



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

**INDIVIDUAZIONE DI POTENZIALI BIOMARCATORI IN
PAZIENTI AFFETTI DA SINDROME DELLA FATICA
CRONICA**

Relatore:

Prof. Gino Giannaccini
Prof. Antonio Lucacchini

Candidato:

Elisa Serafini

Correlatore:

Dott.ssa Laura Giusti

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

Ringraziamenti

Ringrazio per questo lavoro di tesi il Professor Lucacchini e la dottoressa Giusti per la loro collaborazione e disponibilità.

Un ringraziamento sincero e sentito va alla dottoressa Federica Ciregia per avermi seguito e indirizzato sia nella parte sperimentale che nella stesura.

Indice

Capitolo 1 - INTRODUZIONE	2
1.1 La Sindrome della Fatica Cronica.....	2
1.1.1 Definizione	2
1.1.2 Epidemiologia	3
1.1.3 Manifestazioni cliniche.....	4
1.1.4 Eziopatogenesi	5
1.1.5 Diagnosi	8
1.1.6 Terapia	10
1.2 Mitochondri.....	12
1.2.1 Struttura.....	13
1.2.2 Funzioni	13
1.2.3 Mitochondri e Sindrome della Fatica Cronica.....	15
1.3 Proteomica e CFS	16
1.3.1 Proteomica	16
1.3.2 Studi sulla CFS.....	18
Capitolo 2 – SCOPO DELLA TESI.....	20
Capitolo 3 – MATERIALI E METODI.....	21
3.1 Materiali e strumentazioni	21
3.2 Reclutamento campioni	21
3.3 Raccolta e preparazione dei campioni.....	22
3.3.1 Campioni di saliva.....	22
3.3.2 Campioni di siero	22
3.4 Metodi	23
3.4.1 Dosaggio proteico DC/BIORAD	23
3.4.2 SDS Page e Western Blot	24
3.4.3 Imagequant LAS 4010.....	30
Capitolo 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE	31
Bibliografia.....	37

Capitolo 1 - INTRODUZIONE

1.1 La Sindrome della Fatica Cronica

1.1.1 Definizione

La Sindrome della Fatica Cronica (CFS), chiamata anche Encefalomielite Mialgica, è una grave malattia sistemica caratterizzata da una debilitante, persistente e inspiegabile stanchezza che ha ampio impatto sulla qualità della vita [1-3]. La CFS è accompagnata da una serie di sintomi aspecifici quali disturbi del sonno, mal di testa, difficoltà nella concentrazione, problemi di memoria, debolezza e dolore muscolare. La stanchezza non migliora con il riposo e anzi è aggravata dall'attività fisica o mentale. Negli anni '50 si verificò il primo focolaio epidemico segnalato della sindrome da stanchezza cronica, a Lake Tahoe (California, USA) che rimase documentato clinicamente [4]. Più genericamente, la sindrome veniva considerata come "stanchezza post-infettiva cronica" per pazienti che avevano presentato una pregressa infezione dal virus di Epstein-Barr. L'interesse su questa situazione clinica è aumentato all'inizio degli anni '80, con la diffusione della CFS nello staff del Royal Free Hospital di Londra e nell'Incline Villane, Nevada [5]. Il dibattito riguarda soprattutto l'origine della malattia, cioè se essa debba essere considerata come un'affezione organica o come una situazione unicamente funzionale. Per molteplici ragioni, ma soprattutto per questa dicotomia, molti operatori sanitari sono stati a lungo scettici circa la gravità della CFS, scambiandola erroneamente con un disturbo psicologico affine all'ipocondria o alla depressione e non considerandola come una vera patologia. Da più di 30 anni la ricerca prova a risolvere il problema della sua diagnosi e dal 1988 in poi si sono succedute numerose linee guida e definizioni [6-8], la più importante delle quali è quella dei Centers for Disease Control and Prevention (CDC) degli Stati Uniti, redatta nel 1994 [3] (Tabella 1). Senza eccezioni troviamo in tutte queste definizioni la necessità della presenza dei sintomi da almeno sei mesi. La sindrome viene identificata oggi attraverso i sintomi descritti dal paziente e l'esclusione di altre malattie con disagi simili, ma l'assenza di una causa conosciuta o di un test diagnostico non aiuta gli specialisti in questo processo.

Caratteristiche della fatica cronica persistente e inspiegabile

- La fatica dura da almeno sei mesi
- La fatica ha un inizio preciso e ben definito
- La fatica non è il risultato di una malattia o di uno sforzo continuo
- La fatica non è alleviata dal riposo
- La fatica provoca una sostanziale difficoltà nelle attività occupazionali, sociali, educative e personali svolte in precedenza
- Presenza di quattro o più dei presenti sintomi per non meno di sei mesi: alterazioni della memoria o della concentrazione, mal di gola, dolori delle ghiandole linfonodali cervicali o ascellari, dolori muscolari e alle articolazioni, cefalea di tipo diverso da quella presente eventualmente in passato, sonno non ristoratore o malessere dopo sforzo

Criteri di esclusione

- Condizioni mediche che spieghino i sintomi
- Disordini depressivi o disturbo bipolare
- Schizofrenia, demenza o disturbi deliranti
- Anoressia nervosa, bulimia nervosa
- Abuso di alcol o di altre sostanze
- Obesità grave

Tabella 1 Definizione della sindrome della fatica cronica secondo il Centers for Disease Control and Prevention (CDC), presentata nel 1994 (Fukuda JK, et al. Ann Int Med 1994;121:953-9)

1.1.2 Epidemiologia

Le difficoltà incontrate nella definizione si ripercuotono negli studi epidemiologici. L'incidenza stimata di casi di CFS nel mondo è tra lo 0,4 e il 2,5%, con un picco di età di insorgenza tra i 20 e i 40 anni, e con un rapporto tra femmine e maschi di 3:1 [9]. Il tasso è più alto anche in persone appartenenti a gruppi minoritari, con basso livello di istruzione e in stato di disoccupazione [10-11]. Diversi studi sono stati pubblicati negli Stati Uniti per stimare la prevalenza nella popolazione generale partendo da popolazioni di pazienti in cura negli ospedali o in cliniche specializzate.

I soggetti che hanno riferito astenia sono stati visitati e valutati tramite un questionario, una valutazione psichiatrica, un esame obiettivo ed esami di laboratorio. Dall'indagine è risultata una stima di prevalenza della sindrome dello 0,42% della popolazione generale [12]. L'indagine olandese svolta da Bazelmans et al [13] è stata condotta inviando un questionario a medici di medicina generale sul numero di pazienti astenici nella loro casistica. In base ai dati ricevuti, la prevalenza stimata per la CFS è di 112 casi per 100000 abitanti. Si è rilevato che il sesso femminile costituisce l'81 % e i soggetti tra i 25 e 44 anni di età costituiscono il 55 % della popolazione dei malati. Una ricerca inglese [14] ha indagato la prevalenza della CFS in pazienti in cura da medici di medicina generale in uno studio caso-controllo. Sono stati studiati 2376 pazienti con una visita medica che comprendeva diversi questionari, più valutazioni psichiatriche (misure soggettive ed oggettive, somatizzazioni), esami di laboratorio. La prevalenza della CFS è stata stimata al 2,6%, che scendeva a 0,5% se si escludeva la frequente co-morbilità psichiatrica. Si è rilevato che la sindrome è più frequente nelle donne, soprattutto tra i 18 e 45 anni di età. La durata del follow-up per gli studi prognostici va da 1 anno a 5 anni: la media della guarigione è del 5% (dallo 0 al 31%) e la media del miglioramento è del 39,5% (dall'8 al 63%). La durata della malattia varia da 3 a 9 anni [15].

1.1.3 Manifestazioni cliniche

I pazienti affetti da Sindrome della Fatica Cronica lamentano principalmente una stanchezza severa e persistente. Insieme ad essa si presenta una gamma di anormalità neurologiche, immunologiche e del sistema endocrino, che spesso riducono (almeno all'esordio e nelle fasi acute) la capacità lavorativa del soggetto del 50% o più, a causa della debolezza generale e della facilità a stancarsi. L'affezione è caratterizzata anche da disfunzioni cognitive, disturbi del sonno, mialgia, problemi gastrointestinali, anoressia, aumento di peso, sudore notturno e insofferenza al caldo e al freddo (Tabella 2) . La maggioranza dei pazienti parlano di un inizio acuto dei sintomi dopo una malattia infettiva [16-18]. Con l'avanzare della malattia si possono associare disturbi dell'umore di tipo reattivo.

SINTOMI E SEGNI	%	SINTOMI E SEGNI	%
Stanchezza	100	Problemi psichiatrici	65
Difficoltà di concentrazione	90	Allergie	55
Cefalea	90	Crampi addominali	40
Mal di gola	85	Perdita di peso	20
Linfonodi dolenti	80	Esantemi	10
Dolori muscolari	80	Tachicardia	10
Dolori articolari	75	Aumento di peso	5
Stato febbrile	75	Dolore toracico	5
Disturbi del sonno	70	Sudori notturni	5

Tabella 2 Sintomi e segni riportati da pazienti con sindrome da stanchezza cronica (Straus SE, J Infect Dis 1988;157:405-12)

1.1.4 Eziopatogenesi

Attualmente questo disturbo è considerato una patologia con cause multifattoriali, ma la vera origine è sconosciuta. La varietà delle modalità d'insorgenza della sindrome (graduale o immediata; in seguito ad un episodio infettivo simil-influenzale, in seguito a mononucleosi o in modo asintomatico), la variabilità del decorso clinico (ciclico con remissioni e recidive, gradualmente ingravescente, stazionario con lento miglioramento fino alla guarigione) e la comorbidità (psichiatrica, reumatologica, o allergica) frequente in questi pazienti hanno indotto ad ipotizzare diverse possibili eziologie [12]. Inizialmente l'importanza dei sintomi infettivi, psicologici e neurocognitivi ha suggerito una causa virale o un disturbo psichiatrico [19,20]. Successivamente è stata osservata una varietà di elementi correlati a patologie del sonno e disfunzioni neuroendocrine e immunologiche in sottogruppi di pazienti con la CFS [21-24]. Allo stesso tempo alcuni studiosi hanno notato che questa sindrome e, più in generale i disturbi legati ad una stanchezza persistente, si presentano spesso nei membri della stessa famiglia. Sebbene alcuni studi abbiano trovato delle anomalie, soltanto pochi di essi riguardavano un largo numero di pazienti e non erano in generale studi controllati [25].

IPOTESI INFETTIVA

Questa ipotesi propone che la persistenza di un agente infettivo sia la causa della sindrome. In una percentuale di pazienti si riscontra una pregressa infezione da virus di Epstein-Barr, ma non tutti i pazienti presentano un titolo anticorpale significativo per questo virus, per cui si è iniziato a studiare altri possibili agenti patogeni. A questo scopo, il Four-city surveillance study, del dipartimento di Malattie Infettive del CDC (Stati Uniti) nei primi anni novanta ha escluso un rapporto di causalità della sindrome con numerosi patogeni [26,27]. Alcuni studi ritengono che i vaccini abbiano giocato un ruolo importante nell'insorgenza della malattia di alcuni scolari [28,29], ma non ci sono conferme a questa ipotesi visto l'alto numero di studenti vaccinati che non hanno avuto nessuna conseguenza [30,31]. Malgrado gli sforzi fatti nel chiarire il ruolo dei virus, i risultati sono controversi.

IPOTESI IMMUNOLOGICA E INFIAMMATORIA

È stato proposto che la CFS sia associata a fattori immunologici e infiammatori. È stata riportata la sovra-espressione di proteine proinfiammatorie come l'interferone- γ (INF- γ), l'interleuchina-1 (IL-1) e il tumor necrosis factor- α (TNF- α), ma anche un aumento delle proteine correlate alla risposta immunitaria come la lattotransferrina, defensina, integrine e catepsina [32,33]. Si è anche rilevata un'alterata produzione di citochine che vengono espresse in modo scoordinato nel sangue periferico dei pazienti. Tuttavia, non si è riusciti ad individuare un quadro caratteristico di secrezione [34]. In alcuni pazienti è stata rilevata la presenza di autoanticorpi antinucleo e di immunocomplessi circolanti, indice di una possibile patologia autoimmune [34,35]; tuttavia non sono accompagnati da danno tissutale, elemento caratteristico di queste patologie. Non si sono evidenziati aumenti di infezioni opportunistiche o la comparsa di patologie neoplastiche come avviene in pazienti immunodepressi. È stato notato un aumento della frequenza di allergie in una sottopopolazione di pazienti, per cui si pensa che sia un fenomeno concomitante [36]. In ogni caso, al momento, non si sono specifici marcatori di infiammazione o immunitari che possano essere utili nella diagnosi, complicando di conseguenza il trattamento.

IPOTESI NEUROLOGICA

La sintomatologia lamentata dai pazienti con CFS suggerisce un coinvolgimento del sistema nervoso. Un'ipotesi propone l'interessamento nella patogenesi dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, che, attivata, incrementa la sintesi e la secrezione ormonale, soprattutto di cortisolo. Questo ormone influisce sull'attività del sistema immune e studi preliminari nei soggetti con CFS hanno evidenziato una sua produzione inferiore alla norma [22]. Poiché il cortisolo sopprime l'infiammazione e l'attivazione dell'immunità cellulare, si pensa che una sua minor concentrazione in circolo possa allentare il controllo di questi processi. Tuttavia, il decremento di cortisolo osservato oscilla ancora nell'intervallo di normalità pertanto il dato non può essere utilizzato come diagnostico.

IPOTESI DELLO STRESS OSSIDATIVO

Diversi gruppi di ricercatori suppongono che una fosforilazione ossidativa difettosa e la successiva produzione di radicali liberi e stress ossidativo svolgono un ruolo importante nella fisiopatologia della CFS [37-44]. Una ricerca ha rilevato un aumento dei livelli di MDA (malondialdeide, un potenziale biomarcatore di danno ossidativo e della gravità della malattia) e dei livelli di CO nel gruppo CFS e che lo stress ossidativo era presente nel loro gruppo di pazienti di sesso femminile [47].

IPOTESI GENETICA

L'influenza genetica potrebbe risultare importante nell'espressione della sindrome della fatica cronica. Ultimamente i ricercatori hanno dimostrato una connessione tra la genetica e una fatica generale in un campione di gemelli in Australia [48]. Più interessante è il risultato dello studio condotto dal gruppo di ricercatori Buchwald et al. [49] che ha investigato sul ruolo della genetica e dei fattori ambientali nella CFS confrontando i tassi di concordanza tra gemelli monozigoti e dizigoti. La stima della tendenza all'ereditabilità è stata del 19% (95% intervallo di confidenza=0-56) e i tassi sono sempre stati più alti nei monozigoti rispetto ai dizigoti.

La distinzione tra classi di fattori predisponenti, precipitanti e perpetuanti può essere utile per la comprensione di questo complesso disturbo. L'ipotesi è che uno o più effetti di ciascuna di queste categorie sia condizionante ma insufficiente per lo sviluppo di CFS [50-54].

➤ **Fattori predisponenti**

Lo stile di vita e la personalità sembrano influenzare la possibilità d'insorgenza della CFS; il nevroticismo e l'introversione sono infatti annoverati tra i fattori di rischio [55]. L'inattività nell'infanzia e l'inattività dopo la mononucleosi infettiva sembrano aumentare il rischio di CFS negli adulti. Anche la genetica sembra avere un ruolo, poiché le donne sono maggiormente colpite rispetto agli uomini.

➤ **Fattori precipitanti**

Uno stress fisico o psicologico acuto può innescare l'insorgenza della CFS [18]. Tre quarti dei pazienti hanno riportato un'infezione, come un raffreddore, una malattia simil-influenzale o una mononucleosi infettiva [18,56]. Sono state trovate anche alte frequenze di febbre Q e di malattia di Lyme [57]. Ma nessuna prova immunologica è stata trovata a sostegno di queste ipotesi. Altri eventi somatici, come traumi gravi, interventi chirurgici, gravidanza o parto, sono stati riportati all'origine della CFS. Anche gravi eventi della vita, come la perdita di una persona amata o del lavoro, insieme ad altre situazioni stressanti, potrebbero trovarsi alla base dell'insorgenza.

➤ **Fattori perpetuanti**

Una volta che la CFS si è manifestata, molti fattori ne possono impedire la guarigione. Sembra che il lato psicologico sia coinvolto nel suo perpetuarsi. Ad esempio, si riportano fattori comportamentali come la persistente tendenza ad evitare attività, associate ad un aumento dei sintomi [58-61]. Spesso i pazienti sono convinti che la malattia abbia una reale causa fisica e prestano quindi un'elevata attenzione alle sensazioni corporee, contribuendo ad un aumento della stanchezza. In uno studio su gemelli monozigoti discordanti per la CFS, il gemello malato utilizzava più strategie per evitare l'attività rispetto al gemello sano. Sono stati identificati altri fattori perpetuanti, come i comportamenti solitari [62] e la mancanza di supporto sociale [63]. I medici possono contribuire al mantenimento della persistenza, incoraggiando l'esecuzione di procedure diagnostiche non necessarie, suggerendo di continuo cause psicologiche e non riconoscendo la CFS come una diagnosi [64,65].

1.1.5 Diagnosi

Mentre nel corso del 2011 i sintomi di questo disturbo sono stati ufficialmente identificati dall'International Consensus Criteria, la diagnosi rimane un punto dolente [66]. È formulata attraverso la storia del paziente e l'esclusione di altre cause

mediche o problemi psichiatrici [67]. In tal modo, la disponibilità di biomarcatori per la CFS potrebbe essere di grande utilità per la ricerca clinica. Arrivare a formulare una diagnosi precisa di questa malattia non è compito facile; possono passare molti anni prima che un paziente riceva la diagnosi corretta e, a tutt'oggi, si stima che in assoluto questa condizione venga riconosciuta in meno del 10% dei casi. I medici devono infatti affrontare pazienti che possono presentare le loro denunce di grave affaticamento in modi diversi. Alcuni semplicemente si trovano confusi e si chiedono che cosa stia loro accadendo, mentre altri si diagnosticano da soli la malattia, spesso ingenuamente, e questo può portare a irritazioni da parte del medico, soprattutto se questo è incerto o scettico circa la diagnosi di CFS o addirittura la contesta [68,69]. Alcuni pazienti hanno cercato una diagnosi a lungo e sperato di trovare risposte, e ancora di più soluzioni. Questa diversità di presentazioni sfida la capacità di gestione dei medici di medicina generale e degli specialisti. Per questo motivo, il primo passo nella diagnosi è conoscere le aspettative del paziente e i suoi obiettivi. Molti pazienti con CFS attribuiscono i sintomi a fattori somatici [70], ciò crea un'eccessiva aspettativa nei risultati dei test diagnostici. In un sondaggio di pazienti con CFS, due terzi erano insoddisfatti della qualità delle cure mediche e hanno sottolineato la necessità di una migliore comunicazione e migliore formazione dei medici.

La diagnosi viene fatta utilizzando i due principali criteri stabiliti da un gruppo di esperti di ricerca nella sindrome da fatica cronica. Il primo criterio afferma che il paziente deve avere un grave affaticamento cronico di sei mesi o più lunga durata con altre condizioni mediche conosciute escluse dalla diagnosi clinica (diagnosi per esclusione). Il secondo criterio richiede che i pazienti abbiano quattro o più dei caratteristici sintomi (Tabella 2) che si sono verificati nello stesso momento o dopo un grave affaticamento cronico e dopo un'influenza o un'infezione batterica. Nel caso di un sospetto della sindrome viene prescritta una lista di esami di routine utili per uno screening generale (Tabella 3).

Molti pazienti con sindrome da fatica cronica riportano i seguenti risultati di laboratorio:

- _ tasso di sedimentazione eritrocitaria (ESR) molto basso
- _ immunoglobuline elevate contro Coxsackie B virus HHV-6
- _ Chlamydia pneumoniae
- _ diminuito numero di cellule killer normale CBC
- _ test di funzionalità epatica normali
- _ analisi delle urine normali

Quando presi in gruppo, questi risultati supportano una diagnosi di sindrome da fatica cronica, ma non sono definitivi; solo i pazienti che soddisfano i due criteri stabiliti sono diagnosticati come tali [71]. L'unico test diagnostico che viene utilizzato è il profilo ATP, che si basa sulla biochimica della malattia, in particolare sulla funzione dei mitocondri nella produzione di ATP (adenosina trifosfato), che rappresenta la fonte di energia necessaria per tutte le funzioni del corpo e riciclaggio di ADP (Adenosina difosfato) per ricostituire il rifornimento di ATP come necessario. Una ridotta produzione di ATP, ed il conseguente ridotto apporto energetico, potrebbero infatti spiegare la peculiare fatica che caratterizza la malattia. Se non vi è dubbio circa la gravità dei sintomi o la disabilità, la valutazione di un breve questionario potrebbe essere utile per ottimizzare il processo di diagnosi [72]. L'educazione del paziente da parte del medico risulta però essenziale e dovrebbe includere una spiegazione del modello della malattia, informazioni sui trattamenti efficaci, e la motivazione per la terapia. Più attenzione a questi fattori nella formazione dei medici è quello che viene richiesto dagli stessi pazienti.

Esame emocromocitometrico con formula leucocitaria

VES, PCR

AST, ALT, gammaGT, CPK, LDH

Protidemia ed elettroforesi sieroproteica

Creatininemia

Glicemia

Elettroliti e calcemia

Urine

TSH

Sideremia

Fattore reumatoide e ANA

Tabella 3 Esami di laboratorio consigliati come screening di routine per la sindrome della stanchezza cronica (Klonoff DC. Chronic fatigue syndrome. ClinInfectDis 1992; 15: 812-

23)

1.1.6 Terapia

A oggi non esiste una terapia efficace per la CFS. In generale tutte le terapie tentate – farmacologiche e non (cognitivo-comportamentali, fisiochinesi terapeutiche e riabilitative) – hanno avuto scopo palliativo. I cardini della terapia restano il sostegno emotivo del malato, la riduzione della sintomatologia e un miglioramento funzionale

(qualità della vita) [36]. I trattamenti farmacologici hanno compreso l'uso di immunomodulanti (immunoglobuline), psicofarmaci (sedativi, antidepressivi, ansiolitici), antivirali (aciclovir), cortisonici, tutti con effetti scarsi. Per contrastare i sintomi più invalidanti si usano gli antidolorifici e gli antinfiammatori contro i dolori, gli stimolanti contro la difficoltà di concentrazione e l'astenia. Talvolta anche i miorilassanti e gli integratori. Un approccio di squadra che coinvolge medici e pazienti è la chiave per gestire con successo la CFS. Dato che la patologia colpisce i pazienti in modo diverso, il trattamento della sintomatologia deve essere personalizzato per singolo individuo per affrontare i sintomi che sono più dirompenti o la disabilità in un contesto olistico del paziente. Aiutare il malato ad ottenere sollievo dai sintomi è lo scopo principale del trattamento. Tuttavia, far ritornare un paziente alle attività normali non dovrebbe essere l'obiettivo immediato, perché lo sforzo fisico e mentale necessario per tentare di riuscirci può aggravare la malattia. In generale, i pazienti cui viene diagnosticata entro i primi due anni di sintomi, rispondono meglio al trattamento sintomatico di quelli diagnosticati dopo due o più anni.

Alcuni specialisti suggeriscono che dieta e nutrizione giochino un ruolo importante e raccomandano assunzione di:

- _ vitamina D
- _ vitamina B6
- _ vitamina B12
- _ Lisina
- _ integratori di glutazione

Il modello dei fattori perpetuanti mostra delle relazioni causali tra i motivi comportamentali e cognitivi e i sintomi della malattia, e questo è stato un punto di partenza promettente per l'elaborazione della CBT (Cognitive Behavioral Therapy). Questa terapia è una forma generale di psicoterapia diretta a modificare le condizioni di salute connesse ai comportamenti. I canoni centrali della CBT per la CFS includono la spiegazione del modello eziologico, la motivazione per la terapia, la realizzazione e il mantenimento di un importo di base di attività fisica, il graduale aumento dell'attività fisica, e il lavoro di pianificazione alla riabilitazione. Questo metodo insegna ai pazienti come acquisire controllo sui sintomi. CBT e GET (Graded Exercise Therapy) sono gli unici interventi che sono risultati essere benefici [73].

Non essendoci cure mirate, spesso i pazienti ricorrono alla medicina alternativa come l'omeopatia, le erbe o i massaggi. Il gruppo di ricerca Alrek et al. del 2011 [74] ha compiuto una revisione di studi randomizzati controllati di trattamenti CAM (Complementary and Alternative Medicine) nei pazienti con CFS per riepilogare le prove esistenti in questa popolazione di pazienti. Sono stati inclusi tutti gli studi clinici controllati randomizzati (Randomized Controlled Trial, RCT) delle possibile terapie CAM intraprese come unico trattamento o in aggiunta ad altri, ad eccezione dell'agopuntura e del complesso delle erbe medicinali cinesi. Dopo aver analizzato gli effetti sui pazienti dell'omeopatia, del ginseng, dei massaggi, del tai chi e altro le conclusioni erano abbastanza limitate per dare una significativa risposta all'efficacia di queste terapie, ma la dimensione totale dei campioni e il rischio di bias erano piuttosto alti.

La maggior parte dei medici concorda sul fatto che i pazienti con sindrome da fatica cronica devono stare attenti all'attività ed evitare qualsiasi esercizio fisico in quanto potrebbe rendere i sintomi della sindrome più severi. Di conseguenza si raccomanda solo esercizio fisico lieve o moderato.

1.2 Mitocondri

I mitocondri sono organelli cellulari presenti in tutte le cellule eucariote. Hanno un proprio genoma, costituito da una molecola circolare di DNA a doppio filamento (mtDNA), un proprio RNA ed un sistema completo di trascrizione e traduzione che porta alla sintesi di poche proteine fondamentali per la funzione mitocondriale. Il genoma mitocondriale possiede 37 geni codificanti per due RNA ribosomiali (rRNA), 22 RNA di trasporto (tRNA) e 13 proteine che fanno parte dei complessi enzimatici deputati alla fosforilazione ossidativa. In ogni mitocondrio si trovano da due a dieci copie del genoma. La presenza della catena di trasporto degli elettroni con la sua capacità di produrre radicali liberi, la mancanza di istoni ed i limitati sistemi di riparo, rendono il DNA mitocondriale facilmente danneggiabile ed in effetti il suo tasso di mutazione è circa dieci volte maggiore di quello nucleare [75].

La teoria endosimbiotica afferma che i mitocondri deriverebbero da ancestrali batteri, dotati di metabolismo ossidativo, che sarebbero stati inglobati dalle cellule eucariote con conseguente mutuo beneficio. Successivamente i batteri avrebbero trasferito gran parte del loro materiale genetico a quello cellulare, divenendo così, mitocondri [75].

1.2.1 Struttura

Hanno una forma sferica, cilindrica o filamentosa e una lunghezza di circa 0,5-2 μm . È delimitato da una doppia membrana: quella esterna che contiene una proteina detta porina che svolge un ruolo chiave nel controllo della permeabilità, permettendo il passaggio di piccole molecole; e quella interna, altamente impermeabile ai piccoli ioni a causa di un fosfolipide, la cardiolipina, e ripiegata in estroflessioni chiamate creste mitocondriali. La funzione di queste strutture è quella di aumentare la superficie di membrana che permette di disporre un numero maggiore di complessi di ATP sintetasi e di fornire pertanto maggiore energia.

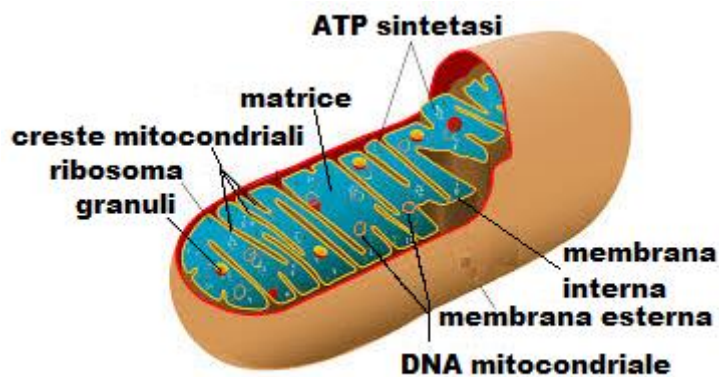


Figura 1 Struttura interna di un mitocondrio

Le due membrane mitocondriali presentano differenti proprietà a causa della loro diversa composizione. La membrana esterna è composta per il 50% da lipidi e per il resto da svariati enzimi dalle molteplici attività mentre la membrana interna ha un rapporto in peso proteine/lipidi che si aggira intorno a 3:1 e contiene più di 100 molecole polipeptidiche. Le due membrane identificano due differenti regioni: lo *spazio intermembrana* e la *matrice*. Il primo è compreso tra membrana esterna ed interna, contiene proteine coinvolte soprattutto nell'apoptosi e nella produzione di energia, il secondo invece ha una consistenza più viscosa del citoplasma che si presenta più acquoso, contiene enzimi solubili che catalizzano reazioni di ossidazione di piccole molecole organiche e presenta anche ribosomi e molecole di DNA circolare.

1.2.2 Funzioni

I mitocondri sono organelli microscopici considerati le centrali energetiche degli organismi. Questo perché al loro interno avvengono dei processi biochimici come la

respirazione mitocondriale che fornisce alle cellule l'energia di cui hanno bisogno per le funzioni vitali.

I principali processi in cui interviene sono:

- **Fosforilazione ossidativa:** la funzione principale dei mitocondri è quella di generare energia, sotto forma di ATP, come processo finale di altre vie metaboliche quali glicolisi e ciclo di Krebs. In particolare il piruvato, prodotto dalla glicolisi, viene trasportato all'interno della matrice mitocondriale dove viene decarbossilato e coniugato con il coenzima A per formare acetilCoA che viene immesso nel ciclo di Krebs, o degli acidi tricarbossilici, al termine del quale vengono generate tre molecole di NADH e una di FADH₂. Gli elettroni trasportati da NADH e FADH₂ vengono scambiati nella catena di trasporto degli elettroni, costituita da 5 complessi proteici posizionati sulla membrana mitocondriale interna:

Complesso 1: NADH CoQ reduttasi o NADH deidrogenasi

Complesso 2: Succinato CoQ reduttasi o Succinato deidrogenasi

Complesso 3: CitocromoC reduttasi

Complesso 4: Citocromo C ossidasi

Complesso 5: ATP sintetasi

Ciò che rende possibile la produzione di ATP sono due processi, il primo è rappresentato dall'ossidazione dei substrati e il trasferimento di elettroni

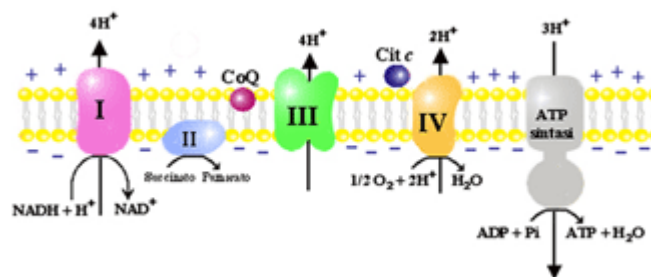


Figura 2 Rappresentazione schematica della catena di trasporto degli elettroni e dell'ATP sintetasi

all'accettore finale, ovvero l'ossigeno molecolare; allo stesso tempo i complessi I, III e IV trasferiscono protoni contro gradiente nello spazio intermembrana; il secondo processo è la fosforilazione di ADP nella quale si sviluppa un gradiente protonico elettrochimico che permette all' ATP-sintetasi di far tornare i protoni all'interno della matrice e fornire l'energia necessaria per generare ATP [76].

- **Regolazione dell'apoptosi:** il mitocondrio funziona da centrale d'integrazione degli stimoli apoptotici. Essi possono essere di molteplice natura e sono in grado

di determinare l'apertura di un complesso poliproteico chiamato poro di transizione mitocondriale (mtPTP), un canale non specifico sulla membrana interna mitocondriale, che permette il passaggio di molecole con massa inferiore a 1,5 KDa. L'apertura del canale provoca un massiccio rigonfiamento del mitocondrio e rottura della membrana con liberazione nel citoplasma di fattori stimolanti l'apoptosi, che sono in grado di raggiungere il nucleo ed attivare una via in grado di degradare il DNA. L'apertura del poro è accompagnata da un elevato livello di Ca^{++} nella matrice e da situazioni di stress ossidativo [77].

- **Sintesi e controllo delle ROS:** Una piccola frazione dell'ossigeno non è convertita nell'acqua ma è ridotta parzialmente a radicale anionico superossido O^{2-} , il quale non è stabile e si trasforma in due altri radicali particolarmente tossici [78]:

- H_2O_2 , acqua ossigenata prodotta dalla riduzione di due elettroni dell'ossigeno in presenza di metalli come il Fe^{2+} o Cu^+

- OH^{\cdot} , radicale ossidrilico, il più dannoso essendo il più reattivo.

La produzione di queste specie reattive può portare al danno ossidativo delle proteine mitocondriali, delle membrane e del DNA, diminuendo l'abilità dei mitocondri di svolgere le loro normali funzioni compresa la produzione di ATP. Il danno ossidativo incrementa la tendenza del mitocondrio a rilasciare proteine appartenenti allo spazio intermembrana, come il citocromo C, nel citosol attraverso il passaggio dalla MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization); inoltre può indurre l'apertura del mtPTP.

1.2.3 Mitocondri e Sindrome della Fatica Cronica

Essendo i mitocondri la centrale energetica dell'organismo, un problema legato al loro non corretto funzionamento comporta una minore distribuzione di energia alle cellule e ai tessuti, con conseguente senso di affaticamento, scarsa concentrazione e dolore muscolare. Studi su pazienti affetti da CFS hanno dimostrato evidenti disfunzioni mitocondriali [79,80]. Biopsie muscolari, analizzate con microscopio elettronico hanno dimostrato anormali degenerazioni mitocondriali nei pazienti con sindrome della fatica cronica e inoltre sono state trovate delezioni di geni nel DNA mitocondriale (mtDNA), che sono responsabili della produzione di energia [81,82].

1.3 Proteomica e CFS

1.3.1 Proteomica

Il termine “proteoma” viene usato per indicare l'insieme di tutti i possibili prodotti proteici espressi in una cellula, incluse tutte le isoforme e le modificazioni post-traduzionali. La proteomica è una branca della biologia molecolare che ha come obiettivo l'identificazione di tutte le proteine che vengono prodotte in un organismo in condizioni fisiologiche, di valutarne l'alterazione in stati differenti e di comprendere quali meccanismi siano alla base della comparsa degli stati patologici e quali biomarcatori possano essere segnali di malattia. Diversamente dal genoma, che è un'entità relativamente stabile, il proteoma è variabile in modo costante nella vita di un individuo e risulta molto più dinamico. L'analisi diretta delle proteine di una cellula offre indubbi vantaggi rispetto al comune approccio genomico, dato che quest'ultimo non fornisce informazioni precise sui livelli di proteine della cellula; inoltre, non può rilevare le eventuali modificazioni post-traduzionali che determinano le funzioni delle proteine e che risultano particolarmente importanti nella traduzione del segnale [83]. Per questo si rende necessario calibrare molto precisamente gli strumenti analitici, operare nei tempi previsti e con la massima cura possibile.

Esistono due branche nella proteomica:

- *Proteomica strutturale*: ha lo scopo di capire e dare una definizione delle variazioni dell'espressione proteica all'interno di una cellula o un tessuto in condizioni diverse da quelle fisiologiche;
- *Proteomica funzionale*: ha lo scopo di definire la funzione biologica di alcune proteine di cui ancora non si conosce il ruolo.

Generalmente uno studio proteomico è composto dalle seguenti fasi:

1. Preparazione del campione
2. Prima dimensione: focalizzazione isoelettrica
3. Seconda dimensione: SDS-PAGE
4. Visualizzazione ed analisi dei risultati

Elettroforesi bidimensionale

L'elettroforesi bidimensionale (2-DE) ha lo scopo di separare le proteine di un tessuto (o di una cellula) in due modi consequenziali, favorendone l'isolamento e il conseguente riconoscimento. In un singolo gel, partendo da miscele complesse si possono separare, identificare e quantificare centinaia di proteine. Storicamente la 2-DE deriva dall'accoppiamento delle tecniche elettroforetiche elaborate da U.K. Laemmli e da M. Gronow e G. Griffith pertanto prevede due corse elettroforetiche, dette prima e seconda dimensione.

La *prima dimensione* è l'isoelettrofocalizzazione, tecnica con la quale le proteine sono suddivise in base al loro punto isoelettrico (valore di pH al quale una molecola non possiede alcuna carica elettrica), posizionando il campione lungo una strip a gradiente di pH sotto un campo elettrico. Le proteine sono molecole anfotere perciò possono avere sia carica negativa, sia positiva, sia uguale a zero e queste migrano lungo la strip fino a che non raggiungono il punto isoelettrico [84]. Attualmente si trovano in commercio gradienti immobilizzati di acrilamide in miscela acida da un lato e in miscela basica dall'altro già pronti che rendono l'analisi meno soggetta a errori dell'operatore, quindi più sicura rispetto a quando i gel venivano preparati e tagliati in ogni laboratorio.

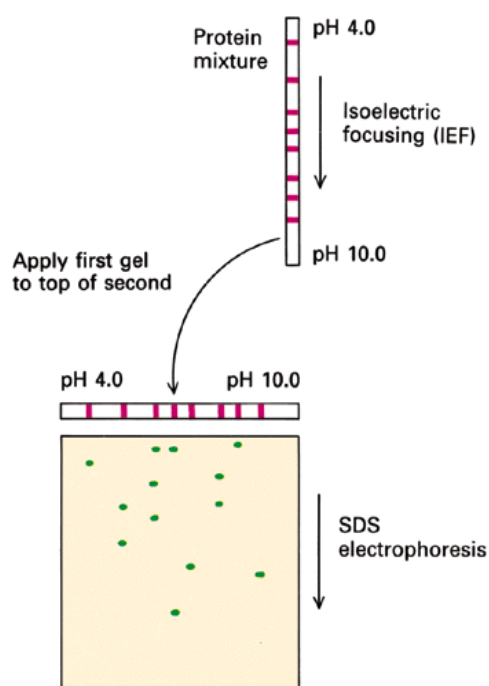


Figura 3 Separazione in prima dimensione (per carica) e in seconda dimensione (per dimensione)

La *seconda dimensione* (SDS-PAGE)

può avvenire sia in orizzontale che in verticale e consiste in una corsa attraverso un gel di poliacrilammide. Le proteine si dispongono in base al loro peso molecolare perché mentre le molecole piccole non sono impedito dalle maglie del gel, le molecole più grandi passano con più difficoltà perciò più lentamente e non raggiungono la fine del gel una volta terminata la corsa. In questa fase la carica intrinseca delle proteine è mascherata grazie all'SDS utilizzato per preparare il gel; il sodio dodecilsolfato (SDS) essendo un detergente anionico genera micelle caricate

negativamente intorno alle molecole, permettendo così una divisione solo in base al peso molecolare [84].

Spettrometria di massa

È la principale strumentazione utilizzata in proteomica e rappresenta la tecnica più sensibile e versatile per il riconoscimento delle proteine, divenuta molto importante per lo studio dell'effetto di nuovi farmaci, per caratterizzare le modifiche post-trasduzionali e i livelli di espressione in momenti fisiologici o patologici. Si basa sul principio secondo cui una molecola quando viene ionizzata dà un catione che, frammentandosi, forma radicali cationici rilevabili da un detector che li discrimina in base al loro rapporto massa/carica. Perciò l'analisi spettrofotometrica si compone di tre parti: la *ionizzazione della molecola*, che avviene ad opera di un fascio di elettroni generata da una sorgente che varia in base al tipo di tecnica utilizzata e può essere chimica (es. acidi di Bronsted) o fisica (es. impatto elettronico); la *separazione degli ioni generati* tramite analizzatori che permettono l'ingresso degli ioni al rivelatore in modo ordinato per favorirne l'analisi ed infine la *rivelazione* tramite strumenti costituiti da serie di elettrodi che hanno lo scopo di amplificare il segnale emesso dal catione (lo ione colpisce il primo elettrodo che emette un fascio di elettroni maggiore che colpisce il secondo elettrodo e così via fino all'analizzatore finale) ed inviarlo ad un calcolatore che lo digitalizza e lo elabora [84]. Alla fine dell'analisi si otterranno una serie di picchi che l'operatore dovrà interpretare o confrontare con standard di molecole già riconosciute nel laboratorio (questo perché l'interpretazione degli spettri di massa a differenza di quelli MNR o IR hanno regole meno precise, inoltre le molecole d'interesse non è detto che si frammentino sempre nel solito modo una volta venute in contatto con la sorgente ionizzante). Uno degli approcci principali è la peptide-mass fingerprinting utilizzando la matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI).

1.3.2 Studi sulla CFS

Abbiamo visto come sia difficile definire l'eziologia della CFS; per questo motivo, negli ultimi anni, sono stati condotti diversi studi proteomici con lo scopo di identificare dei biomarcatori utili per la ricerca e la terapia. Lo studio di Schutzer et al. che ha messo a confronto la CFS con la Sindrome nPTLS, oltre a dimostrare che le due sindromi non sono correlate attraverso la proteomica, nonostante i sintomi

simili, ha mostrato come l'analisi proteomica della CFS possa fornire importanti e significativi approfondimenti sui processi biologici modulati in funzione della malattia e facilitare l'identificazione di proteine candidate per future indagini [85]. Anche lo studio di Ciregia et al. ha dimostrato l'importanza di questa branca della biologia: partendo da un precedente studio su due gemelli monozigoti, discordanti per la diagnosi della malattia, che non ha identificato un biomarcatore nel trascrittoma dei leucociti del sangue periferico, si è spostato ad indagare campioni salivari nella coppia di gemelli. L'analisi ha permesso di identificare 13 proteine con una differenza di espressione tra il sano e il malato: 9 risultavano aumentate nel malato, le altre 4 invece diminuite. Questa differenza è probabilmente correlata alla presenza della sindrome perciò si crede che un approccio proteomico sia utile per trovare potenziali biomarcatori e gettare nuova luce sui meccanismi patogenetici alla base della CFS [86].

Capitolo 2 – SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi nasce da un precedente studio comparativo, condotto nel nostro laboratorio, e pubblicato nel 2013, che ha visto l'utilizzo dell'elettroforesi bidimensionale per confrontare il contenuto proteico salivare di una coppia di gemelli monozigoti discordanti per la CFS. Successivamente, visti i risultati incoraggianti, abbiamo proseguito lo studio sulla stessa coppia di gemelli analizzando le proteine mitocondriali estratte da piastrine. A tale scopo, l'analisi proteomica è stata condotta utilizzando due tecniche complementari: 2-DE e la spettrometria di massa (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; LC-MS/MS). Per la spettrometria di massa ci siamo avvalsi della collaborazione col gruppo di ricerca del prof. Albert Sickmann di Dortmund (Leibniz Institute for Analytical Sciences; Dortmund, Germany). Da questa analisi comparativa sono emerse differenze nell'espressione di proteine mitocondriali che quindi supporterebbero il coinvolgimento nella CFS di un'alterata attività mitocondriale. Le proteine che soddisfacevano i criteri statistici e biologici per importanza sono state selezionate per la validazione in fluidi biologici facilmente accessibili quali siero e saliva in un'ampia coorte di pazienti con CFS e soggetti sani. In particolare questa tesi ha lo scopo di validare, tramite western blot, la diversità di espressione di tre proteine: aconitasi, malato deidrogenasi e ATP5B.

Capitolo 3 – MATERIALI E METODI

3.1 Materiali e strumentazioni

L'acqua, di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

L'apparecchio impiegato per l'elettroforesi è il Mini Protean® Tetra System (Biorad) con alimentatore Power Prac Universal (Biorad).

Per il Western Blot sono state utilizzate membrane di nitrocellulosa Mini format 0.2µm specifici per l'apparecchio Trans-Blot® Turbo™, Transfer System (Biorad).

Le immagini (a fluorescenza e a chemiluminescenza) sono state acquisite tramite lo strumento ImageQuant LAS 4010 della ditta GE Healthcare Bio- Sciences AB (Uppsala, Sweden).

Gli anticorpi primari, ATP5B, Aconitasi e Malato deidrogenasi, sono stati acquistati il primo dalla Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, U.S.) e gli altri due dalla Cell Signaling Technology (Danvers, MA, U.S.).

Anche lo standard Biotinilated Protein Ladder e l'Antibiotin HRP-linked sono stati comprati da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, U.S.).

L'anticorpo secondario "anti rabbit" viene dalla ditta Stressgen Biotechnologies Corporation (San Diego, CA, U.S.)

3.2 Reclutamento campioni

Un campione di 41 soggetti con diagnosi di CFS è stato reclutato presso l'unità di reumatologia dell'Università degli Studi di Pisa tra giugno 2010 e gennaio 2011 (età media $43,4 \pm 13,2$; $M \pm SD$). La malattia è stata loro diagnosticata secondo i criteri ACR da uno specialista reumatologo; sono stati inclusi sia pazienti nuovi che quelli già in cura, di almeno 18 anni di età, secondo i criteri di Fukuda del 1994. Il Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana ha approvato tutte le procedure di reclutamento e di valutazione. Tutti i pazienti interessati a prendere parte allo studio sono stati sottoposti a un'analisi psichiatrica. Tutti i soggetti hanno firmato un consenso informato e, dopo aver ricevuto una spiegazione completa dello studio hanno avuto l'opportunità di fare domande. È stata raccolta e registrata l'anamnesi di ogni paziente concentrandosi soprattutto sulle comorbidità e i farmaci

concomitanti. Tutti i pazienti hanno inoltre compilato diverse versioni di questionari riguardanti lo stile di vita, i compiti neurocognitivi e l'impatto della fatica sulle loro attività.

Sono stati scelti 50 soggetti sani con un'età media simile ($38,6 \pm 6,2$; $M \pm SD$) e caratteristiche demografiche simili.

3.3 Raccolta e preparazione dei campioni

3.3.1 Campioni di saliva

La saliva umana è un fluido biologico con un grande potenziale per riflettere le condizioni di salute sistemiche. Di recente infatti il numero di pubblicazioni relative al proteoma salivare sono notevolmente aumentate e descrivono i molti vantaggi che questa ha in termini di bassa invasività, costi minimi, facile raccolta e lavorazione. Inoltre, la saliva ha una composizione proteica meno complessa del siero o del plasma, riduce così il rischio di interazioni non specifiche, e allo stesso tempo costituisce un utile strumento diagnostico visto che circa il 30% delle proteine del sangue sono anche presenti nella saliva [86,87]. I campioni sono stati raccolti la mattina presto (tra le ore 8 e 10) in condizioni standard, cioè a tutti i soggetti è stato chiesto di essere a stomaco vuoto. Sono stati ottenuti tra 1 e 3 ml di saliva da ciascun soggetto. Per minimizzare la degradazione delle proteine, i campioni sono stati elaborati immediatamente e conservati in ghiaccio durante il processo. Per rimuovere i detriti, sono stati sottoposti a centrifugazione a 14000 g per 30 minuti a 4 ° C, per poi eseguire il dosaggio proteico DC/BIORAD sul sovrantante.

3.3.2 Campioni di siero

Sono stati raccolti campioni di sangue al mattino in condizioni standard (senza aver mangiato e bevuto dalla sera precedente). I campioni sono stati centrifugati a 3500 g per 10 minuti a temperatura ambiente e il siero è stato conservato a -80 C°.

3.4 Metodi

3.4.1 Dosaggio proteico DC/BIORAD

Il DC Protein Assay è un saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica che si basa sul protocollo di Lowry, mediante la costruzione di una curva di taratura tramite la lettura dell'assorbanza di una proteina di riferimento a diverse concentrazioni. Il dosaggio è basato sulla reazione delle proteine con una soluzione di tartrato di rame e reagente Folin: a pH alcalino avviene una reazione tra le proteine e il rame e conseguentemente queste vanno a ridurre il reagente producendo delle specie riducenti che hanno colorazione blu.

È necessario che la proteina con cui si costruisce la retta di taratura sia sospesa esattamente nello stesso solvente in cui sono sospesi i campioni, altrimenti si possono avere interferenze non compensate che falsano i risultati. Nel nostro caso la proteina standard è stata l'albumina bovina, risospesa in acqua milliQ.

Il dosaggio viene effettuato in doppio, a temperatura ambiente e segue questa procedura:

- Preparazione di cinque concentrazioni (con un volume di 20 µl) di proteina standard (0,3-0,6-1,2-1,8-2 mg/ml) che abbracciano l'intervallo di sensibilità del metodo (Tabella 4)
- Preparazione del campione, diluito 1:4, per avere un volume finale di 20 µl
- Aggiunta di 100 µl di soluzione A*
- Vortex
- Aggiunta di 800 µl di soluzione B
- Vortex
- Incubazione di 30 minuti
- Lettura allo spettrofotometro a 750nm

	H ₂ O milliQ	BSA	Concentrazione	BSA
Bianco	20 µl	-	0 µg/µl	0 µg
1	17 µl	3 µl	0.3 µg/µl	6 µg
2	14 µl	6 µl	0.6 µg/µl	12 µg
3	8 µl	12 µl	1.2 µg/µl	24 µg
4	2 µl	18 µl	1.8 µg/µl	36 µg
5	-	20 µl	2 µg/µl	40 µg

Tabella 4 Diluizioni della BSA per la retta di taratura.

I valori di assorbanza ottenuti per le concentrazioni note di proteina standard si usano per costruire una retta di taratura, che avrà un'equazione $y=mx$, dove m sarà il nostro valore di assorbanza. Da questa equazione si ricava facilmente la concentrazione proteica del campione incognito:

$$\frac{(\text{lettura campione} - \text{lettura bianco})}{\text{assorbanza}} \times \text{fattore diluizione} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

3.4.2 SDS Page e Western Blot

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) seguita dal Western Blot (WB) è una tecnica biochimica che permette l'analisi di un estratto proteico ed in particolare l'identificazione di una determinata proteina mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici contro di essa. Questo è possibile tramite l'utilizzo di due anticorpi consecutivi: un anticorpo primario, specifico per la proteina d'interesse e uno secondario che riconosce e si lega all'anticorpo primario, e che una volta trattato con kit chemiluminescente permette di determinare qualitativamente e semi-quantitativamente il contenuto proteico per campione. La tecnica è stata definita e descritta per la prima volta nel 1979 da H. Towbin [88] e successivamente affinata, fino a divenire una delle più utilizzate nei laboratori di ricerca nella individuazione di proteine specifiche. La specificità nel legame antigene-anticorpo permette di riconoscere la proteina di interesse nel mezzo di una miscela complessa. E' un metodo analitico che consiste in

diverse fasi: la separazione delle proteine tramite elettroforesi (SDS-page), il trasferimento del materiale proteico su una membrana di nitrocellulosa o PVDF ed infine il riconoscimento della proteina da parte dell'anticorpo.

➤ Prima fase: Elettroforesi

Il primo passaggio prevede la preparazione dei gel di poliacrilammide che si ottengono tramite la polimerizzazione di una soluzione costituita da un monomero monofunzionale, l'acrilamide, e da un dimero bifunzionale, la N-N-metilen-bis-acrilammide. La percentuale di queste sostanze all'interno della soluzione determina la dimensione dei pori del gel, quindi la sua capacità di trattenere proteine ad alto PM: maggiore è la percentuale di acrilammide e bis-acrilammide, minore sarà la dimensione dei pori.

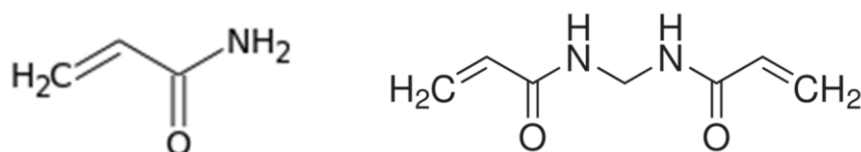


Figura 4 Strutture chimiche di acrilamide e bis-acrilammide

La polimerizzazione dipende dall'azione combinata di un catalizzatore (la tetrametiletilendiammina, TEMED) e di una molecola capace di formare un radicale libero (ammonio persolfato), che va ad agire sul doppio legame vinilico creando degli iniziatori di catena che danno inizio alla formazione del polimero e della gelificazione.

Viene preparato il running gel, nel nostro caso al 12%, colato tra due vetrini e ricoperto con butanolo per evitare il contatto con l'ossigeno dell'aria. Dopo che il gel è polimerizzato si lava con acqua per eliminare il butanolo.

Composizione del running gel (10 ml-quantità per due mini gel con spessore 0,75 mm):

- H₂O MilliQ; 3,3 ml
- Acrilamide 30%; 4 ml
- TRIS 1,5M pH 8,8; 2,5 ml
- SDS 10%; 100 µl
- Ammonio persolfato 0,1%; 100 µl
- TEMED; 4µl

Si aggiunge poi lo stacking gel, che rappresenta la porzione superiore, all'interno del quale vengono creati i pozzetti di caricamento con un apposito pettinino; inoltre consente di impaccare tutto il materiale caricato in modo che arrivi uniformemente sul fronte di corsa.

Composizione dello stacking gel (4ml):

- H₂O MilliQ; 2,70ml
- Acrilamide 30%; 670µl
- TRIS 0,5M pH 6.8; 500µl
- SDS 10%; 40µl
- Ammonio persolfato 0,1%; 40µl
- TEMED; 4µl

Si preparano poi le aliquote da caricare nei pozzetti, tutte diluite in condizioni denaturanti in soluzione di Laemmli Buffer (Upper Buffer, SDS 20%, glicerolo, H₂O milliQ, β-mercaptoetanolo, blu di bromofenolo) a diverse concentrazioni a seconda della quantità di proteine contenute nel campione. Nel nostro caso per la saliva abbiamo solubilizzato un volume corrispondente a 30µg per il riconoscimento di Aconitasi e Malato deidrogenasi e 10µg per l'ATP5B; per il siero invece preparavamo un'aliquota diluita 1:200. L'SDS è un detergente fortemente ionico che, oltre a rompere le interazioni idrofobiche che mantengono ripiegata la proteina, conferisce una carica elettrica negativa in media ogni 2 residui di amminoacido, mascherando la carica intrinseca della proteina. Le proteine trattate con SDS sono quindi denaturate e con un numero di cariche proporzionale al loro peso molecolare.

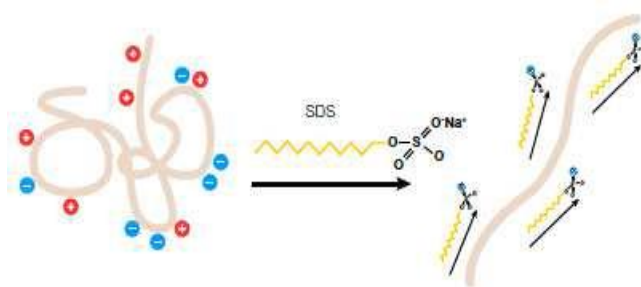


Figura 5 Azione denaturante dell'SDS

Di conseguenza, l'elettroforesi di proteine in un gel contenente SDS agisce sulla base delle loro masse per le proprietà di gel filtrazione che esse esprimono. Anche il β-mercaptoetanolo ha attività denaturante, idrolizzando i ponti disolfuro proteici e rompendo struttura terziaria e quaternaria. Il glicerolo conferisce invece al campione la densità necessaria per depositarsi in fondo al pozzetto.

Le aliquote pronte vengono vortexate, spinnate e bollite per 5 minuti, dopodichè sono caricati 20µl in ogni pozzetto. Accanto ai campioni si fanno correre anche 6µl di

standard (Biotinilated Protein Ladder) contenente proteine a peso molecolare noto nell'intervallo da 200 a 12 kDa.

La corsa viene effettuata in camera elettroforetica (Mini-PROTEAN® Tetra Cell) dopo riempimento con Running Buffer (TRIS, tris-(2-idrossimetil)-amminometano cloridrato, 25mM + glicina 192mM + SDS 0,1% + H₂O q.b. a due litri, diluito successivamente 1:10). La corsa elettroforetica è effettuata in condizioni di amperaggio costante: per i primi quindici minuti alla camera viene applicato un amperaggio pari a 8mA per gel, per i minuti successivi pari a 20mA per gel; la corsa finisce quando il colorante blu di bromofenolo presente nella soluzione di Laemmli arriva al fondo corsa. Il tempo della corsa elettroforetica è di circa 50 minuti.

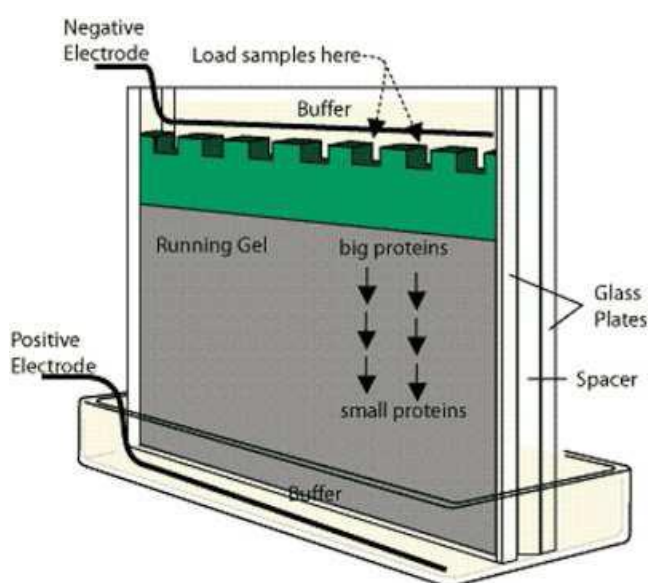


Figura 6 Esempio di SDS Page

➤ Seconda fase: Trasferimento da gel a nitrocellulosa

Una volta terminata la corsa, è stato effettuato il trasferimento delle proteine su di una membrana di nitrocellulosa (0.2 µm) mediante Trans-Blot Turbo, transfer system (BIO-RAD). Il meccanismo è equiparabile a quello della corsa elettroforetica: applicando un campo elettrico in cui il gel è più vicino al catodo e la nitrocellulosa all'anodo, le proteine (caricate negativamente per la presenza di SDS) dal gel si trasferiscono al foglietto di nitrocellulosa. Il processo richiede 7 minuti.

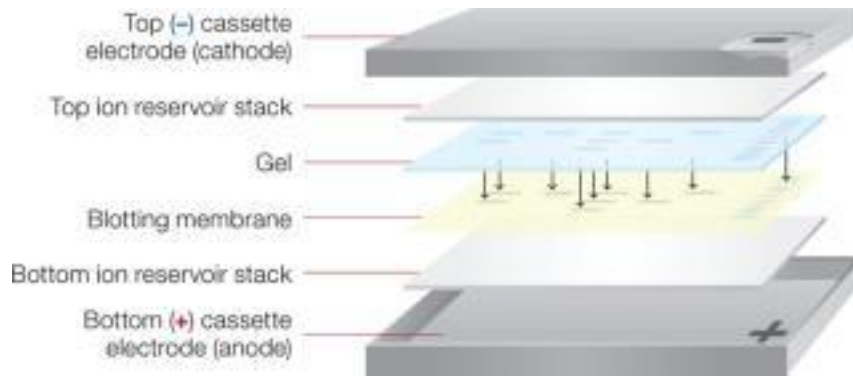


Figura 7 Schematizzazione procedura di trasferimento a membrana di nitrocellulosa

➤ Terza fase: Acquisizione con il rutenio

Dopo il trasferimento la nitrocellulosa viene messa in vaschette di plastica su di un oscillatore e sottoposta a colorazione al rutenio, al fine di visualizzare le proteine totali per normalizzare il contenuto proteico dei campioni. Con normalizzazione si intende la determinazione della quantità totale di proteine nel campione, per permettere la successiva quantificazione della proteina d'interesse.

La procedura avviene in diversi step:

- Fixing (acido acetico 7%, metanolo 10%, acqua) per 15 minuti
- 4 lavaggi con H₂O da 5 minuti
- Colorazione al rutenio (acido fosforico 1,18%, etanolo 30%, rutenio 1 μM, acqua) per 15 minuti al buio
- 7 lavaggi con H₂O da 1 minuto

Il rutenio è un metallo di transizione raro che, dopo un procedimento di solubilizzazione con reagenti, forma un colorante inorganico cationico il quale marca qualsiasi sito carico negativamente formando complessi che emettono fluorescenza, la cui immagine è acquisibile con lo strumento ImageQuant LAS 4010.

➤ Quarta fase: "Blocking"

Dopo l'acquisizione le nitrocellulose vengono riposte nelle vaschette sull'oscillatore e inizia un'ora di incubazione in Milk-PBS (Nonfat Dried Milk 3% + Tween 20 0,2% + PBS) con lo scopo di saturare i siti idrofobici liberi sulla membrana e prevenire il legame dell'anticorpo primario alla membrana stessa.

➤ Quinta fase: Legame con anticorpo primario

Le nitrocellulose sono sottoposte a incubazione over night in camera fredda a -80° con l'anticorpo primario, opportunamente diluito in Milk-PBS, che riconosce la proteina specifica immobilizzata sulla membrana.

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati:

1. Aconitasi (ACO2 D6D9 XP[®] Rabbit mAb); 1:1000
2. Malato deidrogenasi (MDH2 D8Q5S Rabbit mAb); 1:1000
3. ATP5B (H-300); 1:200

➤ Sesta fase: Legame con anticorpo secondario

Vengono effettuati 4 lavaggi da 10 minuti con Milk-PBS così da rimuovere l'anticorpo legatosi alla membrana in modo aspecifico e subito dopo l'incubazione di un'ora con l'anticorpo secondario (Antirabbit con diluizione 1:10000) coniugato a un enzima (horseradish peroxidase, HRP) che riconosce specificamente il primario già legatosi alla proteina sulla membrana, e antibiotina (diluizione 1:5000), in modo da legare e far visualizzare la biotina presente nello standard.

➤ Settima fase: "Detection"

Tolto l'anticorpo secondario, seguono di nuovo quattro lavaggi con PBS-milk da 10 minuti, 2 lavaggi con PBS da 5 minuti ed infine un ultimo lavaggio con acqua da un minuto. A questo punto la membrana di nitrocellulosa deve essere incubata per un minuto al buio con Luminolo (ECL Kit) in modo che riveli le proteine. Il luminolo

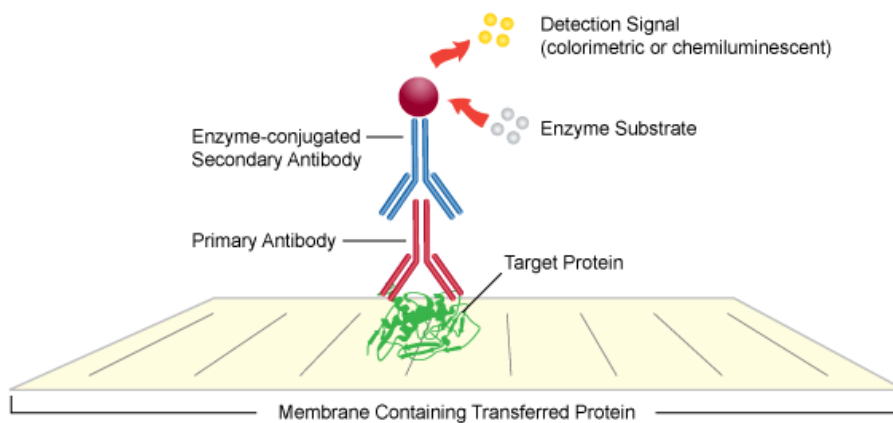


Figura 8 Detection nel Western blot

viene fatto reagire con un ossidante inorganico (H_2O_2) che attiva la perossidasi coniugata all'anticorpo secondario, convertendo il luminolo in modo che emetta luce. La quantità di luminescenza sarà proporzionale alla quantità del secondario, quindi alla quantità della proteina che stiamo cercando.

3.4.3 Imagequant LAS 4010

Le immagini delle nitrocellulose sono state acquisite tramite IMAGEQUANT LAS 4010 (Ge Healthcare) in chemiluminescenza. L'intensità delle bande rilevate è proporzionale alla quantità di proteina contenuta nel campione e viene quantificata tramite il software "ImageQuantTL" e normalizzata sulle proteine totali.

Capitolo 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

Diagnosticare la CFS è molto difficile perché il medico ha a disposizione solo una serie di sintomi sui quali basarsi, la cui esposizione può risultare falsata dalla soggettività del paziente e, talvolta, anche dallo scetticismo del clinico stesso. Attualmente, la diagnosi si basa principalmente sull'esclusione di altre patologie. Visto il forte impatto che essa ha sulla vita dei malati e la grande confusione che crea, risulta di notevole importanza la ricerca di biomarcatori che permettano una diagnosi della malattia, in modo che sia paziente che medico possano aver chiaro il quadro generale e intervenire dunque nel migliore dei modi.

Nel 2013, uno studio condotto nei nostri laboratori [86], ha avuto lo scopo di analizzare e confrontare il contenuto proteico salivare di due gemelli monozigoti, discordanti per la CFS, mediante elettroforesi bidimensionale. Lo studio permise di evidenziare un coinvolgimento della risposta infiammatoria nella patologia.

Sulla base di questi risultati abbiamo voluto proseguire lo studio sulla stessa coppia di gemelli analizzando le proteine mitocondriali estratte da piastrine. Infatti si ipotizza un collegamento della CFS con un'alterata funzionalità mitocondriale. In particolare, studi sulla CFS suggeriscono irregolarità nel metabolismo energetico e stress ossidativo [89]. Questa è un'ipotesi probabile, poiché un'alterazione metabolica a livello mitocondriale potrebbe causare una riduzione di energia e spiegare la fatica peculiare.

La scelta delle piastrine è stata fatta perché, pur essendo cellule senza nucleo, le piastrine hanno mitocondri funzionalmente attivi, il cui coinvolgimento nella fisiologia cellulare ed in condizioni patologiche è stato dimostrato [90,91].

L'analisi del proteoma mitocondriale da piastrine è stata condotta utilizzando due tecniche complementari: 2-DE e la spettrometria di massa (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; LC-MS/MS). Per la spettrometria di massa ci siamo avvalsi della collaborazione col gruppo di ricerca del prof. Albert Sickmann di Dortmund (Leibniz Institute for Analytical Sciences; Dortmund, Germany).

Da questa analisi comparativa sono emerse numerose differenze nell'espressione di proteine mitocondriali che quindi supporterebbero il coinvolgimento nella CFS di un'alterata attività mitocondriale.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di validare questi risultati, ottenuti da una coppia di gemelli omozigoti, in una più vasta coorte di pazienti affetti da CFS; utilizzando soggetti sani come controllo.

A tal fine, sono state selezionate per la validazione proteine che soddisfacevano per importanza criteri statistici e biologici, utilizzando come campioni biologici d'analisi siero e saliva, ovvero fluidi biologici facilmente accessibili.

Le proteine mitocondriali prese in esame tramite western blot sono state: aconitasi, malato deidrogenasi (MDH) e subunità beta dell'ATP sintasi (ATP5B).

L'aconitasi è un enzima mitocondriale del ciclo di Krebs che catalizza l'isomerizzazione del citrato in isocitrato.

La malato deidrogenasi è un enzima, presente in diverse isoforme, che catalizza nel mitocondrio la reazione di ossidazione del malato in ossalacetato.

L'ATP sintasi è l'enzima responsabile della formazione dell'ATP cellulare, è localizzata sulla membrana interna dei mitocondri, dove è associata alla respirazione cellulare.

Abbiamo dapprima testato le proteine sia in siero che saliva. L'aconitasi e la malato deidrogenasi risultavano presenti in quantità misurabili solo nella saliva. L'ATP5B è invece stato possibile dosarla anche nel siero, oltre che nella saliva.

Siamo quindi passati a dosare le proteine nei campioni biologici raccolti da 41 soggetti affetti da CFS e 50 soggetti sani utilizzati come confronto.

Nello studio proteomico precedente tutte queste proteine risultavano aumentate significativamente nel gemello malato rispetto a quello sano.

Come possiamo vedere dalla figura 9A l'andamento di espressione è confermato nella saliva per l'aconitasi, ma l'aumento nei pazienti della proteina non risulta statisticamente significativo. Per quanto riguarda invece la malato deidrogenasi, non sembra esserci differenza nei livelli di espressione della proteina tra sani e malati (fig. 9B). Anche per i livelli dell'ATP5B nel siero non si è riscontrata differenza (fig. 9C). Invece l'aumento della proteina ATP5B è stato validato nella saliva, la proteina infatti aumenta nella CFS 3.8 volte con un p-value di 0.04 (fig. 9D).

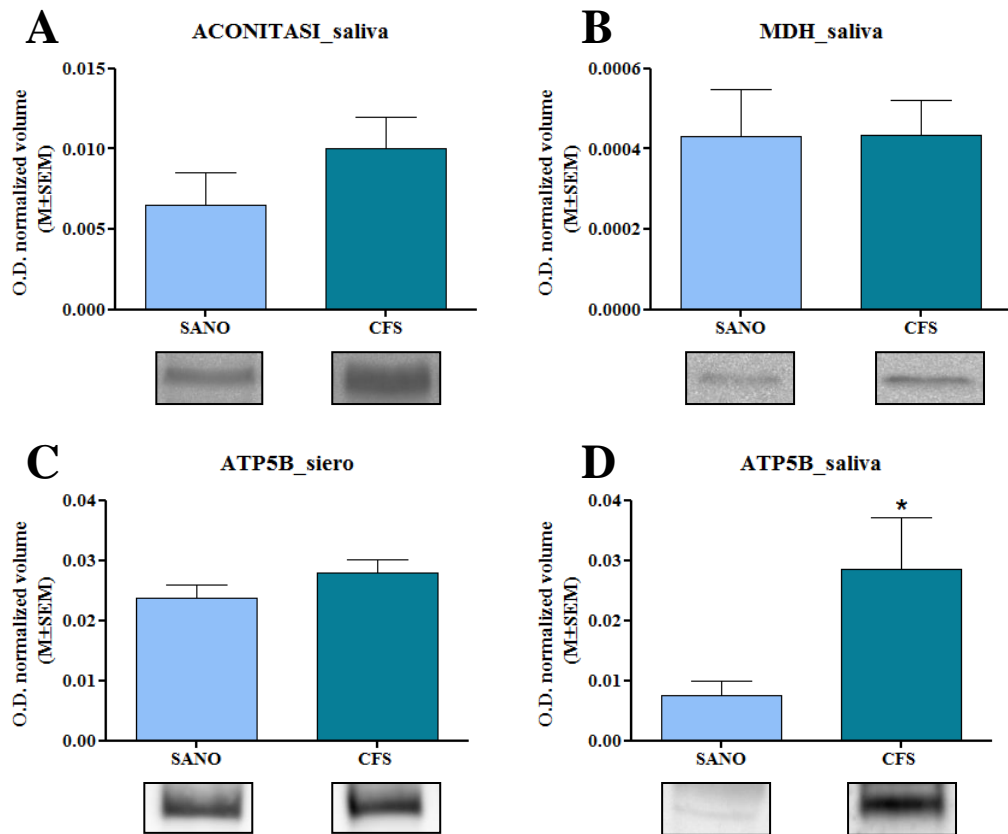


Figura 9 Analisi dei risultati ottenuti con western blot in siero e saliva nei pazienti affetti da CFS e nei soggetti sani. Ogni istogramma rappresenta il valore medio \pm SEM dell'intensità del segnale, normalizzato sull'intensità delle proteine totali visualizzate sulla membrana di nitrocellulosa dopo colorazione al rutenio. La significatività del confronto tra sano e CFS è stata valutata con il test statistico t-Student. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Sotto gli istogrammi le immagini ingrandite rappresentative delle immunoreazioni ottenute.

Dopo questa prima analisi globale dei livelli di espressione delle nostre proteine mitocondriali nei fluidi biologici presi in esame, abbiamo voluto considerare dei sottogruppi nella nostra coorte di pazienti con CFS. Infatti la popolazione affetta risulta essere estremamente eterogenea proprio per la natura stessa della patologia. Come è noto, la CFS non è ben definita nei suoi aspetti eziopatogenetici e clinici ed è difficile da diagnosticare. Pertanto la prognosi è effettuata per esclusione di altre forme patologiche compresi disturbi psichiatrici, dato che non esistono esami di laboratorio in grado di scoprirla. I parametri clinici valutati aiutano nella diagnosi il medico anche se non possono dare la certezza della diagnosi.

Nella tabella 5 vengono riportati i valori dei parametri clinici riscontrati nella coppia di gemelli dello studio originario. Infatti tutti i pazienti vengono sottoposti ad una visita reumatologica che comprende la valutazione dello stato clinico e la risposta ai questionari.

	CFS	Gemello sano
FIQ	61	4
VAS dolore	3	0
VAS fatica	8	1
VAS sonno	8	2
FACIT	26	5
SF-36		
<i>Attività fisica</i>	50	100
<i>Ruolo fisico</i>	0	100
<i>Dolore fisico</i>	84	100
<i>Stato salute</i>	10	67
<i>Vitalità</i>	35	60
<i>Attività sociali</i>	25	100
<i>Ruolo emotivo</i>	66	100
<i>Salute mentale</i>	64	80

Tabella 5 Punteggi ai questionari e scale nel paziente malato e nel suo gemello sano. Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ), Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue Scale (FACIT), visual analogue score scale (VAS), short form-36 (SF-36).

Abbiamo quindi deciso di rivedere l'analisi delle nostre proteine classificando i pazienti in base alle caratteristiche cliniche riscontrate a comune con il gemello malato. La correlazione principale è risultata essere con il valore della FIQ (Fibromyalgia Impact Questionnaire) che stima la severità della stanchezza e del dolore nel paziente.

Nella figura 10 sono rappresentati gli istogrammi con la media d'espressione delle nostre proteine dopo però la suddivisione dei pazienti CFS in due grandi sottogruppi, quelli con $FIQ \geq 61$ e quelli con $FIQ < 61$, sulla base dei valori registrati nel gemello malato.

Per quanto riguarda l'aconitasi possiamo vedere come ora la differenza tra sani e CFS (con $FIQ \geq 61$) risulti maggiore e statisticamente significativa ($p\text{-value} < 0.05$) (fig. 10A). Nel caso della malato deidrogenasi (fig. 10B), emerge ora una tendenza all'aumento che prima invece non c'era, mentre pazienti con FIQ bassa hanno livelli inferiori anche ai sani. L'ATP5B è quella con la differenza maggiore. Il livello della proteina nella saliva dei pazienti con $FIQ \geq 61$ risulta infatti aumentato ulteriormente, 5 volte, con un $p\text{-value} < 0.01$ (fig. 10D). Invece il siero non ha rivelato differenze significative (fig. 10C).

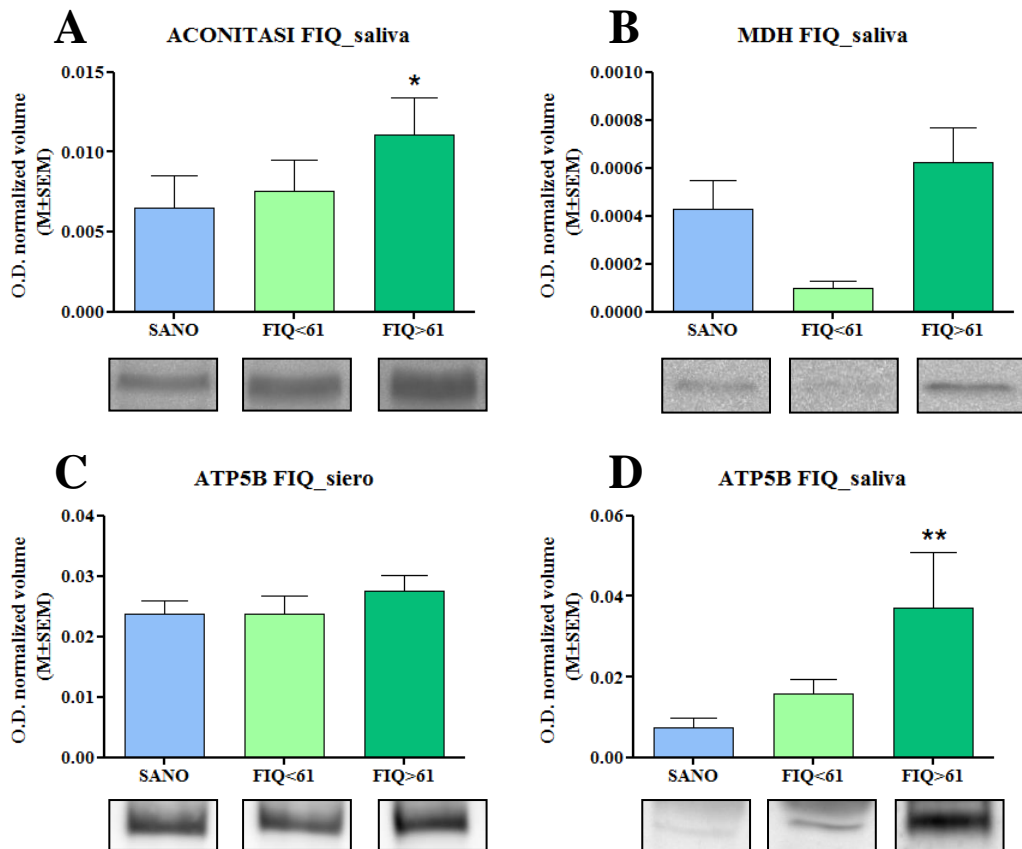


Figura 10 Analisi dei risultati ottenuti con western blot in siero e saliva nei pazienti affetti da CFS, suddivisi sulla base della FIQ, e nei soggetti sani. Ogni istogramma rappresenta il valore medio \pm SEM dell'intensità del segnale, normalizzato sull'intensità delle proteine totali visualizzate sulla membrana di nitrocellulosa dopo colorazione al rutenio. La significatività è stata valutata con il test statistico t-Student. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Sotto gli istogrammi le immagini ingrandite rappresentative delle immunoreazioni ottenute.

Questi risultati evidenziano quindi come aconitasi e ATP5B possano essere proteine utili per la classificazione dei pazienti affetti da CFS. Infatti, il loro aumento risulta correlare con la presenza della patologia e soprattutto con la gravità della stessa; visto che ad elevati valori di FIQ, uno dei parametri utilizzati per valutare l'entità della fatica nel paziente, corrispondono livelli superiori di queste proteine.

Aver potuto confermare la variazione di espressione in una più vasta popolazione di pazienti è promettente per il nostro studio futuro che è rivolto alla validazione di un numero maggiore di potenziali biomarcatori. Infatti queste tre proteine sono solo alcune delle proteine mitocondriali risultate differenzialmente espresse nell'analisi sui gemelli. Inoltre la saliva si è dimostrata essere un fluido utile per la ricerca di biomarcatori. Questo fluido presenta l'evidente vantaggio della non invasività di campionamento, inoltre è una matrice meno complessa rispetto al sangue e, di conseguenza, anche le procedure richieste per la manipolazione, il trattamento e

l'analisi dei campioni sono più semplici. Certamente non è da trascurare il lato economico, i costi sono ridotti, non si richiede personale specializzato e si ha una netta diminuzione di rischio biologico, poiché i pazienti possono eseguire l'esame in perfetta autonomia. In futuro, poter diagnosticare e stratificare i pazienti affetti da CFS con un esame del contenuto salivare costituisce sicuramente una prospettiva importante.

Bibliografia

[1] Christley Y, Duffy T, Martin CR. *A review of the definitional criteria for chronic fatigue syndrome*. J Eval Clin Pract 2012; 18:25-31.

[2] Turnbull N, Shaw EJ, Baker R, Dunsdon S, Costin N, Britton G, Kuntze S, Norman R. *Chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (or encephalopathy): diagnosis and management of CFS/ME in adults and children*. NICE clinical guideline 2007; 53:1-317.

[3] Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, Komaroff A. *The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study*. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. Ann Intern Med 1994; 121: 953-959.

[4] Laboratorio di Immunogenetica, Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia.

[5] Wessely S. *Old wine in new bottles: neurasthenia and 'ME'*. Psychol Med 1990; 20: 35-53.

[6] Holmes GP, Kaplan JE, Gantz NM, et al. *Chronic fatigue syndrome: a working case definition*. Ann Intern Med 1988; 108: 378-79.

[7] Sharpe MC, Archard LC, Banatvala JE, et al. *A report-chronic fatigue syndrome: guidelines for research*. J R Soc Med 1991; 84: 118-21.

[8] Lloyd AR, Hickie I, Boughton CR, Spencer O, Wakefield D. *Prevalence of chronic fatigue syndrome in an Australian population*. Med J Aust 1990; 153: 522-28.

[9] Dinos S, Khoshaba B, Ashby D, White PD, Nazroo J, Wessely S, Bhui KS. *A systematic review of chronic fatigue, its syndromes and ethnicity: prevalence, severity, co-morbidity and coping*. Int J Epidemiol 2009; 38: 1554-1570.

- [10] Reyes M, Nisenbaum R, Hoaglin DC, et al. *Prevalence and incidence of chronic fatigue syndrome in Wichita, Kansas*. Arch Intern Med 2003; 163: 1530-36.
- [11] Jason LA, Richman JA, Rademaker AW, et al. *A community-based study of chronic fatigue syndrome*. Arch Intern Med 1999; 159: 2129-37.
- [12] Carlo-Stella N, Lorusso L, Candura S, Cuccia M, et al. *La sindrome da stanchezza cronica*. Recenti progressi in medicina 2004; 95, 11.
- [13] Bazelmans E, Vercoulen JH, Galama JM, Van Weel C, Van der Meer JW, Bleijenberg G. *Prevalence of chronic fatigue syndrome and primary fibromyalgia syndrome in The Netherlands*. Ned Tijdschr Geneesk 1997; 141: 1520-23.
- [14] Wessely S, Chalder T, Hirsch S, Wallace P, Wright D. *The prevalence and morbidity of chronic fatigue and chronic fatigue syndrome: a prospective primary care study*. Am J Public Health. 1997; 87: 1449-55.
- [15] Cairns R, Hotopf M. *A systematic review describing the prognosis of chronic fatigue syndrome*. Occup Med 2005; 55: 20-31.
- [16] Swanink CMA, Van der Meer JWM, Vercoulen JHHM, et al. *Epstein-Barr virus (EBV) and the chronic fatigue syndrome: normal virus load in blood and normal immunologic reactivity in the EBV regression assay*. Clin Infect Dis 1995; 20: 1390-92.
- [17] Schluederberg A, Straus SE, Peterson P, et al. *Chronic fatigue syndrome research: definition and medical outcome assessment*. Ann Intern Med 1992; 117: 325-31.
- [18] Salit IE. *Precipitating factors for the chronic fatigue syndrome*. J Psychiatr Res 1997; 31: 59-65.
- [19] Straus SE, Tosato G, Armstrong G, Lawley T, Preble OT, Henle W, Davey R, Pearson G, Epstein J, Brus I. *Persisting illness and fatigue in adults with evidence of Epstein-Barr virus infections*. Ann Intern Med 1985;107:7-16.

- [20] Manu P, Matthews DA, Lane TJ, Tennen H, Hesselbrock V, Mendola R, Affleck G. *The mental health of patients with a chief complaint of chronic fatigue: a prospective evaluation and follow-up*. Arch Intern Med 1988; 148: 2213-7.
- [21] Buchwald D, Pascualy R, Bombardier C, Kith P. *Sleep disorders in patients with chronic fatigue*. Clin Infect Dis 1994; 18(Suppl 1): S68–72.
- [22] Demitrack MA, Dale JK, Straus SE, Laue L, Listwak SJ, Kruesi MJ, Chrousos GP, Gold PW. *Evidence for impaired activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with chronic fatigue syndrome*. J Clin Endocrinol Metab 1991;73: 1224-34.
- [23] Landay AL, Jessop C, Lennette ET, Levy JA. *Chronic fatigue syndrome: clinical condition associated with immune activation*. Lancet 1991; 338: 707-12.
- [24] Bou-Holaigah I, Rowe PC, Kan J, Calkins H. *The relationship between neurally mediated hypotension and the chronic fatigue syndrome*. JAMA 1995; 274: 961-7.
- [25] Cleare AJ. *The neuroendocrinology of chronic fatigue syndrome*. Endocr Rev 2003; 24: 236-52.
- [26] Skowera A, Stewart E, Davis ET, Cleare AJ, Unwin C, Hull L, et al. *Antinuclear autoantibodies (ANA) in Gulf War-related illness and chronic fatigue syndrome (CFS) patients*. Clin Exp Immunol 2002; 129: 354-8.
- [27] Reyes M, Gary HE Jr, Dobbins JG, Randall B, Steele L, Fukuda K, et al. *Surveillance for chronic fatigue syndrome – four U.S. cities, September 1989 through August 1993*. MMWR CDC Surveill Summ 1997; 46: 1-13.
- [28] Nancy AL, Shoenfeld Y. *Chronic fatigue syndrome with autoantibodies– the result of an augmented adjuvant effect of hepatitis-B vaccine and silicone implant*. Autoimmun Rev 2008; 8: 52-55.

- [29] Rosenblum H, Shoenfeld Y, Amital H. *The common immunogenic etiology of chronic fatigue syndrome: from infections to vaccines via adjuvants to the ASIA syndrome*. *Infect Dis Clin North Am* 2011; 25: 851-863.
- [30] Zuckerman AJ. *Safety of hepatitis B vaccines*. *Travel Med Infect Dis* 2004; 2: 81-84.
- [31] Prinsen H, de Vries IJ, Torensma R, Pots JM, Mulder SF, van Herpen CM, Elving LD, Bleijenberg G, Stelma FF, van Laarhoven HW. *Humoral and cellular immune responses after influenza vaccination in patients with chronic fatigue syndrome*. *BMC Immunol* 2012; 13: 71.
- [32] Gow JW, Hagan S, Herzyk P, Cannon C, Behan PO, Chaudhuri A. *A gene signature for post-infectious chronic fatigue syndrome*. *BMC Med Genomics* 2009; 2: 38.
- [33] Powell R, Ren J, Lewith G, Barclay W, Holgate S, Almond J. *Identification of novel expressed sequences, up-regulated in the leucocytes of chronic fatigue syndrome patients*. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1450-1456.
- [34] Patarca R. *Cytokines and chronic fatigue syndrome*. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 933: 185-200.
- [35] Skowera A, Stewart E, Davis ET, Cleare AJ, Unwin C, Hull L, et al. *Antinuclear autoantibodies (ANA) in Gulf War-related illness and chronic fatigue syndrome (CFS) patients*. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 354-8.
- [36] Klonoff DC. *Chronic fatigue syndrome*. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 812-23.
- [37] Myhill S, B.N., McLaren-Howard J. *Chronic fatigue syndrome and mitochondrial dysfunction*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2009; 2(1): 1-16.
- [38] Pieczenik SR, N.J. *Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease*. *Experimental and Molecular Pathology* 2007; 83(1): 84-92.

- [39] Lane RJM, B.M., Taylor DJ, Kemp GJ, Lodi R. *Heterogeneity in chronic fatigue syndrome: Evidence from magnetic resonance spectroscopy of muscle*. Neuromuscular Disorders, 1998; 8: 204-209.
- [40] Barnes PRJ, T.D., Kemp GJ, Radda GK. *Skeletal muscle bioenergetics in the chronic fatigue syndrome*. Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry Res, 1993; 56: 679-683.
- [41] W, B. *Treating Chronic Fatigue states as a disease of the regulation of energy metabolism*. Medical Hypotheses. 2008; 71: 481-488.
- [42] Chinnery PF, T.D. *Mitochondrial medicine*. QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians 1997; 90: 657-667.
- [43] Fulle S, M.P., Fano G, Vecchiet I, Vecchini A, Racciotti D, Cherubini A, Pizzigallo E, Vecchiet L, Senin U, Beal MF. *Specific oxidative alterations in vastus lateralis muscle of patients with the diagnosis of chronic fatigue syndrome*. Free Radical Biology and Medicine 2000; 29: 1252-1259.
- [44] Chaudhuri A, B.P. *In vivo magnetic resonance spectroscopy in chronic fatigue syndrome*. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2004; 71: 181-183.
- [45] Jammes Y, S.J., Mambrini O, Bregeon F, Delliaux S. *Chronic fatigue syndrome: assessment of increased oxidative stress and altered muscle excitability in response to incremental exercise*. Journal of Internal Medicine 2005; 257: 299-310.
- [46] Kennedy G, S.V., McLaren M, Hill A, Underwood C, Belch JFF. *Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms*. Free Radical Biology and Medicine 2005; 39: 584-589.
- [47] Slavica Tomic, S.B., Daniela Maric, Aleksandra Novakov Mikic. *Lipid and protein oxidation in female patients with chronic fatigue syndrome*. 2012; 8(5): 886-891.

- [48] Hickie I, Kirk K, Martin N. *Unique genetic and environmental determinants of prolonged fatigue: a twin study*. Psychol Med 1999; 29: 259-68.
- [49] Buchwald D, Herrel R, Ashton S, Belcourt M, Schmaling K, Sullivan P, Neale M, Goldberg J. *A twin study of chronic fatigue*. Psychosomatic Med 2001; 63: 936-943.
- [50] Afari N, Buchwald D. *Chronic fatigue syndrome: a review*. Am J Psychiatry 2003; 160: 221-36.
- [51] Hotopf M, Wessely S. *Stress in the workplace: unfinished business*. J Psychosom Res 1997; 43: 1-6.
- [52] Sharpe M. *Medically unexplained symptoms and syndromes*. Clin Med 2002; 2: 501-504.
- [53] Surawy C, Hackmann A, Hawton K, et al. *Chronic fatigue syndrome: a cognitive approach*. Behav Res Ther 1995; 33: 535-44.
- [54] White PD. *What causes chronic fatigue syndrome?* BMJ 2004; 329: 928-29.
- [55] Hoogveld S, Prins J, de Jong L, et al. *Persoonlijkheidskenmerken en het chronisch vermoeidheidssyndroom: een literatuuroverzicht* (Personality characteristics and the chronic fatigue syndrome: a review of the literature). Gedragstherapie 2001; 34: 275-305.
- [56] De Becker P, McGregor N, de Meirleir K. *Possible triggers and mode of onset of chronic fatigue syndrome*. J Chronic Fatigue Syndr 2002; 10: 3-18.
- [57] Lloyd AR. *Postinfective fatigue*. In: Jason LA, Fennell PA, Taylor RR, eds. *Handbook of chronic fatigue syndrome*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons 2003; 108-23.
- [58] Theorell T, Blomkvist V, Lindh G, Evengard B. *Critical life events, infections, and symptoms during the year preceding chronic fatigue syndrome (CFS): an*

examination of CFS patients and subjects with a nonspecific life crisis. Psychosom Med 1999; 61:304-10.

[59] Vercoulen JHMM, Swanink CMA, Galama JMD, et al. *The persistence of fatigue in chronic fatigue syndrome and multiple sclerosis: the development of a model.* J Psychosom Res 1998; 45: 507-17.

[60] Joyce J, Hotopf M, Wessely S. *The prognosis of chronic fatigue and chronic fatigue syndrome: a systematic review.* QJM 1997; 90: 223-33.

[61] Heijmans JWM. *Coping and adaptive outcome in chronic fatigue syndrome: importance of illness cognitions.* J Psychosom Res 1998; 45: 39-51.

[62] Moss-Morris R, Petrie KJ, Weinman J. *Functioning in chronic fatigue syndrome: do illness perceptions play a regulatory role?* Br J Health Psychol 1996; 1: 15-25.

[63] Schmaling KB, Smith WR, Buchwald DS. *Significant other responses are associated with fatigue and functional status among patients with chronic fatigue syndrome.* Psychosom Med 2000; 62: 444-50.

[64] Prins JB, Bos L, Servaes P, et al. *Social support and the persistence of complaints in chronic fatigue syndrome.* Psychother Psychosom 2004; 73: 174-82.

[65] Stanley I, Salmon P, Peters S. *Doctors and social epidemics: the problem of persistent unexplained physical symptoms, including chronic fatigue.* Br J Gen Pract 2002; 52: 355-56.

[66] Carruthers BM, van de Sande MI, De Meirleir KL, Klimas NG, Broderick G, Mitchell T, Staines D, Powles AC, Speight N, Vallings R, Bateman L, Baumgarten-Austrheim B, Bell DS, Carlo-Stella N, Chia J, Darragh A, Jo D, Lewis D, Light AR, Marshall-Gradisbik S, Mena I, Mikovits JA, Miwa K, Murovska M, Pall ML, Stevens S. *Myalgic encephalomyelitis: International Consensus Criteria.* J Intern Med 2011; 270: 327-338.

[67] Hannon KL, Peters S, Fisher L, Riste L, Wearden A, Lovell K, Turner P, Leech Y, Chew-Graham C. *Developing resources to support the diagnosis and management of Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalitis (CFS/ME) in primary care. A qualitative study.* BMC Fam Pract 2012; 13: 93.

[68] Clarke JN, James S. *The radicalized self: the impact on the self of the contested nature of the diagnosis of chronic fatigue syndrome.* Soc Sci Med 2003; 57: 1387-95.

[69] Prins JB, Bleijenberg G, Klein Rouweler E, van Weel C, van der Meer JWM. *Doctor-patient relationship in primary care of chronic fatigue syndrome: perspectives of the doctor and the patient.* J Chronic Fatigue Syndr 2000; 7: 3-15.

[70] Wearden AJ, Morriss RK, Mullis R, et al. *Randomised, double-blind, placebo-controlled treatment trial of fluoxetine and graded exercise for chronic fatigue syndrome.* Br J Psychiatry 1998; 172: 485-90.

[71] Capuron L, Gummick JF, Musselman DL, et al. *Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions.* Neuropsychopharmacology 2002; 26: 643-650.

[72] Prins JB, Elving L, Koning H, Bleijenberg G, van der Meer JWM. *Diagnosing chronic fatigue syndrome: comparison of a protocol and computerised questionnaires.* Neth J Med 2003; 61: 29-35.

[73] Prins JB, van der Meer JWM, Bleijenberg G. *Chronic fatigue Syndrome.* Lancet 2006; 367: 346-55.

[74] Alraek T, Lee MS, Choi T, Cao H, Liu J. *Complementary and alternative medicine for patients with chronic fatigue syndrome: a systematic review.* BMC Complementary and Alternative Medicine 2011; 11:87.

[75] <http://www.mitocon.it/?p=22>.

[76] Wallace, D.C. *Mitochondrial diseases in man and mouse.* Science 1999; 238 (5407): 1482-1488.

- [77] David L. Nelson, Michael M. Cox, *I Principi di Biochimica di Lehninger*, 3° ed., Bologna, Zanichelli, febbraio 2002.
- [78] Murphy, M.P. *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *Biocem* 2009; J.417(1-13).
- [79] Behan WMH, More IAR and Behan PO. *Mitochondrial abnormalities in the postviral fatigue syndrome*. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991; 83:61-65.
- [80] Byrne E, Trounce I and Dennett X. *Chronic relapsing myalgia clinical, histological and biochemical studies*. *Aust NZJ med* 1985; 15:305-308.
- [81] Vecchiet L, Montanari G, Pizzigallo E, Iezzi S, de Bigontina P, Dragani L, Vecchiet J and Giamberardino MA. *Sensory characterization of somatic parietal tissues in humans with chronic fatigue syndrome*. *Neurosci Lett* 1996; 208: 117-120.
- [82] Zhang C, Baumer A, Mackay IR, Linnane AW and Nagley P. *Unusual pattern of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of an adult human with chronic fatigue syndrome*. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 751-754.
- [83] Godovac-Zimmermann J, Soskic V, Poznanovic S, Brianza F. *Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors*. *Electrophoresis* 1999; 20 (4 -5): 952-96.
- [84] T. Rabilloud, C. Lelong *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial*. *Journal of Proteomics* 2011; 74: 1829-1841.
- [85] Schutzer SE, A.T., Liu T, Schepmoes AA, Clauss TR, Adkins JN, Camp DG, Holland BK, Bergquist J, Coyle PK, Smith RD, Fallon BA, Natelson BH. *Distinct Cerebrospinal Fluid Proteomes Differentiate Post-Treatment Lyme Disease from Chronic Fatigue Syndrome*. *PLoS One*, 2011; 6(2): 17287.

- [86] Ciregia F, Giusti L, Da Valle Y, Donadio E, Consensi A, Giacomelli C, Sernissi F, Scarpellini P, Maggi F, Lucacchini A, Bazzichi L. *A multidisciplinary approach to study a couple of monozygotic twins discordant for the chronic fatigue syndrome: a focus on potential salivary biomarkers.* J Transl Med, 2013; 11: 243.
- [87] Zhang A, S.H., Wang P, Wang X. *Salivary proteomics in biomedical research.* Clin Chim Acta, 2013; 415: p. 261-265.
- [88] H.Towbin, T.Staehelin, J.Gordon. *Electrophoretic transfer of proteins from polyscrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 1979; 76 (9): 4350-4354.
- [89] Armstrong CW, McGregor NR, Butt HL, Gooley PR. *Metabolism in chronic fatigue syndrome.* Adv Clin Chem. 2014; 66: 121-72.
- [90] Garcia-Souza LF, Oliveira MF. *Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology.* Int J Biochem Cell Biol. 2014; 50: 156-60.
- [91] Zharikov S, Shiva S. *Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease.* Biochem Soc Trans. 2013; 41(1): 118-23.

Ringraziamenti

Ed eccoci qua, ai doverosi ringraziamenti
che farò con sincerità e senza tanti complimenti.

Devo dire che nella vita sono molto fortunata,
perché di tanta gente buona mi sono circondata;
ma per primi vengono quelli che non ho scelto da sola,
quelli che mi accompagnavano ogni mattina a scuola,
che mi hanno cresciuto trasmettendomi i loro valori
e che mi aspettano finché non torno quando esco fuori.

Grazie mamma per la pazienza che mi hai saputo insegnare,
nonostante la tua timidezza e il fatto che non sai urlare.

Grazie papi, a te quello riesce davvero più che bene,
ma mi hai passato lo stesso l'onestà che ti scorre nelle vene.

Senza di voi oggi non sarei quella che sono
e voi due siete per me il più grande dono.

Poi c'è il mio Mithrandir, che per me è una guida (forse TV)
ma da un fratello non potrei desiderare niente di più.

Sempre a litigarci il titolo di pecora nera
ma forse nessuno lo è, o almeno si spera.

Per il sostegno e l'orgoglio un grazie anche alle mie zie,
persone delle quali sarei fiera di seguire le scie.

Così ora comincia una lista infinita,
quella degli amici che mi sono scelta per la vita.

Non sono riuscita a selezionarne una piccola quota,
perché per me sono davvero tutti degni di nota.

Una pietra, una base, una certezza, più di una sorella,
ti ammiro per la tua intelligenza di favella.

C'è qualcosa di grande tra di noi, la gente non lo può sapere mica,
cosa si prova ad avere un'altra parte di me come amica.

Grazie Marti, capocomico della mia esistenza,
sei la mia colonna indiscussa, non saprei come vivere senza.

Un grazie a chi mi carica di più al mondo,
a chi mi sa tirare su in un secondo,
perché stiliamo liste e programmi a non finire,

grazie Marti, sei un abbraccio che si fa sentire.

aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

A Sara grazie per la tua fratina storta,
ti chiamo perché sai sempre come ci si comporta
e anche se non azzechi neanche un'ortografia
non potrei mai rinunciare alla tua compagnia.

Vale davvero il tuo ciuffo sarebbe un bel presente,
ma a me basta vederti per ringraziarti sinceramente.

Un'amica storica, che si perde tante cose,
ma che non è mai sbagliata, come un mazzo di rose.

Grazie Lavi, tra noi per scambi e metà sei sempre disposta,
grazie perché ci sei stata e ci sarai, anche quando sbagli risposta.

Dai vecchi BAT siamo passate agli SBATTI in milanese,
ma grazie Gin per esser rimasta un punto nel mio paese.

A Jerry grazie per essere un tornado della natura,
mai stanca, mai zitta, anche con il pollo in cottura.

Perché eri presente al "buonanotte rucola" grazie Elisina,
per essere una forza, mai con la piagnina.

Ali, mia sorpresa, grazie per il tuo prezioso gusto
e perché sai sempre qual è il mood giusto.

Fede l'anno scorso hai ucciso ammodo con il botto
grazie mille perché non dimenticherò mai il pugno sul cruscotto.

A France, grazie gioia, perché sei un amico ritrovato
e per me ora è ancora meglio del passato.

Un grandissimo grazie va anche alla Compagnia de' Sonati,
per le risate, le battute, le prove e i tanti gelati.

Ma tra loro ce n'è uno che stavo quasi per sposare
per gli scherzi, i consigli e bigol, Walter ti voglio ringraziare.

In tutti questi anni passati da studente
sicuramente ho incontrato una gran varietà di gente
ma mai davvero mi sarei aspettata
quanto io ora a voi sia realmente attaccata.

A Ele, la prima con cui ha sinaptato il mio assone,
grazie per gli incoraggiamenti reciproci e le borse di pitone.

A Coc, mia viaggiatrice che le indicazioni ascolti,

grazie per le miscellanee e gli enigmi, mai aperti e mai risolti.

Incontri improvvisi e una penombra non banale,
grazie Lau, migliori anche la mia cultura musicale.

Grazie anche a Marghe per la passione che ci accomuna
e tutti quei cuori vaganti, speriamo portino fortuna.

Per ultima Chia perché qui siamo insieme, un sogno che si avvera,
grazie per i selfie sottobanco, i troppi ciao e l'amicizia sincera.

Non tutti sanno che in corriera seguivo altri corsi in realtà,
grazie Ale e Nicco, amici friendzonati della mia seconda facoltà.

Ma io ho anche una seconda famiglia che mi ha sempre divertito,
grazie Dona, Giuliano e Elena, per avermi spesso nutrito.

Voglio ringraziare anche tutto il Grillo pizzeria,
chi c'è e mi sostiene ma anche chi è andato via.

A chi mi ha mostrato, col sorriso, come sarà il mio lavoro,
grazie a tutta la "mia" farmacia, quello che so fare, lo devo a loro.

Grazie a tutti perché le vostre risate e il vostro orgoglio
non hanno riempito solo questo foglio,
ma il mio cuore adesso sprizza gioia sincera
ed è questa la cosa di cui vado fiera.

Naturalmente, anche se in ringraziamenti erano pieni di brio,
il grazie e il merito più grande è tutto mio!