

Implicación de la mitocondria en la fatiga crónica

V. POCA-DIAS¹, I. OJANGUREN SABÁN², C. PEREIRA DOS SANTOS³, E. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO⁴, A. ARIZA FERNÁNDEZ² Y F. GARCÍA-FRUCTUOSO¹

RESUMEN

Introducción: La implicación de la mitocondria en las enfermedades humanas es uno de los campos más desarrollados en la medicina en los últimos años. La disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial puede manifestarse con cuadros muy heterogéneos. La fatiga anormal y la intolerancia al ejercicio son síntomas comunes en las enfermedades mitocondriales, el síndrome de fatiga crónica (SFC) y la fatiga crónica idiopática.

Objetivo: evaluar si existe un subgrupo de enfermos con fatiga crónica idiopática que presenten una disfunción mitocondrial.

Material y métodos: se seleccionaron 15 pacientes con fatiga crónica idiopática, sin SFC de más de tres años de evolución. Se recopilaron antecedentes personales y maternos de posible afectación mitocondrial y se realizaron una prueba de esfuerzo, con determinación del valor METS (equivalentes metabólicos estimados), y una biopsia muscular a cielo abierto. La muestra se analizaba mediante microscopía óptica, electrónica y evaluación de la función mitocondrial (cinco complejos enzimáticos y actividad oxidativa).

ABSTRACT

Introduction: the implication of mitochondria in human illnesses has been one of the most developed fields in medicine in recent years. Malfunction of the mitochondrial respiratory chain is apparent with a very wide range of very symptoms. Abnormal tiredness and intolerance to exercise are common symptoms in Mitochondrial Disorders, Chronic Fatigue Syndrome (CFS) and Idiopathic Chronic Fatigue.

Objective: to evaluate whether there is a subgroup of patients with idiopathic chronic fatigue showing signs of mitochondrial malfunction.

Material and methods: 15 patients with Idiopathic Chronic Fatigue were selected, i.e. non-CFS, developed over three years ago. Personal and maternal records regarding possible mitochondrial impairment were collected and an exercise stress test (establishing the METS value) and an open muscle biopsy were performed. The sample was analyzed by means of an optical, electronic microscope and assessment of the mitochondrial function (5 enzymatic complexes and oxidative activity).

¹Servicio de Reumatología
Clínica CIMA
Barcelona

²Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Badalona, Barcelona

³Centro de Investigaçao de Recursos Naturais
Universidade dos Açores
Açores, Portugal

⁴Laboratorio Dr. Echevarne
Clínica CIMA
Barcelona

Dirección para correspondencia:

Violant Poca-Dias
Paseo Manuel Girona, 33
08034 Barcelona
E-mail: violant.poca@cimaclinic.com

Resultados: se observó incremento del número de mitocondrias en el 60% de los pacientes. La alteración de la función mitocondrial en mitocondria y homogenado fue cuantificada en el 60% y el 40% de los pacientes, respectivamente. La principal correlación fue la presencia en el 33% de los pacientes de una mayor alteración de la función mitocondrial, miopatía pleocolonial, cefaleas en sus madres y un déficit auditivo en los pacientes.

Conclusión: el 33% de pacientes con fatiga crónica idiopática presentan alteraciones en la actividad mitocondrial que se correlacionan con rasgos fenotípicos, personales y maternos.

Palabras clave: Fatiga crónica. Miopatía mitocondrial. Intolerancia al ejercicio.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el estudio de las enfermedades crónicas que cursan con fatiga anormal y dolor generalizado, como el síndrome de fatiga crónica (SFC) y la fibromialgia (FM), es un importante desafío en nuestra sociedad no sólo por su elevada prevalencia, sino también por el alto impacto social-laboral que comportan¹.

La fatiga crónica (de más de seis meses de evolución) es un síntoma frecuente, de fisiopatogenia aún poco conocida, que se asocia a múltiples enfermedades y situaciones clínicas, lo cual obliga a un minucioso proceso de diagnóstico diferencial.

El algoritmo diagnóstico de la fatiga crónica conduce, por exclusión, al planteamiento del SFC o de la fatiga crónica idiopática; el primero debe cumplir los criterios diagnósticos de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de 1994², y se considera el segundo diagnóstico ante el incumplimiento de los mismos^{2,3}.

En los últimos años, la medicina ha avanzado en el conocimiento del papel que desempeña la mitocondria en la salud, las enfermedades y el envejecimiento⁴. Gracias al desarrollo de los estudios histoquímicos, microscópicos, bioquímicos y genéticos han aumentado los diagnósticos de cuadros clínicos debidos a defectos en la función de la cadena respiratoria mitocondrial⁵.

La variabilidad de alteraciones en el metabolismo oxidativo mitocondrial condiciona cuadros muy he-

Results: an increase in the number of mitochondria was observed in 60% of patients. The alteration of the mitochondrial function in mitochondria and homogenate was quantified at 60% and 40% of patients, respectively. The main correlation was the presence in 33% of patients of a greater alteration of the mitochondrial function, mitochondrial pleomorphism, cephalalgia in their mothers and hearing loss in the patients.

Conclusion: 33% of patients with idiopathic chronic fatigue show changes in mitochondrial activity which correlate to phenotypical, personal and maternal characteristics. (DOLOR 2008;23:XX)

Corresponding author: Violant Poca-Dias, violant.poca@cimaclinic.com

Key words: Chronic fatigue. Mitochondrial myopathy. Exercise intolerance.

terogéneos. La disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial puede manifestarse con cualquier síntoma o conjunto de síntomas relacionados con la afectación de cualquier sistema, órgano o tejido, y son especialmente típicos la talla baja, el déficit de audición, la clínica neurológica, la debilidad muscular e intolerancia al ejercicio, los calambres o las mioclonias, la ataxia cerebelosa, la ptosis y la oftalmoplejía externa, entre otras. Además, una posible herencia materna podría sospecharse en ocasiones por la presencia de signos maternos como fatiga anormal, talla baja, trastornos auditivos y migrañas⁶.

El músculo es el mejor tejido para obtener la confirmación diagnóstica de una enfermedad mitocondrial por su accesibilidad y su elevada actividad enzimática oxidativa. A través de la biopsia, podemos evaluar la morfología de las fibras musculares con la microscopía óptica (evaluando esencialmente la presencia de fibras *ragged red*) y su ultraestructura con la microscopía electrónica. En la actualidad, gracias al desarrollo de técnicas bioquímicas, podemos evaluar la función mitocondrial (complejos enzimáticos numerados del I al V y actividad oxidativa)⁷.

Dado que la intolerancia al ejercicio es un síntoma común y relevante entre las enfermedades mitocondriales (EM)⁸, el SFC⁹ y la fatiga crónica idiopática³, en este estudio evaluamos si existe un subgrupo de enfermos que pudiesen justificar su fatiga anormal idiopática –manifestada esencialmente como una intolerancia al ejercicio– por una alteración de la función mitocondrial, como sugieren algunas publicaciones previas¹⁰⁻¹².

Tabla 1. Características de los enfermos

| | N | Media | Mediana | Desviación estándar | Mínimo | Máximo |
|-------------|----|--------|---------|---------------------|--------|--------|
| Edad | 15 | 49,33 | 51 | 12,419 | 29 | 74 |
| Talla | 15 | 161,27 | 158 | 7,285 | 154 | 175 |
| Peso | 15 | 67,07 | 66 | 11,022 | 52 | 90 |
| METS | 15 | 5,37 | 5,3 | 1,965 | 1 | 9,7 |
| Talla Madre | 15 | 157,40 | 158 | 5,654 | 145 | 168 |

La detección de una posible disfunción mitocondrial en enfermos con fatiga idiopática y su correlación con rasgos fenotípicos, personales y maternos constituyen el objetivo de este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio, que suscribe la Declaración de Helsinki (World Medical Association) y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de CIMA, se seleccionaron, entre enero y julio de 2006, 15 pacientes (14 mujeres y un varón, de entre 29 y 63 años, $m = 48,60 \pm 11,1$), diagnosticados de fatiga crónica idiopática, sin SFC y con un seguimiento de más de tres años en nuestro Servicio de Reumatología. Todos ellos prestaron su consentimiento informado por escrito.

Los enfermos siguieron un reconocido protocolo de estudio de fatiga¹³, y se verificó que la actividad premórbida de todos era compatible con la normalidad. Todas las exploraciones complementarias recomendadas eran normales, incluyendo enzimas musculares, hormonas tiroideas, serologías virales y detección de autoanticuerpos, y los marcadores inflamatorios de fase aguda eran negativos. En la exploración física no destacaban signos que fuesen sugestivos de otras patologías que pudiesen interferir en el diagnóstico.

También se recopilaron datos que se consideraron de interés para documentar una posible afectación mitocondrial, como la talla, el peso, la presencia de trastornos auditivos, la intolerancia al alcohol y antecedentes maternos de talla baja, cefaleas frecuentes, fatiga anormal y presencia de déficit auditivo¹⁴.

Posteriormente se sometían a una prueba de esfuerzo, bajo protocolo de Bruce, para evaluar la capacidad de esfuerzo del enfermo, que se cuantificaba mediante valor METS, según las recomendaciones de la *American Medical Association*¹⁵.

Finalmente, se realizaba una biopsia a cielo abierto del músculo deltoides, cuyos fragmentos, conservados

de acuerdo con los métodos habituales, incluyendo la congelación de fragmentos en nitrógeno líquido¹⁴, se remitían al Servicio de Patología del Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Barcelona) para la realización de microscopía óptica y electrónica, y al Mitochondrial Research Group, de la Universidad de Rochester (Nueva York), para la determinación de la integridad de la cadena respiratoria mitocondrial.

El análisis con microscopía óptica consistió en la evaluación, a través de la tinción con tricromo de Gomori, de la presencia o no de fibras *ragged red*, marcador principal de proliferación mitocondrial y característica patogénica de las enfermedades mitocondriales humanas¹⁶. La microscopía electrónica evaluó diversos cambios estructurales en las mitocondrias, como las alteraciones en el número, tamaño y ubicación de las mismas, crecimiento de las crestas, así como la aparición de acúmulos de glucógeno, lipofucsina, lípidos y otros.

El estudio de la función mitocondrial cuantificó la actividad enzimática específica de los cinco complejos enzimáticos de la cadena respiratoria y la citrato sintetasa, tanto en mitocondria (ESA-M) como en homogenado (ESA-H), así como también la actividad oxidativa (OA) de los citados complejos, según métodos descritos previamente¹⁷.

RESULTADOS

Las características de talla de los enfermos ($m = 161,3 \pm 7,3$), sus madres ($m = 157,4 \pm 5,6$) y otras variables fenotípicas, así como el valor en METS ($5,37 \pm 1,9$) se resumen en la tabla 1.

En el interrogatorio, el 80% de los pacientes refería una significativa intolerancia al alcohol y el 60% presentaba déficit auditivo.

Entre las características de las madres de los pacientes destaca que el 53,3% presentaba cefaleas frecuentes, el 30,8% fatiga anormal y el 28,6% deficiencia auditiva.

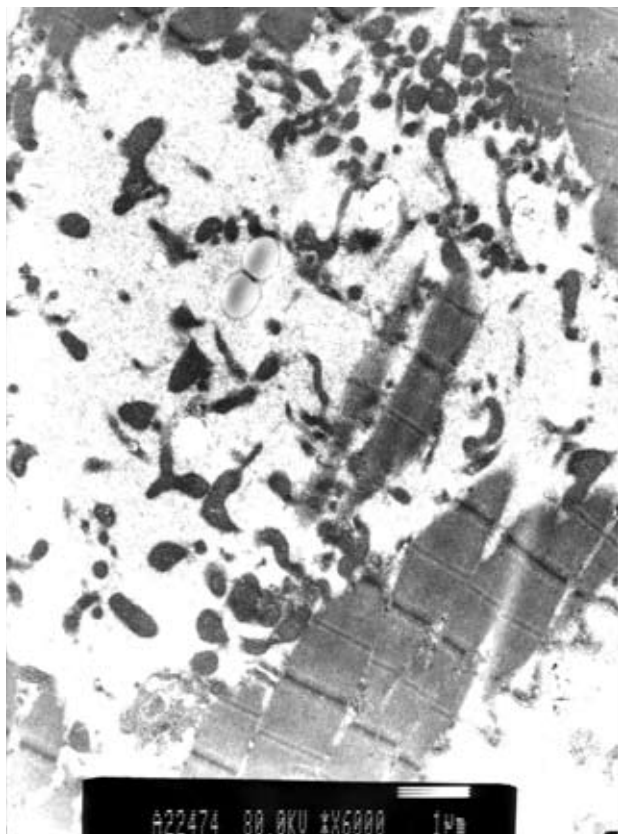


Figura 1. Algunas fibras musculares muestran acúmulos de mitocondrias de localización predominantemente subsarcolemal, y más raramente intermiofibrilar. Se observa cierta variación en el tamaño y forma de las mismas, aunque no se evidencian inclusiones intramitocondriales ni alteraciones significativas en la morfología de las crestas.

Resultados del análisis microscópico

En la microscopia óptica ningún paciente presentó fibras *ragged red* con la tinción con tricromo de Gomori. En la microscopia electrónica se observó un incremento del número de mitocondrias en el

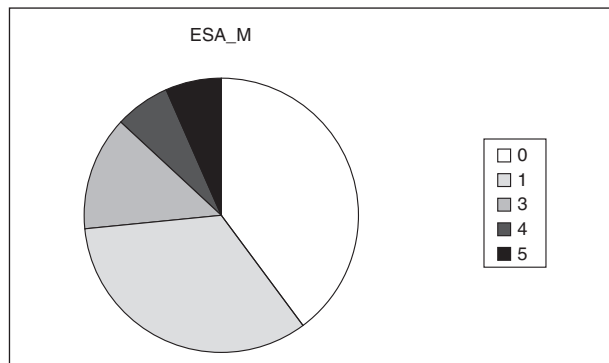


Figura 2. Actividad enzimática en mitocondria (por complejos).

60% de los pacientes, de predominio subsarcolemal y más raramente intermiofibrilar. Se observa cierta variación en el tamaño y la forma de las mismas, aunque no se evidencian inclusiones intramitocondriales ni alteraciones significativas en la morfología de las crestas (Fig. 1). Los acúmulos de glucógeno y lipofucsina se mostraron elevados en el 87 y el 53% de los pacientes, respectivamente. Se observaron acúmulos de lípidos en el 20% de los casos.

Resultados de la actividad mitocondrial

La desviación de la actividad enzimática y oxidativa en relación con los niveles de referencia del laboratorio se ha considerado anormal.

Se ha objetivado que en mitocondria, sólo el 40% de los pacientes presentaba una actividad enzimática normal en las seis enzimas evaluadas (Fig. 2). En cambio, en homogenado, el 60% de los pacientes presentaba las seis enzimas funcionales (Fig. 3). La actividad oxidativa era normal en el 60% de los pacientes para los cinco complejos mitocondriales (Fig. 4).

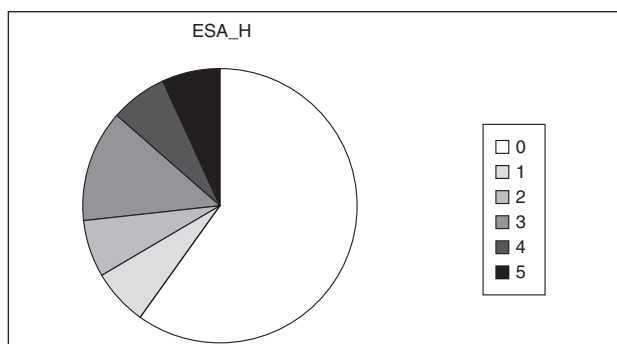


Figura 3. Activitat enzimática en homogenado (por complejos).

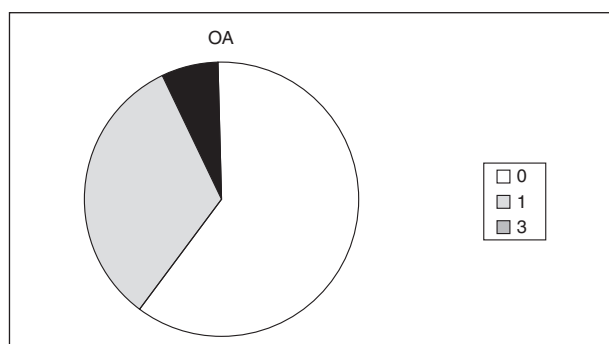


Figura 4. Actividad oxidativa.

Tabla 2. Correlaciones de Kendall

| Kendall's tau_b | n_mitocon | glucogeno | lipofuc | lipidos | ESA_M | ESA_H | OA | edad | talla | peso | METS | Madre_Talla | int_alco | trans_audi | madre_cefalfreq | madre_fatiganor | madre_defaudi |
|-----------------|-----------|-----------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|-------------|----------|------------|-----------------|-----------------|---------------|
| n_mitocon | 1 | 0,525* | 0,065 | 0,512* | 0,457* | 0,319 | 0,214 | 0,195 | -0,174 | -0,13 | -0,119 | -0,188 | 0,146 | -0,015 | 0 | -0,153 | -0,056 |
| glucogeno | 0,525* | 1 | -0,369 | 0,06 | 0,134 | 0,058 | 0 | -0,118 | -0,13 | -0,107 | 0,177 | -0,097 | 0,378 | -0,293 | -0,24 | -0,577* | -0,35 |
| lipofuc | 0,065 | -0,369 | 1 | 0,435* | 0,067 | -0,029 | -0,077 | 0,409* | -0,27 | 0,153 | -0,444* | 0,168 | -0,237 | 0,323 | -0,285 | 0,295 | 0,378 |
| lipidos | 0,512* | 0,06 | 0,435* | 1 | 0,113 | 0 | -0,087 | 0,312 | -0,231 | 0,017 | -0,181 | 0,152 | -0,167 | -0,272 | -0,2 | 0,178 | 0,055 |
| ESA_M | 0,457* | 0,134 | 0,067 | 0,113 | 1 | 0,737† | 0,703† | -0,055 | -0,067 | -0,245 | -0,111 | -0,08 | -0,038 | 0,138 | 0,286 | -0,045 | -0,059 |
| ESA_H | 0,319 | 0,058 | -0,029 | 0,067 | 0,737† | 1 | 0,805† | -0,131 | 0,168 | -0,360* | 0,072 | -0,282 | -0,303 | 0,264 | 0,227 | -0,143 | -0,108 |
| OA | 0,214 | 0 | -0,077 | 0,087 | 0,703† | 0,805† | 1 | -0,282 | 0,271 | -0,335 | 0,064 | -0,302 | -0,217 | 0,39 | 0,244 | -0,201 | -0,158 |
| edad | 0,195 | -0,118 | 0,409* | 0,312 | -0,055 | -0,131 | -0,282 | 1 | -0,498† | 0,059 | -0,398* | -0,04 | -0,263 | 0,094 | -0,145 | 0,115 | 0,352 |
| talla | -0,174 | -0,13 | -0,27 | -0,231 | -0,067 | 0,168 | 0,271 | -0,498† | 1 | -0,147 | 0,390* | -0,01 | 0,264 | 0,013 | 0,146 | -0,153 | -0,236 |
| peso | -0,13 | -0,107 | 0,153 | 0,017 | -0,245 | -0,360* | -0,335 | 0,059 | -0,147 | 1 | -0,117 | 0,15 | 0,05 | -0,094 | -0,291 | 0,191 | 0,184 |
| METS | -0,119 | 0,177 | -0,444* | -0,181 | -0,111 | 0,072 | 0,064 | -0,398* | 0,390* | -0,117 | 1 | -0,239 | 0,066 | -0,429* | 0,053 | -0,361 | -0,436* |
| Madre_Talla | -0,188 | -0,097 | 0,168 | 0,152 | -0,08 | -0,282 | -0,302 | -0,04 | -0,01 | 0,15 | -0,239 | 1 | 0,32 | -0,234 | 0,135 | 0,396 | 0,397* |
| int_alco | 0,146 | 0,378 | -0,237 | -0,167 | -0,038 | -0,303 | -0,217 | -0,263 | 0,264 | 0,05 | 0,066 | 0,32 | 1 | -0,068 | 0,2 | -0,03 | -0,055 |
| trans_audi | -0,015 | -0,293 | 0,323 | -0,272 | 0,138 | 0,264 | 0,39 | 0,094 | 0,013 | -0,094 | -0,429* | -0,234 | -0,068 | 1 | 0,055 | 0,083 | 0,141 |
| madre_cefalfreq | 0 | -0,24 | -0,285 | -0,2 | 0,286 | 0,227 | 0,244 | -0,145 | 0,146 | -0,291 | 0,053 | 0,135 | 0,2 | 0,055 | 1 | 0,617* | 0,316 |
| madre_fatiganor | -0,153 | -0,577* | 0,295 | 0,178 | -0,045 | -0,143 | -0,201 | 0,115 | -0,153 | 0,191 | -0,361 | 0,396 | -0,03 | 0,083 | 0,617* | 1 | 0,822† |
| madre_defaudi | -0,056 | -0,35 | 0,378 | 0,055 | -0,059 | -0,108 | -0,158 | 0,352 | -0,236 | 0,184 | -0,436* | 0,397* | -0,055 | 0,141 | 0,316 | 0,822† | 1 |

*La correlación es significativa al nivel 0,05.

†La correlación es significativa al nivel 0,01.

Correlación entre las variables y análisis de correspondencias múltiples

La correlación entre las variables se realizó con el coeficiente de correlación de Kendall¹⁸. En la tabla 2 se presentan los valores para cada par de variables y se señalan aquellas correlaciones que resultaron significativas. Aunque el número de individuos en el estudio es bajo, se han detectado varias correlaciones significativas entre las variables estudiadas, así como valores de correlación destacables aunque no tan significativos.

Destacamos las correlaciones obtenidas entre la presencia de un número incrementado de mitocondrias, el acúmulo de glucógeno entre las fibras, el acúmulo de lípidos y la alteración de la actividad enzimática mitocondrial. Asimismo, la presencia de acúmulos de lipofucsina presenta una asociación significativa con el acúmulo de lípidos, la edad de los pacientes y los valores en METS. Otro resultado muy interesante es la asociación significativa entre las variables maternas, en concreto entre el trastorno auditivo, la presencia de cefalea y la fatiga anormal.

Para evaluar en conjunto todas las variables, se ha realizado un análisis de correspondencias múltiples y su resultado se resume en la figura 5. Se observa que los mayores valores de alteración mitocondrial (expresada por las variables ESA-M, ESA-H y OA) están asociados a la presencia de un número de mitocondrias más elevado de lo normal en la microscopia electrónica, a la presencia de cefalea en la madre de los pacientes y a un trastorno auditivo en éstos. Este perfil fue objetivado en 5 de los 15 enfermos a quienes se efectuó la biopsia (33,3%), y uno de ellos presentaba, además, acúmulos de lipofucsina y su madre tenía déficit auditivo y fatiga anormal.

DISCUSIÓN

La implicación de las mitocondrias en la patología humana está cada vez más consolidada⁴. Además de las citopatías mitocondriales definidas, el papel del funcionalismo mitocondrial en enfermedades tales como el Parkinson, la epilepsia, la migraña, la diabetes, las cardiomiopatías, la esclerosis múltiple y la artrosis, entre otras, se considera significativo y ha sido puesto de manifiesto en los últimos 10 años, a raíz del avance de las técnicas para su evaluación^{4,19-22}. A la vez, la afectación de la mitocondria por la exposición a sustancias químicas parece no solamente estar bien establecida, sino ser útil en la evaluación de la seguridad de las mismas²³.

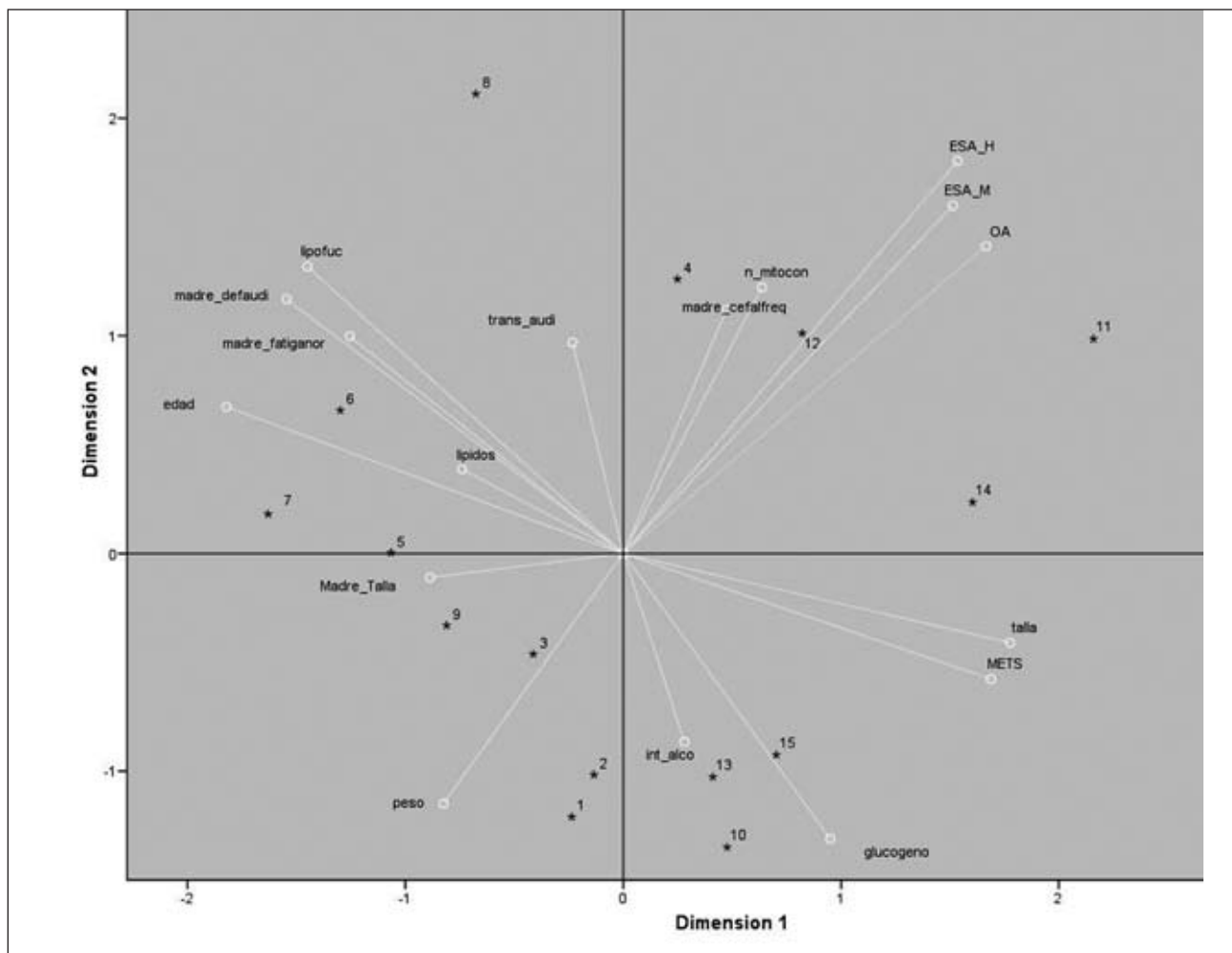


Figura 5. El punto terminal para cada variable representa los valores más altos o corresponde a «sí»; en el caso de ESA-M, ESA-H y AO, representa mayor número de complejos mitocondriales con mal funcionamiento.

Sabemos que existen diferencias clínicas entre la fatiga crónica idiopática y el SFC²⁴, pero actualmente el diagnóstico de SFC no se acompaña de medidas objetivas para evaluar la fatiga física o cognitiva, y esto dificulta una homogeneidad en la aplicación de los criterios diagnósticos²⁵.

Algunas características clínicas frecuentes en el contexto de la fatiga crónica anormal son también habituales en las definiciones de las EM. Así, por ejemplo, la intolerancia al esfuerzo, la lenta recuperación tras el mismo, la intolerancia a dosis mínimas de alcohol, la presencia (incluso como criterio diagnóstico menor) de cefalea, el dolor muscular o la intolerancia ortostática²⁶. A pesar de esta evidente similitud sintomática, son escasos y antiguos los estudios realizados que conocemos para evaluar la implicación de la mitocondria en los casos de fatiga crónica, aunque éstos demuestran una clara relación^{10,12}.

Nuestro trabajo pone de manifiesto que un significativo número de enfermos con fatiga crónica idiopática presenta alteraciones objetivas en la actividad mitocondrial, aunque las diferencias en el número de complejos alterados y sus valores dificulta establecer un patrón basado en la misma. La negatividad de la microscopia óptica en la búsqueda de fibras *ragged red* no descarta en absoluto una afectación mitocondrial. La microscopia electrónica parece ser de interés como complemento de las determinaciones enzimáticas.

El interés por parte de grupos investigadores en definir subgrupos en el contexto de la fatiga crónica²⁷, entendida en un concepto amplio, contrasta con el de otros por plantear la hipótesis de una etiología común²⁸ entre las enfermedades y los síndromes hoy diferenciados, como la fibromialgia, el SFC, la sensibilidad química múltiple, la fatiga crónica idiopática, etc.²⁹. Nuestros hallazgos pueden contribuir a

la clarificación del debate al respecto, en el sentido de que, efectivamente, parece existir un subgrupo de enfermos con afectación mitocondrial.

El trabajo sugiere que los pacientes que refieren un cuadro persistente de fatiga anormal de causa desconocida y que presentan características fenotípicas personales de trastorno auditivo, y maternas de cefalea y trastorno auditivo, podrían ser buenos candidatos para realizar una biopsia muscular con estudio de la función mitocondrial. La prueba de esfuerzo no parece ser un buen criterio de selección para la indicación de una biopsia muscular, aunque para la mayoría de los pacientes se corresponde bien con su fatiga subjetiva.

Los cinco pacientes que han presentado alteraciones en la biopsia podrían ser candidatos para realizar un estudio genético del ADN mitocondrial (ADNmt) –ya que presentan alteraciones de la función mitocondrial combinada con alteraciones maternas, lo cual sugiere un patrón de transmisión vertical o materno– en el intento de localizar algún marcador no invasivo que pudiera distinguir los pacientes con afectación mitocondrial.

El conocimiento de la afectación de la función mitocondrial, tras la exposición a sustancias químicas frecuentes en el entorno laboral³⁰, sugiere, junto con la frecuencia de las anomalías detectadas, la conveniencia de realizar, de forma sistemática, en la anamnesis de los enfermos con fatiga anormal y buena actividad premórbida, una historia de exposición a sustancias químicas.

Como limitaciones del estudio citaremos la falta de un grupo control sano y el escaso número de muestras. Ambos condicionantes responden, en esta fase, a una limitación ética condicionada por la escasa bibliografía y la falta de una modificación sustancial de la actitud terapéutica y del pronóstico, ante una modificación del diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Juan Vilches, jefe del Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Fe (Valencia), por su contribución a la idea original del trabajo; al profesor Shey-Shing Sheu, de la Universidad de Rochester, por su minucioso estudio de la función mitocondrial, y a la doctora Francisca López, del Departamento de Trabajo de la Generalitat de Cataluña, por sus aportaciones bibliográficas.

Conflicto de intereses: ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Assefi NP, Coy TV, Uslan D, Smith WR, Buchwald D. Financial, occupational and personal consequences of disability in patients with chronic fatigue syndrome and fibromyalgia compared to other fatiguing conditions. *J Rheumatol.* 2003;30:804-8.
2. 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;121:953-9.
3. Arpino C, Carrieri MP, Valesini G, et al. Idiopathic chronic fatigue and chronic fatigue syndrome: a comparison of two case-definitions. *Ann Ist Super Sanita.* 1999;35:435-41.
4. Pieczenik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol.* 2007.
5. DiMauro S, Gurgel-Giannetti J. The expanding phenotype of mitochondrial myopathy. *Curr Opin Neurol.* 2005;18:538-42.
6. DiMauro S. Mitochondrial myopathies. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18:636-41.
7. Sarnat HB, Marín-García J. Pathology of mitochondrial encephalomyopathies. *Can J Neurol Sci.* 2005;32:152-66.
8. Taivassalo T, Jensen TD, Kennaway N, DiMauro S, Vissing J, Haller RG. The spectrum of exercise tolerance in mitochondrial myopathies: a study of 40 patients. *Brain* 2003;126:413-23.
9. Snell CR, Vanness JM, Strayer DR, Stevens SR. Exercise capacity and immune function in male and female patients with chronic fatigue syndrome (CFS). *In Vivo* 2005;19:387-90.
10. Behan WM, More IA, Behan PO. Mitochondrial abnormalities in the postviral fatigue syndrome. *Acta Neuropathol (Berl).* 1991;83:61-5.
11. Preedy VR, Smith DG, Salisbury JR, Peters TJ. Biochemical and muscle studies in patients with acute onset post-viral fatigue syndrome. *J Clin Pathol* 1993;46:722-6.
12. Vecchiet L, Montanari G, Pizzigallo E, et al. Sensory characterization of somatic parietal tissues in humans with chronic fatigue syndrome. *Neurosci Lett.* 1996;208:117-20.
13. Chronic fatigue syndrome. Clinical practice guidelines. *Med J Aust.* 2002;176Suppl:S23-S56.
14. Cohen BH, Gold DR. Mitochondrial cytopathy in adults: what we know so far. *Cleve Clin J Med.* 2001;68:625-42.
15. Guides to the Evaluation of Permanent Impairment. 5th ed. Chicago, Illinois: American Medical Association, 2002. p. 101.
16. Bourgeois JM, Tarnopolsky MA. Pathology of skeletal muscle in mitochondrial disorders. *Mitochondrion.* 2004;4:441-52.
17. Wiedemann FR, Vielhaber S, Schroder R, Elger CE, Kunz WS. Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Anal Biochem.* 2000;279:55-60.
18. Kendall MG, Gobbons JD. Rank correlation methods. 5th ed. 1990.
19. Kalman B, Laitinen K, Komoly S. The involvement of mitochondria in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007.
20. Weijers RN, Bekedam DJ. Relationship between gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes: evidence of mitochondrial dysfunction. *Clin Chem.* 2007;53:377-83.
21. Blanco FJ, López-Armada MJ, Maneiro E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion.* 2004;4:715-28.
22. Beal MF. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;991:120-31.
23. Da Silva EM, Soares AM, Moreno AJ. The use of the mitochondrial transmembrane electric potential as an effective biosensor in ecotoxicological research. *Chemosphere.* 1998;36:2375-90.
24. Darbishire L, Ridsdale L, Seed PT. Distinguishing patients with chronic fatigue from those with chronic fatigue syndrome: a diagnostic study in UK primary care. *Br J Gen Pract.* 2003;53:441-5.
25. Stouten B. Identification of ambiguities in the 1994 chronic fatigue syndrome research case definition and recommendations for resolution. *BMC Health Serv Res.* 2005;5:37.
26. Carruthers BM, Jain AK, De Meirleir KL, et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: Clinical working case definition, diagnostic and treatment protocols. *J Chronic Fatigue Syndr.* 2003;11:7-115.
27. Jason LA, Corradi K, Torres-Harding S, Taylor RR, King C. Chronic fatigue syndrome: the need for subtypes. *Neuropsychol Rev.* 2005;15:29-58.
28. Pall ML. Common etiology of posttraumatic stress disorder, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and multiple chemical sensitivity via elevated nitric oxide/peroxynitrite. *Med Hypotheses* 2001;57:139-45.
29. Jason LA, Taylor RR, Kennedy CL. Chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and multiple chemical sensitivities in a community-based sample of persons with chronic fatigue syndrome-like symptoms. *Psychosom Med.* 2000;62:655-63.
30. Fernández-Solá J, Lluís PM, Nogué XS, Munné MP. [Chronic fatigue syndrome and multiple chemical hypersensitivity after insecticide exposure]. *Med Clin (Barc.).* 2005;124:451-3.