol for diagnosing myotonic dystrophy. *Clin Chem*. 1995; 41(1):69-72.
- Guohua C, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*, 1998; 44(6): 1309-1315.
- Hermans MC, Merkies IS, Laberge L, Blom EW, Tennant A, Faber CG. Fatigue and daytime sleepiness scale in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve*. 2013; 47(1):89-95.
- Hilton-Jones D, Bowler M, Lochmueller H, Longman C, Petty R, Roberts M, Rogers M, Turner C, Wilcox D. Modafinil for excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy type 1--the patients' perspective. *Neuromuscul Disord*. 2012; 22(7):597-603.
- Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*. 1994; 233:380-5.
- Huang CC, Kuo HC. Myotonic dystrophies. *Chang Gung Med J*. 2005; 28(8):517-26.
- Jansen G, Willems P, Coerwinkel M, Willy Nillesen W, Smeets H, Vits L, Höweler C, Brunner H, Wieringa B. Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)<sub>n</sub> repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet*. 1994; 54(4): 575-85.
- Jean S, Richer L, Laberge L, Mathieu J. Comparisons of intellectual capacities between mild and classic adult-onset phenotypes of myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Orphanet J Rare Dis*. 2014; 9:186.
- Johns MW. Reliability and factor analysis of the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep*. 1992; 15(4):376-81.
- Jorde L, Carey J, Bamshad M, White R. 2006. *Medical Genetics*. St Louis: Mosby, 80–81.
- Kalkman JS, Schillings ML, van der Werf SP, Padberg GW, Zwarts MJ, van Engelen BG, Bleijenberg G. Experienced fatigue in facioscapulohumeral dystrophy, myotonic dystrophy, and HMSN-I. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76(10):1406-9.
- Kobayakawa M, Tsuruya N, Kawamura M. Theory of mind impairment in adult-onset myotonic dystrophy type 1. *Neurosci Res*. 2012; 72(4):341-6.
- Krahe R, Ashizawa T, Abruzzese C, Roeder E, Carango P, Giacanelli M, Funanage VL, Siciliano MJ. Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics* 1995; 28:1-14.
- Krupp LB, Larocca NG, Muir-Nash J. The fatigue severity scale. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol* 1989; 46:1121-3.
- Kuwahara H, Horie T, Ishikawa S, Tsuda C, Kawakami S, Noda Y, Kaneko T, Tahara S, Tachibana T, Okabe M, Melki J, Takano R, Toda T, Morikawa D, Nojiri H, Kurosawa H, Shirasawa T, Shimizu T. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. *Free Radic Biol Med*. 2010 May 1;48(9):1252-62.
- Laberge L, Gagnon C, Dauvilliers Y. Daytime sleepiness and myotonic dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013; 13(4):340.

- Laberge L, Dauvilliers Y, Bégin P, Richer L, Jean S, Mathieu J. Fatigue and daytime sleepiness in patients with myotonic dystrophy type 1: to lump or split?. *Neuromuscul Disord.* 2009; 19(6):397-402.
- Leelarungrayub D, Khansuwan R, Pothongsunun P, Klaphajone J. N-acetylcysteine supplementation controls total antioxidant capacity, creatine kinase, lactate, and tumor necrotic factor-alpha against oxidative stress induced by graded exercise in sedentary men. *Oxid Med Cell Longev.* 2011; 2011:329643.
- Llagostera E, Catalucci D, Marti L, Liesa M, Camps M, Ciaraldi TP, Kondo R, Reddy S, Dillmann WH, Palacin M, Zorzano A, Ruiz-Lozano P, Gomis R, Kaliman P.. Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS ONE* 2007; 2(11): e1134.
- Langer KG, Levine DN. Babinski, J. (1914). Contribution to the study of the mental disorders in hemiplegia of organic cerebral origin (anosognosia). Translated by K.G. Langer & D.N. Levine. Translated from the original Contribution à l'Étude des Troubles Mentaux dans l'Hémiplégie Organique Cérébrale (Anosognosie). *Cortex.* 2014; 61:5-8.
- Larkin K, Fardaei M.. Myotonic dystrophy-a multigene disorder. *Brain Res Bull.* 2001; 56(3-4): 389-95.
- Lau JK, Sy RW, Corbett A, Kritharides L. Myotonic dystrophy and the heart: A systematic review of evaluation and management. *Int J Cardiol.* 2015; 184:600-8.
- Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2006;10(1):59-73.
- Mathieu J, Allard P, Potvin L, Prévost C, Bégin P. A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology.* 1999; 52(8):1658-62.
- Mathieu J, Boivin H, Meunier D, Gaudreault M, Bégin P. Assessment of a disease-specific muscular impairment rating scale in myotonic dystrophy. *Neurology.* 2001; 56(3):336-40.
- Medical Research Council. Aids to the investigation of peripheral nerve injury. War memorandum, 2nd Edn. London, HSMO, 1943. 11-46.
- Meola G, Sansone V. Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve* 2007; 36(3):294-306.
- Meola G, Sansone V, Perani D, Colleluori A, Cappa S, Cotelli M, Fazio F, Thornton CA, Moxley RT. Reduced cerebral blood flow and impaired visual-spatial function in proximal myotonic myopathy. *Neurology* 1999; 53(5):1042-50.
- Meola G, Sansone V, Perani D, Scarone S, Cappa S, Dragoni C, Cattaneo E, Cotelli M, Gobbo C, Fazio F, Siciliano G, Mancuso M, Vitelli E, Zhang S, Krahe R, Moxley RT. Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2). *Neuromuscul Disord.* 2003; 13(10):813-21.
- Miller RG. Fatigue and therapeutic exercise. *J Neurol Sci.* 2006; 242(1-2):37-41.
- Milner-Brown HS, Stein RB, Yemm R. The orderly recruitment of human motor units during voluntary isometric contractions. *J Physiol.* 1973;230(2):359-70.

- Modoni A, Silvestri G, Pomponi MG, Mangiola F, Tonalì PA, Marra C. Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol*. 2004; 61(12):1943-7.
- Mograbi D, Brown RG, Morris RG. Anosognosia in Alzheimer's disease-The petrified self. *Conscious Cogn*. 2009; 18(4):989-1003.
- Montes J, Dunaway S, Montgomery MJ, Sproule D, Kaufmann P, De Vivo DC, Rao AK. Fatigue leads to gait changes in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 2011;43(4):485-8.
- Nogales-Gadea G, Consuegra-García I, Rubio JC, Arenas J, Cuadros M, Camara Y, Torres-Torronteras J, Fiuza-Luces C, Lucia A, Martín MA, García-Arumí E, Andreu AL. A transcriptomic approach to search for novel phenotypic regulators in McArdle disease. *PLoS One*. 2012;7(2):e31718.
- Ørngreen MC, Arlien-Søborg P, Duno M, Hertz JM, Vissing J. Endocrine function in 97 patients with myotonic dystrophy type 1. *J Neurol*. 2012; 259(5):912-20.
- Ørngreen MC, Olsen DB, Vissing J. Aerobic training in patients with myotonic dystrophy type 1. *Ann Neurol*. 2005; 57(5):754-7.
- Pelargonio G, Dello Russo A, Sanna T, De Martino G, Bellocchi F. Myotonic dystrophy and the heart. *Heart*. 2002; 88(6):665-70.
- Peric S, Sreckov M, Basta I, Lavrnjic D, Vujnic M, Marjanovic I, Rakocevic Stojanovic V. Dependent and paranoid personality patterns in myotonic dystrophy type 1. *Acta Neurol Scand*. 2014; 129(4):219-25.
- Petri H, Vissing J, Witting N, Bundgaard H, Køber L. Response letter to "Cardiac involvement in myotonic dystrophy type 1--do not forget the loop recorder!". *Int J Cardiol*. 2013; 168(2):1541.
- Rakocevic-Stojanovic V, Peric S, Madzarevic R, Dobricic V, Ralic V, Ilic V, Basta I, Nikolic A, Stefanova E. Significant impact of behavioral and cognitive impairment on quality of life in patients with myotonic dystrophy type 1. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2014; 126:76–81.
- Ranum LP, Day JW. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet*. 2004; 74(5):793-804.
- Reid MB. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(2):169-79.
- Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(3):R502-16.
- Romigi A, Izzi F, Pisani V, Placidi F, Pisani LR, Marciani MG, Corte F, Panico MB, Torelli F, Uasone E, Vitrani G, Albanese M, Massa R. Sleep disorders in adult-onset myotonic dystrophy type 1: a controlled polysomnographic study. *Eur J Neurol*. 2011; 18(9):1139-45.
- Ronald L, Guohua C. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods." *Free Radic Biol Med*, 1999; 27(11-12): 1173-1181.

- Rubinsztein JS, Rubinsztein DC, Goodburn S, Holland AJ. Apathy and hypersomnia are common features of myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998; 64(4):510-5.
- Sansone VA, Panzeri M, Montanari M, Apolone G, Gandossini S, Rose MR, Politano L, Solimene C, Siciliano G, Volpi L, Angelini C, Palmieri A, Toscano A, Musumeci O, Mongini T, Vercelli L, Massa R, Panico MB, Grandi M, Meola G. Italian validation of INQoL, a quality of life questionnaire for adults with muscle diseases. *Eur J Neurol*. 2010; 17(9):1178-87.
- Sansone VA, Ricci C, Montanari M, Apolone G, Rose M, Meola G, INQoL Group. Measuring quality of life impairment in skeletal muscle channelopathies. *Eur J Neurol*. 2012; 19(11):1470-6.
- Savić Pavićević D, Miladinović J, Brkušanić M, Šviković S, Djurica S, Brajušković G, Romac S. Molecular genetics and genetic testing in myotonic dystrophy type 1. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:391821.
- Savouret C, Garcia-Cordier C, Megret J, Riele H, Junien C, Gourdon G. MSH2-dependent germinal CTG repeat expansions are produced continuously in spermatogonia from DM1 transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(2): 629–37.
- Schara U, Schoser BG. Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. *Semin Pediatr Neurol*. 2006; 13(2):71-9.
- Selmeci L, Seres L, Antal M, Lukacs J, Regöly-Mérei A, Acsády G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple , fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43(3):294-7.
- Siciliano G, Manca M, Gennarelli M, Angelini C, Rocchi A, Iudice A, Miorin M, Mostacciolo M. Epidemiology of myotonic dystrophy in Italy: re-appraisal after genetic diagnosis. *Clin Genet*. 2001;59(5):344-9.
- Siciliano G, Mancuso M, Tedeschi D, Manca ML, Renna MR, Lombardi V, Rocchi A, Martelli F, Murri L. Coenzyme Q10, exercise lactate and CTG trinucleotide expansion in myotonic dystrophy. *Brain Res Bull*. 2001; 56(3-4):405-10.
- Siciliano G, Piazza S, Carlesi C, Del Corona A, Franzini M, Pompella A, Malvaldi G, Mancuso M, Paolicchi A, Murri L. Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2007;254(5):575-80. Epub 2007 Apr 11.
- Siciliano G, Tovani S, Paquali L, Falorni M, Galluzzi F, Manca ML, Rocchi A, Baglini O, Prontera C, Emdin M. Alteration of lactate production during incremental exercise in myotonic dystrophy is not dependent by catecholamine increase” *Basic Appl Myol*. 2002; 12(5):231-237.
- Sovari AA, Bodine CK, Farokhi F Cardiovascular manifestations of myotonic dystrophy-1. *Cardiol Rev*. 2007; 15(4):191-4.
- Tedeschi D, Lombardi V, Mancuso M, Martelli F, Sighieri C, Rocchi A, Tovani S, Siciliano G, Murri L. Potential involvement of ubiquinone in myotonic dystrophy pathophysiology: new diagnostic approaches for new rationale therapeutics. *Neurological Science* 2000; 21:979-980.

- The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC). New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Neurology* 2000; 54(6):1218-21.
- Tidball JG, Wehling-Henricks M. Expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscle reduces muscle membrane damage without increasing the expression of membrane-associated cytoskeletal proteins. *Mol Genet Metab*. 2004; 82(4):312-20.
- Timchenko LT. Myotonic dystrophy: the role of RNA CUG triplet repeats. *Am J Hum Genet*. 1999; 64(2):360-4.
- Toscano A, Messina S, Campo GM, Di Leo R, Musumeci O, Rodolico C, Aguenouz M, Annesi G, Messina C, Vita G. Oxidative stress in myotonic dystrophy type 1. *Free Radic Res*. 2005; 39(7):771-6.
- Tosetti M, Linsalata S, Battini R, Volpi L, Cini C, Presciutti O, Muntoni F, Cioni G, Siciliano G. Muscle metabolic alterations assessed by 31-phosphorus magnetic resonance spectroscopy in mild Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2011; 44(5):816-9.
- Udd B, Krahe R. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol*. 2012; 11:891-905.
- Usuki F, Takahashi N, Sasagawa N, Ishiura S. Differential signaling pathways following oxidative stress in mutant myotonin protein kinase cDNA-transfected C2C12 cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267(3):739-43.
- van Engelen B., OPTIMISTIC Consortium (). Cognitive behaviour therapy plus aerobic exercise training to increase activity in patients with myotonic dystrophy type 1 (DM1) compared to usual care (OPTIMISTIC): study protocol for randomised controlled trial. *Trials* 2015; 16:224.
- van Herpen RE, Oude Ophuis RJ, Wijers M, Bennink MB, van de Loo FA, Fransen J, Wieringa B, Wansink DG. Divergent mitochondrial and endoplasmic reticulum association of DMPK splice isoforms depends on unique sequence arrangements in tail anchors. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(4):1402-14.
- Vignatelli L, Plazzi G, Barbato A, Ferini-Strambi L, Manni R, Pompei F, D'Alessandro R.; GINSEN (Gruppo Italiano Narcolessia Studio Epidemiologico Nazionale). Italian version of the Epworth sleepiness scale: external validity. *Neurol Sci*. 2003; 23(6):295-300.
- Vogel A, Hasselbalch SG, GadeA, Ziebell M, Waldemar G. Cognitive and functional neuroimaging correlate for anosognosia in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2005; 20(3):238-46.
- Wansink DG, van Herpen RE, Coerwinkel-Driessen MM, Groenen PJ, Hemmings BA, Wieringa B. Alternative splicing controls myotonic dystrophy protein kinase structure, enzymatic activity, and subcellular localization. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(16):5489-501.
- Wheeler TM, Leger AJ, Pandey SK, MacLeod AR, Nakamori M, Cheng SH, Wentworth BM, Bennett CF, Thornton CA. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature*. 2012;488(7409):111-5.
- Wilson BA, Balleny H, Patterson K, Hodges JR. Myotonic dystrophy and progressive cognitive decline: a common condition or two separate problems?. *Cortex* 1999; 35(1):113-21.



- Winblad S, Jensen C, Mansson JE, Samuelsson L, Lindberg C. Depression in Myotonic Dystrophy type 1: clinical and neuronal correlates. *Behav Brain Funct.* 2010; 6:25.
- Winblad S, Lindberg C, Hansen S. Temperament and character in patients with classical myotonic dystrophy type 1 (DM-1). *Neuromuscul Disord.* 2005; 15(4):287-92.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996; 49(5):1304-13.
- Wong LC, Ashizawa T, Monckton DG, Caskey CT, Richards CS. Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(1): 114-22.
- Yamamoto H, Williams EG, Mouchiroud L, Cantó C, Fan W, Downes M, Héligon C, Barish GD, Desvergne B, Evans RM, Schoonjans K, Auwerx J. NCoR1 is a conserved physiological modulator of muscle mass and oxidative function. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):827-39.
- Zifko UA, Rupp M, Schwarz S, Zipko HT, Maida EM. Modafinil in treatment of fatigue in multiple sclerosis. Results of an open-label study. *J Neurol.* 2002; 249(8):983-7.

## RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento va sicuramente ai miei genitori che mi hanno sempre aiutata e sostenuta in questo percorso di studio e di vita, credendo in me (soprattutto quando io non ci credevo) e che mi hanno sempre lasciata libera di fare ogni mia scelta. Giusta o sbagliata...Grazie!

Ringrazio il Prof. Gabriele Siciliano per la disponibilità dimostrata nei miei confronti e per avermi seguita ed incoraggiata in questo percorso.

Grazie a tutti i pazienti che si sono impegnati a svolgere l'esercizio previsto da questa tesi...

Grazie alla Dott.ssa Giulia Ricci e alla Dott.ssa Sigrid Baldanzi per avermi aiutata con infinita pazienza nella stesura della presente tesi....supportandomi e sopportandomi...

Grazie alla piccola Clara...che tra poco sarà tra noi....

Grazie alla Dott.ssa Costanza Simoncini, al Dott. Daniele Orsucci e al Dott. Vincenzo Montano per l'aiuto e per tutto quello che mi hanno insegnato....

Grazie anche alla Dott.ssa Lucia Chico ed a tutto il gruppo del laboratorio...

Un ringraziamento va inoltre al personale degli ambulatori della Clinica Neurologica: Federica, Dania, Vincenza, Massimo, Silvia e a tutti gli altri...

Grazie a Pino...per tutto!

Grazie alle mie nonne...ai miei zii...alle mie sorelle...ai miei cugini...per esserci sempre stati...

Grazie a Massimo, per avermi aiutato pazientemente a montare tutto questo lavoro...

Grazie a Vanessa e Sabrina...e a chiunque mi abbia aiutata in tutti questi anni...

Grazie a Giovanni, a Roberta e a mio nonno Mario...persone splendide che purtroppo non ci sono più ma avrebbero voluto assistere a questo traguardo...

L'ultimo ringraziamento, ma sicuramente non meno importante (anzi), è rivolto a Guido, compagno di studio e di vita...come ti ripeto spesso: "ringrazierò sempre la facoltà di Medicina e Chirurgia per avermi fatto incontrare te!".

.