

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**"FEDERICO II"**



**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA**  
**DELL'ALIMENTAZIONE E DELLA**  
**NUTRIZIONE**  
**XXIII CICLO**

Differente effetto di diete iperlipidiche ricche in lardo o olio di  
pesce sull'insorgenza dell'obesità, steatosi epatica  
ed insulino-resistenza

*Coordinatore*

Ch.mo Prof.

FRANCO CONTALDO

*Docente Tutore*

Ch.ma Dott.ssa

Maria Pina Mollica

*Candidato*

Dott.

Marcello Gaita

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>Pagina 4</b>
Gli acidi grassi essenziali	6
Funzione degli acidi grassi essenziali	6
Fabbisogno e livelli di assunzione con la dieta	7
Gli acidi grassi omega-3	8
Effetti benefici degli omega-3	9
Acidi grassi omega-3 e malattie cardiovascolari	10
Acidi grassi omega-3 e infiammazione	11
Effetti negativi legati all'assunzione di omega-3	13
<b>LA STEATOSI EPATICA</b>	<b>14</b>
NAFLD e sindrome metabolica	14
Definizione, caratteristiche e cause della steatosi epatica	14
Mitocondri e loro funzione nella cellula	15
Efficienza e disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale	18
Mitocondri del muscolo scheletrico: subsarcolemmatici ed intermiofibrillari	21
Mitocondri e radicali liberi	22
Disfunzione mitocondriale e steatosi epatica	25
<b>LA RESISTENZA ALL'INSULINA</b>	<b>28</b>
Biosintesi, struttura e azioni dell'insulina	28
La via di trasduzione del segnale insulinico	30
La resistenza all'insulina	33
<b>INFIAMMAZIONE ED ER STRESS</b>	<b>36</b>
Obesità, infiammazione e insulino-resistenza	36
Il reticolo endoplasmatico	37
Il reticolo endoplasmatico liscio	37
Il reticolo endoplasmatico granuloso	38
Stress del reticolo endoplasmatico	39
I sensori dell'UPR: Ire1 $\alpha$ , ATF6 e PERK	39
Stress del reticolo endoplasmatico e insulino-resistenza	40
Altri mediatori di infiammazione: SOCS ed iNOS	42
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>43</b>
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>45</b>

<b>Disegno sperimentale</b>	45
<b>METODICHE UTILIZZATE A LIVELLO CORPOREO</b>	47
Misura della composizione corporea e del bilancio energetico	47
Determinazione del metabolismo corporeo	48
Misura del contenuto di acqua della carcassa	48
Misura del contenuto lipidico della carcassa	48
Misure del contenuto energetico della carcassa	49
Misure del contenuto proteico della carcassa	50
Determinazione dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi e ALT	50
Glicemia ed insulinemia dopo un carico orale di glucosio	50
Dosaggio del glucosio: principio e metodo utilizzati	50
Dosaggio ELISA dell'insulina, leptina, adiponectina e TNF-alfa	51
Analisi delle proteine mediante Western Blot	52
Determinazione del contenuto di trigliceridi epatico e muscolare	53
<b>ANALISI ISTOLOGICA</b>	53
Preparazione dei campioni	54
Preparazione del tessuto per la microscopia ottica	54
PAS (periodic acid Schiff), tecniche per rilevare il glicogeno	54
<b>ANALISI DEI PARAMETRI MITOCONDRIALI</b>	54
Preparazione dei mitocondri da fegato	54
Preparazione dei mitocondri da muscolo	55
Determinazione della massa proteica mitocondriale e dell'attività della citrato sintasi	56
Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati	57
Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati	58
Misura della conduttanza protonica basale	58
Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi	59
Determinazione dell'attività totale della Carnitina-palmitoil-transferasi	60
Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale	60
Analisi statistiche	61
<b>RISULTATI</b>	62
<b>DISCUSSIONE</b>	90
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	98

## INTRODUZIONE

I meccanismi coinvolti nella regolazione del peso e della composizione corporea sono complessi e poco conosciuti. Le spinte evolutive hanno, di certo, favorito la selezione di individui con una capacità di immagazzinare grassi nei periodi di maggiore disponibilità di cibo e con una elevata efficienza metabolica per meglio resistere ai periodi di ridotta disponibilità di nutrienti. D'altro canto è anche vero che un animale grasso ha minori possibilità di catturare le proprie prede e, quindi, è ovvio che le spinte evolutive abbiano favorito animali dotati di meccanismi capaci di regolare il proprio peso corporeo agendo non solo sull'assunzione di nutrienti, ma anche sulla spesa energetica. È chiaro che, in un organismo adulto, il mantenimento di un peso corporeo stabile e ideale risulta da un preciso bilancio tra l'assunzione di energia e la spesa energetica. Il bilancio energetico è proprio la risultante tra l'energia introdotta e l'energia spesa dall'organismo. Nel caso in cui l'introito energetico sia esattamente uguale alla spesa energetica, il soggetto è normofagico e il suo peso corporeo viene mantenuto costante. Questa situazione è quella ideale per l'organismo. Quando l'energia introdotta è inferiore a quella spesa, il soggetto si definisce ipofagico, l'organismo si trova in una situazione di bilancio energetico negativo e viene perso peso. Quando l'energia introdotta supera quella spesa, il soggetto si definisce iperfagico e l'organismo si trova in una situazione di bilancio energetico positivo. L'energia in eccesso viene depositata in piccola parte nelle riserve di glicogeno delle cellule, ma la maggior parte viene invece immagazzinata sotto forma di trigliceridi a livello del tessuto adiposo. L'energia introdotta deriva dall'assorbimento dei nutrienti assunti con l'alimentazione. Una parte di quest'energia viene persa dall'organismo sotto forma di scorie, la differenza tra quella introdotta e quella persa si definisce energia metabolizzabile di cui l'organismo dispone per le sue attività e che viene consumata nella spesa energetica giornaliera. Quest'ultima è generalmente suddivisa in tre componenti: metabolismo basale a riposo (BMR), costo energetico dell'attività fisica<sup>1</sup>, effetto termico del cibo (TEF). Il metabolismo Basale è l'energia utilizzata dall'organismo per le sue funzioni vitali a riposo e rappresenta la spesa energetica minima necessaria per mantenere l'organismo in vita. Alcuni autori sostengono che il valore del BMR per Kg di massa magra, sia geneticamente determinato ed in particolare che un valore basso sia un fattore predisponente allo sviluppo dell'obesità<sup>2</sup>. L'attività fisica è la termogenesi data dall'attività muscolare<sup>3</sup> che rappresenta il 20-25% dell'energia spesa dal corpo in un individuo adulto sedentario, ma può arrivare anche al 50% negli individui attivi. L'effetto termico del cibo, TEF, rappresenta l'aumento del BMR indotto dall'assunzione del cibo ed equivale approssimativamente al 10% della spesa energetica giornaliera<sup>4</sup>. Un bilancio energetico cronicamente positivo può portare a sovrappeso e conseguentemente ad obesità. L'obesità rappresenta la più frequente disfunzione nutrizionale nel mondo e, quindi, uno dei principali problemi di salute pubblica. Essa non è solo

un problema estetico, ma soprattutto un problema fisiopatologico, in quanto è correlata ad un quadro più ampio di patologie che costituiscono la cosiddetta *sindrome metabolica*, responsabile di un alto rischio di mortalità soprattutto nei paesi occidentali<sup>5</sup>. Essa è una condizione caratterizzata da un accumulo di grasso nel tessuto adiposo in quantità eccessiva rispetto alle necessità fisiologiche dell'organismo, in genere a causa di un'alimentazione, sia quantitativamente che qualitativamente scorretta e ad uno stile di vita sedentario. Tra le patologie ad essa associate ricordiamo la steatosi epatica e l'insulino-resistenza. La prima è uno stato patologico caratterizzato dall'accumulo di grasso in una sede ectopica quale è, appunto, il fegato. L'insulino-resistenza, invece, è una condizione che prelude al diabete e che si innesca quando quantità normali di insulina non riescono a trasportare il glucosio all'interno delle cellule<sup>6</sup>. Risulta, quindi, evidente l'importanza della prevenzione e/o dell'intervento precoce in modo da ridurre l'insorgenza dell'obesità o, quantomeno, far regredire la sua progressione e quella delle patologie ad essa associate. Questo suggerisce che i meccanismi che adattano l'assunzione di nutrienti a livello della spesa energetica, oppure i meccanismi coinvolti nel controllo della spesa energetica, siano molto efficienti. In questa tesi mi sono, appunto, occupato dello studio di alcuni meccanismi di dispersione dell'energia, che aumentano, quindi la spesa energetica e che vengono attivati quando l'animale introduce una dieta ad alto contenuto di grassi. In particolare ho valutato l'effetto di diete iperlipidiche ricche in lardo o in olio di pesce sull'insorgenza dell'obesità e di patologie ad essa correlate. Infatti, lo studio di componenti della dieta che possano agire contemporaneamente nel ridurre il grado di obesità, di insulino-resistenza e di steatosi epatica può aprire nuove strade nella prevenzione di tali patologie. Prima di addentrarmi nella problematica sperimentale credo sia doverosa una descrizione del contesto in cui si andrà ad operare.

## GLI ACIDI GRASSI ESSENZIALI

Gli acidi grassi sono i lipidi più semplici presenti in natura. Essi presentano un gruppo carbossilico ed una catena idro-carboniosa. Gli acidi grassi sono classificati come *saturi*, se privi di doppi legami, *monoinsaturi*, se presentano un solo doppio legame, *polinsaturi*, se ne presentano più di uno. Gli acidi grassi insaturi vengono indicati con la dizione “omega” o “n” seguita da un numero relativo alla posizione del primo doppio legame a partire dal metile terminale<sup>7</sup>. Attorno al termine "acidi grassi essenziali" (EFA, essential fatty acids) c'è molta confusione. Infatti, l'aggettivo “essenziali” può essere interpretato in due modi diversi:

- 1) in senso *esteso*, intendendoli essenziali per la vita del soggetto;
- 2) in senso *ristretto*, intendendo che si devono necessariamente assumere con l'alimentazione, perché il nostro corpo non è in grado di produrli<sup>7</sup>. Nell'ambito degli acidi grassi polinsaturi, l'*acido linoleico* (capostipite degli omega-6) e l'*acido alfa-linolenico* (capostipite degli omega-3), sono considerati acidi grassi essenziali in senso ristretto. Infatti, poiché il nostro corpo non è in grado di sintetizzarli, occorre introdurli con la dieta. A partire dalle due molecole lipidiche citate, l'organismo è in grado di produrre altri acidi grassi. I cibi ricchi di acido linoleico sono: olio di girasole, olio di mais, olio di soia e noci. L'acido alfa-linolenico, invece, si trova principalmente nei pesci e nei semi di lino<sup>7</sup>. Un insufficiente apporto di EFA nella dieta è alla base di molteplici condizioni patologiche che vanno sotto il nome di “Sindrome da carenza di EFA”, elencate nella tabella 1.

**Tabella 1**

<b><i>Manifestazioni cliniche in corso di Sindrome da carenza di acidi grassi essenziali:</i></b>
-aumento dell'incidenza di malattie cardiovascolari;
- aumento della suscettibilità alle infezioni;
- degenerazione grassa del fegato;
- atrofia delle ghiandole esocrine;
- diminuzione della fertilità;
- ridotta capacità di rimarginazione delle ferite;
- prurito, eritemi ed altre alterazioni cutanee;
- ritardo della crescita.

### **Funzione degli acidi grassi essenziali**

La funzione principale dei lipidi è quella di fornire energia ai vari processi metabolici che avvengono nell'organismo. Tale funzione risulta essere soltanto marginale per gli acidi grassi essenziali. Infatti, essi giocano un ruolo fondamentale in diversi tessuti ed entrano nella costituzione di tutte le membrane cellulari; inoltre possono dar luogo alla formazione di un gruppo

di sostanze, dette eicosanoidi, capaci di modulare numerose reazioni cellulari<sup>8</sup>. Gli eicosanoidi sono acidi grassi a 20 atomi di carbonio e a seconda delle funzioni che svolgono, sono classificati come “buoni” o “cattivi”. Gli “eicosanoidi cattivi” derivano dall’acido arachidonico (omega-6), gli “eicosanoidi buoni” derivano dall’acido eicosapentaenoico (omega-3)<sup>9</sup>. Le funzioni principali degli acidi grassi della serie omega-6 sono:

- ridurre la concentrazione di colesterolo totale nel sangue;
- ridurre, anche se con una bassa efficacia, i livelli plasmatici di trigliceridi.

Poiché sono precursori sia di eicosanoidi “buoni” che di eicosanoidi “cattivi”, gli acidi grassi omega-6, se presenti in eccesso rispetto agli omega-3, possono provocare l’aumento del rischio cardiovascolare mediante l’aumento delle reazioni infiammatorie, della pressione sanguigna, dell’aggregazione piastrinica.

Le funzioni principali degli acidi grassi della serie omega-3 sono:

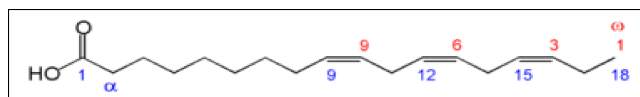
- ridurre con una bassa efficacia i livelli di colesterolo totale nel sangue;
- abbassare i livelli plasmatici di trigliceridi;
- aumentare leggermente la concentrazione di colesterolo HDL;
- produrre eicosanoidi "buoni" che diminuiscono l’aggregazione piastrinica, aumentando la fluidità ematica e riducendo in modo significativo il rischio di malattie coronariche.

### **Fabbisogno e livelli d’assunzione con la dieta**

Un acido grasso omega-3 non può essere trasformato in un acido grasso omega-6 e viceversa, anche se l’acido linoleico ed alfa-linolenico utilizzano lo stesso sistema enzimatico per dare origine ai derivati delle rispettive famiglie (omega-6 e omega-3). A causa di questa competizione, un’eccessiva assunzione di omega-6 interferisce con la formazione degli omega-3 e viceversa, per questo motivo è molto importante assumere gli acidi grassi essenziali nelle giuste proporzioni. Il rapporto ideale omega-6/omega-3 da assumere con la dieta è intorno al valore di 4-5:1. Dunque, il fabbisogno di acidi grassi della serie omega-6 è superiore a quello della serie omega-3, tuttavia questo rapporto risulta ancora più sbilanciato a favore degli omega-6 di quanto suggerito, poiché si tende a seguire una dieta sempre più povera di pesce e ricca di oli vegetali. Gli omega-6, pur esercitando numerose funzioni essenziali, possono diventare dannosi se introdotti in eccesso rispetto agli omega 3. Generalmente, gli acidi grassi essenziali sono maggiormente presenti nei pesci pescati rispetto a quelli d’allevamento; infatti, mentre questi ultimi sono spesso alimentati con mangimi ricchi di grassi saturi, i pesci selvatici si nutrono di fitoplancton (alghe ricche di acido eicosapentaenoico e docosaesaenoico, i due più importanti derivati dell’acido alfa-linolenico), accumulando più omega-3 nelle loro carni.

### Gli acidi grassi omega-3

Il precursore metabolico degli acidi grassi omega-3, di cui i principali sono l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA), è, come già detto, l'acido alfa-linolenico (ALA). Come mostrato in figura 1, la catena carboniosa dell'ALA contiene 18 atomi di carbonio e 3 doppi legami.



**Figura 1. Struttura chimica dell'acido alfa-linolenico**

L'ALA è contenuto a concentrazioni rilevanti nei vegetali a foglia verde, come gli spinaci, ma soprattutto nelle noci e negli oli di colza, di semi di lino e di soia. Le cellule dei mammiferi possiedono tutto il corredo enzimatico necessario per metabolizzare l'ALA e per convertirlo nei prodotti a più lunga catena e a più alto grado di insaturazione, anche se con efficienza variabile. L'EPA è un precursore di una classe di molecole (gli eicosanoidi della serie 3) coinvolte nei processi di flogosi o di crescita neoplastica. Se nell'organismo vi è a disposizione una sufficiente quantità di EPA, questo può essere parzialmente trasformato in DHA<sup>10</sup>. Il DHA si trova prevalentemente nella composizione lipidica della membrana cellulare; esso è fondamentale per la composizione dei lipidi del cervello e dei fosfolipidi delle membrane sinaptiche, implicate nella trasmissione dell'impulso nervoso<sup>11</sup>; infatti, la presenza di adeguate quantità di DHA nel latte materno è ritenuta fondamentale per uno sviluppo ottimale del cervello del bambino. Tutti gli acidi grassi essenziali sembrano privi di attività biologica "diretta" la quale viene, invece, acquisita in seguito a specifiche modificazioni biochimiche all'interno dell'organismo. La trasformazione degli acidi grassi avviene ad opera di due sistemi enzimatici: le *desaturasi*, enzimi che catalizzano l'introduzione di doppi legami in posizione specifica dell'acido grasso, ed *elongasi*, che catalizzano l'allungamento della catena dell'acido grasso, mediante l'aggiunta di atomi di carbonio. Il metabolismo degli acidi grassi omega-6 ed omega-3 segue vie totalmente distinte, in quanto un acido grasso omega-3 non può essere trasformato in un acido grasso omega-6 e viceversa. Tuttavia, gli acidi grassi di entrambi i tipi possono essere allungati e desaturati attraverso processi catalizzati dagli stessi enzimi. Pertanto, le due famiglie di acidi grassi polinsaturi competono per lo stesso sistema enzimatico. L'enzima  $\Delta 6$ -*desaturasi* è particolarmente importante perché influenza la velocità del processo di biosintesi dei PUFA. Numerose ed



eterogenee sostanze, quali: grassi saturi, alcool, adrenalina, glucocorticoidi e alcuni neuropeptidi, inibiscono la *Δ6-desaturasi* e possono contribuire ulteriormente a ridurre i livelli di EFA nei tessuti. Una ridotta funzionalità di questo enzima è stata anche osservata nei soggetti con diabete mellito e in soggetti sottoposti a radiazioni ionizzanti o infettati da virus oncogeni. Nei soggetti anziani e nei bambini, dato che la funzionalità degli enzimi della via biosintetica omega-3 è ridotta, può essere considerata di particolare importanza l'integrazione con EPA e DHA.

### **Effetti benefici degli omega-3**

L'interesse destato per gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) della serie omega-3 (o n-3), in particolare per "l'olio di pesce", risale ad alcune osservazioni riportate, circa 30 anni fa, negli studi epidemiologici pionieristici di *Dyerberg* e *Bang*, effettuati sugli Inuit (popolazione eschimese della Groenlandia). Da questi studi emergeva chiaramente una bassa incidenza di eventi coronarici negli eschimesi tipicamente esposti a una dieta ricca di pesce grasso dei mari freddi e, quindi, di PUFA omega-3, in particolare di acido docosaesaenoico (DHA) e acido eicosapentaenoico (EPA)<sup>12</sup>. Da allora, vari gruppi di ricerca si sono occupati del fenomeno, facendo emergere l'ipotesi che alti livelli di acidi grassi polinsaturi del tipo omega-3, contenuti in alcuni pesci quali il salmone, il pesce spada, le sardine, lo sgombro e l'acciuga, possano proteggere dall'insorgenza di eventi cardiovascolari (dislipidemie, ipercolesterolemie, infarto). Gli acidi grassi omega-3, inoltre, si concentrano a livello del tessuto cerebrale (il cervello di un uomo adulto contiene in media più di 20 g di DHA) e rivestono un'importante ruolo nel suo sviluppo e mantenimento. Simili funzioni sono rivestite anche a livello della retina e del tessuto nervoso<sup>13</sup>. Poiché gli omega-3 giocano un ruolo importante nelle funzioni visive e cognitive, diventa di particolare importanza assumerne in maniera adeguata in fase di gravidanza e allattamento. Nel caso in cui non sia possibile l'allattamento al seno, le società di nutrizione raccomandano di includere EPA e DHA nella formula del latte artificiale<sup>14</sup>. Gli acidi grassi omega-3 svolgono un ruolo importante anche nell'apparato riproduttivo, infatti la diminuzione di DHA negli spermatozoi può essere associata con l'infertilità<sup>15</sup>; in aggiunta, supplementazioni con DHA in donne in gravidanza sono correlate ad un maggiore peso e lunghezza del bambino al momento della nascita<sup>(16-17)</sup>. L'assunzione di omega-3 può anche avere un effetto antinvecchiamento, infatti, tali acidi grassi stimolano l'espressione dei geni del collagene e delle proteine delle fibre elastiche<sup>18</sup>, migliorando l'aspetto della pelle. Gli omega-3, inoltre, modulano la risposta infiammatoria, risultando di valido aiuto in numerose patologie (disturbi articolari, asma, sindrome del colon irritabile). Sebbene EPA e DHA agiscano in sinergia nell'ambito degli stessi meccanismi funzionali, i numerosi studi condotti a proposito hanno permesso di identificare un certo ambito di specificità terapeutica (tabella 2 e 3). In particolare, all'EPA viene attribuita la capacità di apportare benefici al sistema cardiovascolare

(azione anti-aterogena) e di migliorare la risposta antinfiammatoria. L'integrazione con DHA è importante in gravidanza, durante lo sviluppo del neonato e in fase di vecchiaia, per il mantenimento della funzionalità cerebrale e la prevenzione della degenerazione maculare senile a carico della retina<sup>19</sup>.

**Tabella 2**

<b>DHA: EFFETTO/AZIONE</b>
<b>Contrasta le dislipidemie</b> *Abbassa i trigliceridi *Aumenta le HDL
<b>Esercita un'azione anti-trombotica</b> *Diminuisce l'aggregazione piastrinica
<b>Esercita un effetto antiaritmico</b> *Stabilizza il ritmo cardiaco, riduce il rischio di re-infarto
<b>Esercita un'azione antinfiammatoria</b> *Grazie agli eicosanoidi, riduce gli effetti pro-infiammatori degli ormoni lipidici
<b>Promuove la fertilità maschile</b> *Aumenta la motilità degli spermatozoi

**Tabella 3**

<b>EPA: EFFETTO/AZIONE</b>
<b>Contrasta le dislipidemie</b> *Abbassa i trigliceridi *Aumenta le HDL
<b>Esercita un'azione anti-ipertensiva</b> *abbassa la pressione cardiaca
<b>Esercita un'azione antinfiammatoria</b> *Attacca le fasi iniziali dell'infiammazione (anti-chemiotassi)
<b>Facilita la normale crescita, sviluppo e funzionalità del SNC</b> *È incorporato all'interno delle membrane lipidiche del cervello e dei nervi

### **Acidi grassi omega-3 e malattie cardiovascolari**

L'importanza dei livelli di assunzione dei due principali omega-3, EPA e DHA, nel prevenire patologie cardiovascolari è ormai conosciuta dalle società di cardiologia americane ed europee, le quali raccomandano il consumo abituale di pesce (alimento ricco di omega-3) e l'assunzione di 1g di omega-3 al giorno (da farmaci o da integratori) per prevenire, in soggetti ad alto rischio di queste patologie, la morte improvvisa e il reinfarto. In base agli studi effettuati in vitro e in vivo, si è evidenziato che le azioni biologiche degli omega-3, sul sistema cardiovascolare, riguardano la diminuzione del processo di aterosclerosi, diminuzione della pressione arteriosa, effetto antiaritmico, ipocolesterolemizzante e ipotrigliceridemizzante<sup>20</sup>. L'effetto antiaritmico (il principale responsabile del minor rischio di morte improvvisa) si manifesta con livelli di

assunzione di omega-3 relativamente bassi nell'arco di alcune settimane; lo stesso vale per l'effetto antitrombotico, che però è meno significativo. La riduzione dei trigliceridi richiede invece dosi più elevate (1.2-2 g/die) per diversi mesi, così come la riduzione della pressione arteriosa. Ricerche sperimentali hanno evidenziato anche la capacità degli omega-3 di migliorare la funzionalità vascolare. Sicuramente, l'effetto metabolico più consistente degli acidi grassi omega-3 è quello sui trigliceridi plasmatici<sup>21</sup>. La riduzione dei trigliceridi è particolarmente importante nei pazienti diabetici, nei quali esiste un'alta frequenza di alterazioni del metabolismo dei trigliceridi<sup>22</sup>. La diminuzione dei trigliceridi plasmatici è dovuta principalmente ad una riduzione delle lipoproteine a più bassa densità (VLDL) ed è legata quasi esclusivamente ad una riduzione della sintesi epatica di queste lipoproteine<sup>23</sup>. Diversi studi, sia in vitro che su animali, hanno dimostrato che gli acidi grassi omega-3 sono dei ligandi naturali dei PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) e che, tramite questi recettori, influenzano l'espressione genica di enzimi importanti nella regolazione del metabolismo lipidico a livello epatico, con diminuzione di quelli deputati alla sintesi dei trigliceridi e un aumento di quelli deputati all'ossidazione dei grassi<sup>24</sup>. Per quanto riguarda il colesterolo, gli acidi grassi omega-3 causano un aumento di piccola entità (circa il 3%) delle lipoproteine HDL. Inoltre, sembra che il DHA avrebbe una maggiore capacità di indurre tale aumento rispetto all'EPA<sup>20</sup>. Infine, la maggioranza degli studi mostra che l'uso dell'olio di pesce, anche in dosi moderate, determina un aumento delle LDL, che si aggira intorno all'8-10%. L'aumento del colesterolo LDL, che si ha anche con altri farmaci ipotrigliceridemizzanti, non è chiaro: le VLDL, arricchite in acidi grassi omega-3, potrebbero avere una maggiore affinità per la *lipasi lipoproteica* ed essere convertiti più facilmente in LDL o potrebbe esserci un'azione diretta degli acidi grassi omega-3 sull'attività dei recettori per le LDL<sup>25</sup>. Tuttavia, l'azione ipotrigliceridemizzante è tale da compensare il modesto incremento delle LDL, probabilmente dovuto all'aumento dimensionale delle lipoproteine piuttosto che al loro numero, che si osserva nei pazienti supplementati con omega-3<sup>26</sup>. In conclusione, gli effetti degli acidi grassi omega-3 a lunga catena sui lipidi plasmatici possono essere così riassunti:

- riduzione consistente dei trigliceridi e delle VLDL, sia a digiuno che in fase post-prandiale;
- aumento di circa il 10% del colesterolo LDL;
- aumento di circa il 3% del colesterolo HDL<sup>26</sup>.

### **Acidi grassi omega-3 e infiammazione**

Gli acidi grassi omega-3 EPA e DHA così come l'acido arachidonico (AA) (omega-6), sono contenuti nella membrane fosfolipidiche dei linfociti ed in seguito ad un evento infiammatorio vengono trasformati in eicosanoidi<sup>8</sup>. In generale gli eicosanoidi prodotti a partire dagli acidi grassi

omega-3 sono biologicamente meno attivi rispetto, a quelli derivanti dagli acidi grassi della serie omega-6. L'EPA ed il DHA rilasciano i seguenti eicosanoidi: prostacilina PGI<sub>3</sub>, prostaglandina PGE<sub>3</sub>, trombossano A<sub>3</sub>, e leucotriene B<sub>5</sub>. L'AA invece produce differenti eicosanoidi ovvero la prostaglandina PGE<sub>2</sub> e la prostacilina PGI<sub>2</sub> che hanno azione vasodilatatore, il tromboxano A<sub>2</sub>, che agisce come vaso costrittore, aggregante piastrinico ed ha attività pro-infiammatoria, ed il leucotriene A<sub>4</sub>, che agisce come vaso costrittore, agente chemiotattico ed ha attività pro-infiammatoria. Gli eicosanoidi della serie 2 e 4, generati a partire dagli acidi grassi omega-6, conducono ad una consistente produzione di citochine, come: interleuchina 1 (IL-1) e fattore  $\alpha$  di necrosi tissutale (TNF- $\alpha$ ), messaggeri chimici responsabili dell'attivazione di vari stadi della risposta immunitaria. La produzione di differenti eicosanoidi a partire da acidi grassi omega-3 ed omega-6 passa attraverso l'attivazione di medesimi enzimi: ciclossigenasi (COX) e lipossigenasi (LOX). Gli omega-3 possono quindi competere per gli enzimi con gli omega-6. Un apporto adeguato di omega-3 si associa ad una maggiore incorporazione di questi ultimi nelle membrane biologiche rispetto a quelle degli omega-6 e ciò comporta una maggiore metabolizzazione dell'EPA rispetto all'AA da parte di COX. Un eccessivo consumo di omega-6 rispetto agli omega-3 rappresenta un danno per la salute dal momento che gli enzimi lavoreranno a favore degli omega-6 presenti in eccesso con conseguente danno alla salute. Quando, invece, grazie ad una dieta equilibrata, c'è sufficiente disponibilità di EPA e DHA a livello delle membrane cellulari, si verifica una minore produzione di citochine e conseguentemente, anche una risposta più bilanciata da parte delle altre cellule del sistema immunitario. Ne risulta una reazione infiammatoria più modulata. Oltre a limitare la presenza di sostanze che rivestono il ruolo di trasmettitori chimici, gli acidi grassi della serie omega-3 riducono un altro fattore importante nella limitazione dell'infiammazione, ovvero la tendenza delle cellule ad aderire le une con le altre. Alcuni studi in vitro hanno verificato gli effetti di vari acidi grassi omega-3 sull'espressione di molecole di adesione coinvolte nell'infiammazione. In maniera specifica, l'aggiunta di DHA a cellule endoteliali in coltura per un tempo sufficiente a consentire una sua incorporazione nei fosfolipidi di membrana, ha indotto un'inibizione degli eventi connessi con l'attivazione endoteliale. In particolare è stato osservato che il DHA inibisce l'espressione di molecole di adesione (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina) dopo stimolazione con IL-1 e TNF-alfa. Un ulteriore approfondimento degli studi ha permesso di evidenziare che il DHA è in grado di inibire l'attivazione del sistema di fattori di trascrizione NF-kB (fattore nucleare kB) preposto al controllo dell'espressione di molecole di adesione e molecole chemiotattiche. Per definire con maggiore dettaglio i possibili meccanismi mediante i quali gli acidi grassi omega-3 inibiscono l'attivazione endoteliale, e quindi interferiscono con l'aterogenesi, è stata valutata l'inibizione dell'attivazione di NF-kB indotta dal DHA parallelamente alla misurazione della produzione di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) all'interno

di cellule endoteliali in coltura. Il perossido d'idrogeno infatti, ed in misura minore le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che ne sono i precursori, hanno un ruolo importante nell'attivazione di NF-kB, ma l'incorporazione di DHA nelle membrane ne riduce la sintesi.

Gli eicosanoidi della serie 2 e 4, generati a partire dagli omega-6, producono invece un'elevata quantità di citochine (IL-1 e TNF-alfa), che legandosi a recettori su cellule endoteliali ne inducono l'attivazione con conseguente produzione di molecole di adesione e molecole chemiotattiche per i leucociti favorendo dunque il processo infiammatorio.

### **Effetti negativi legati all'assunzione di omega-3**

Come già detto in precedenza, le principali fonti di EPA e DHA sono pesce ed olio di pesce, l'assunzione regolare di questi alimenti potrebbe causare nausea.

Un altro problema è la presenza in questi alimenti di inquinanti ambientali, che dipende dal livello di contaminazione delle acque in cui questi pesci vivono. Un regolare consumo di pesce, ad esempio, potrebbe causare avvelenamento da mercurio<sup>27-28</sup>. I pesci a più elevata concentrazione di mercurio sono i grandi predatori (squalo, pesce-spada e sgombro) che, essendo ai vertici della catena alimentare, accumulano dosi maggiori della sostanza. I più sicuri, al contrario, sono i pesci di piccola taglia e quelli d'allevamento (acciuغه, aringhe, sardine, pesce in scatola e pesci di allevamento, come la trota e il salmone). All'interno della stessa specie, a parità di condizioni ambientali, i livelli di mercurio sono proporzionali all'età, al peso e alla superficie corporea dell'animale. Pertanto, è consigliabile preferire pesci di piccola taglia.

## LA STEATOSI EPATICA

### **NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease)**

La NAFLD rappresenta il più comune disordine epatico negli Stati Uniti<sup>29</sup>, infatti, è considerata un problema sociale in quanto colpisce più di un terzo della popolazione generale, soprattutto i soggetti obesi. Considerata in passato una condizione benigna, è una malattia che comprende diverse condizioni clinicopatologiche che vanno dal semplice accumulo di trigliceridi negli epatociti (steatosi epatica) a steatoepatite non alcolica (NASH), fibrosi e cirrosi<sup>30</sup>. Nella patogenesi della NAFLD entrano in gioco diversi fattori: l'alterazione di ormoni importanti nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico (leptina e adiponectina), l'aumento di alcune citochine (TNF- $\alpha$ , interleuchine), l'iperlipidemia, il diabete di tipo 2 e l'ipertrigliceridemia. Risulta molto forte l'associazione tra la sindrome metabolica e NAFLD<sup>31</sup>. Inizialmente si pensava che la steatosi epatica non alcolica fosse esclusivamente una malattia degli adulti, invece, oggi si osserva che risulta essere notevolmente aumentata in tutta la popolazione (20-35%) e interessa anche i bambini (2,6%), raggiungendo il 53% nei bambini obesi<sup>32</sup>.

### **Definizione, caratteristiche e cause della steatosi epatica**

La steatosi epatica è definita come un aumento del contenuto di grasso all'interno della cellula del tessuto epatico. Questa condizione viene anche definita come "fegato grasso". Si parla di steatosi microvescicolare quando l'epatocita contiene piccole gocce lipidiche, si parla di steatosi macrovescicolare nel caso in cui la cellula contiene un'unica grande goccia lipidica. Sebbene negli anni siano stati compiuti significativi progressi nella comprensione della patogenesi della NAFLD, le anomalie metaboliche che portano all'accumulo epatico di trigliceridi ed al conseguente danno epatocellulare, restano scarsamente comprese. Lo sviluppo di steatosi è legata al ruolo che il fegato ha nel metabolismo dei grassi ed in particolare dei trigliceridi. Sono stati ipotizzati diversi meccanismi che potrebbero portare a questo stato patologico tra cui un aumentato trasporto o disponibilità di acidi grassi provenienti dalla dieta o mobilizzati dal tessuto adiposo, mediante lipolisi. Un aumentato volume degli adipociti, come si osserva nel soggetto obeso, ed un aumento dell'idrolisi dei trigliceridi, causata dall'iperattività della lipasi ormone sensibile (LPS), contribuiscono ad innalzare i livelli plasmatici degli acidi grassi liberi<sup>33</sup> (FFA). La velocità di uptake degli FFA negli epatociti è direttamente proporzionale alla loro concentrazione nel plasma; in questa condizione il loro ingresso non regolato nel fegato causerà steatosi. Altre cause responsabili della steatosi sono l'iperinsulinemia e l'iperlipidemia che promuovono la lipogenesi de novo, mediante un'up-regolazione del fattore di trascrizione lipogenico "proteina 1c che lega gli elementi regolativi degli steroli" (SREBP-1c), la cui attivazione insulino-mediata determina l'attivazione della trascrizione di tutti i geni richiesti per la lipogenesi. L'overespressione di

SREBP-1C nel fegato porta allo sviluppo del fegato grasso. La proteina SREBP-1C attiva anche l'acetil-CoA carbossilasi 2 (ACC2) che produce malonil-CoA. L'aumento della concentrazione di malonil-CoA ha come risultato il decremento dell'ossidazione degli acidi grassi, attraverso l'inibizione della carnitina-palmitoil trasferasi 1 (CPT1), la quale trasporta gli acidi grassi nei mitocondri, favorendo l'accumulo epatico di trigliceridi<sup>34</sup>. In più, la ridotta fuoriuscita di acidi grassi dal fegato, dovuta ad una difettiva incorporazione dei trigliceridi nell'apolipoproteina B o ad una ridotta sintesi della stessa, potrebbe contribuire all'instaurarsi di questa patologia. Un secondo fattore di trascrizione che partecipa allo sviluppo della steatosi epatica nei roditori è il recettore  $\gamma$  attivato da proliferatori perossisomiali, (PPAR- $\gamma$ ) richiesto per il normale differenziamento dell'adipocita<sup>35</sup>. In condizioni normali PPAR- $\gamma$  è espresso a livelli molto bassi nel fegato, mentre, si è visto, che in modelli animali insulino-resistenti e con fegato grasso, la sua espressione è marcatamente incrementata<sup>36</sup>. Il meccanismo molecolare attraverso cui PPAR- $\gamma$  promuove la deposizione di trigliceridi nel fegato non è stato ancora pienamente compreso. Recenti lavori suggeriscono che i mitocondri svolgono un'azione importante nella patogenesi della NASH.

### **Mitocondri e loro funzione nella cellula**

I mitocondri sono degli organelli cellulari di forma generalmente allungata, presenti in tutte le cellule eucariotiche ed in grado di svolgere molteplici funzioni. La più importante funzione svolta da questi organelli, consiste nell'estrarre energia dai substrati organici e nel convertirla in forme utili a promuovere le diverse reazioni cellulari. Con la respirazione mitocondriale la cellula opera l'ossidazione completa dei substrati organici a spese dell'ossigeno fino ad arrivare ad anidride carbonica e ad acqua, ricavandone energia. Vista la loro importanza nel metabolismo cellulare, questi organelli occupano in genere una frazione importante del volume cellulare totale.

I mitocondri sono delimitati da una doppia membrana e costituiti da diversi compartimenti, ciascuno con specifiche funzioni metaboliche. La membrana esterna permette il passaggio di piccole molecole, quella interna è selettivamente permeabile e ripiegata in estroflessioni chiamate creste mitocondriali, che ne aumentano la superficie. Le due membrane identificano due differenti regioni: lo spazio intermembrana, delimitato dalle due membrane e la matrice circoscritta dalla membrana interna. La matrice mitocondriale è una soluzione acquosa molto concentrata di enzimi e di intermedi chimici coinvolti nel metabolismo energetico. La produzione di energia, come già detto, è la funzione principale del mitocondrio e viene svolta utilizzando i principali prodotti della glicolisi, attraverso due processi: il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa. Con il ciclo di Krebs si completa l'ossidazione dei substrati energetici, già iniziata nel citosol, con formazione di NADH e FADH<sub>2</sub>. Il NADH e il FADH<sub>2</sub> vengono poi utilizzati nella fosforilazione ossidativa per produrre molecole ad alta energia (ATP).



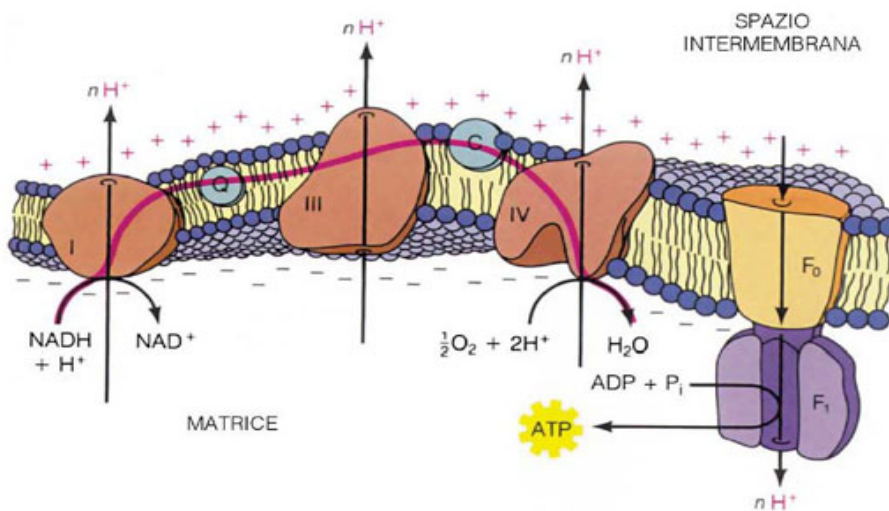
**Figura 2. Mitocondrio**

Attraverso un complesso multienzimatico, avente la funzione di catena di trasporto, gli elettroni vengono prelevati da NADH e FADH<sub>2</sub> e, dopo una serie di passaggi intermedi, vengono ceduti all'ossigeno molecolare (O<sub>2</sub>) che viene ridotto ad acqua. Durante il trasferimento elettronico le varie proteine trasportatrici subiscono dei cambiamenti conformazionali che consentono di trasferire dei protoni dalla matrice allo spazio intermembrana, portando così alla formazione di un gradiente protonico ed elettrico. I diversi complessi poliproteici, responsabili del trasporto degli elettroni, sono localizzati sulla membrana interna del mitocondrio:

- ∞ Il complesso I (NADH deidrogenasi), chiamato anche coenzima Q reduttasi, contiene diversi polipeptidi, una flavo proteina e 9 centri ferro-zolfo, che oscillano tra due stati: ossidato e ridotto. Tale complesso acquista elettroni dal NADH e per ogni coppia di elettroni fatta passare vengono trasferiti 4 protoni nello spazio intermembrana. Questo complesso trasferisce gli elettroni ricevuti direttamente al secondo trasportatore, il coenzima Q<sup>37</sup>.
- ∞ Il coenzima Q, noto anche come ubiquinone, presenta una struttura chinonica, con una catena laterale più o meno lunga. Esso è solubile nella membrana; cioè non ha una posizione fissa come gli altri complessi respiratori, ma si può muovere liberamente; questa caratteristica gli consente di prendere elettroni sia dal complesso I che dal complesso II.
- ∞ Il complesso II (succinico deidrogenasi) oltre a catalizzare una reazione del ciclo di Krebs<sup>38</sup>, ossida il FADH<sub>2</sub> e, come il complesso I, trasferisce gli elettroni al coenzima Q, riducendolo, ma non permette il passaggio di protoni.
- ∞ Il complesso III, anche detto "citocromo c reduttasi", riceve elettroni dal coenzima Q e li trasferisce al citocromo c e in seguito trasferisce 4 protoni nello spazio intermembrana.
- ∞ Il complesso IV, detto "citocromo c ossidasi" contiene ioni rame che permettono il trasferimento degli elettroni dal citocromo c all'ossigeno, e determina un nuovo ed ultimo spostamento di protoni verso lo spazio intermembrana.



Nei mitocondri, l'azione dei complessi I, III e IV ha come effetto principale quello di portare elettroni dal NADH all'ossigeno, mentre i complessi II, III e IV dal FADH<sub>2</sub> all'ossigeno. Il flusso di elettroni attraverso questi trasportatori è accompagnato al passaggio di protoni verso lo spazio intermembrana, generando un gradiente protonico, utilizzato per fosforilare ADP, attraverso il complesso V (ATP sintasi). L'ATP sintasi è una pompa protonica di tipo F, costituita da due strutture dette F<sub>0</sub> e F<sub>1</sub>. La subunità F<sub>1</sub> è una proteina periferica direttamente responsabile della sintesi di ATP<sup>39</sup>, costituita da tre subunità  $\alpha$  e da tre  $\beta$ , organizzate in dimeri  $\alpha$ - $\beta$ , disposti a delimitare un canale. Al centro vi è una subunità  $\gamma$  che si collega alla struttura della F<sub>0</sub>. La subunità F<sub>0</sub> è una proteina integrale di membrana, attraversa la membrana mitocondriale interna e costituisce il canale per il passaggio dei protoni dallo spazio intermembrana alla matrice. La proteina strutturalmente è costituita da due subunità b e da dieci subunità c, queste ultime delimitano il canale. Il passaggio di protoni attraverso la porzione F<sub>0</sub> determina la rotazione della subunità  $\gamma$  che a sua volta determina una variazione conformazionale dei dimeri  $\alpha$ - $\beta$  della porzione F<sub>1</sub> e la sintesi di ATP. L'ATP prodotta esce dal mitocondrio grazie all'enzima



**Figura 3 Catena respiratoria**

“Traslocasi dei Nucleotidi Adeninici”(ANT), inserito nella membrana mitocondriale interna, che catalizza lo scambio con ADP citosolico, entrante nel mitocondrio. Nel processo di fosforilazione della catena respiratoria, l'ADP e il fosfato sono dei reagenti necessari per il trasporto degli elettroni dal NADH all'ossigeno. Infatti una diminuzione della disponibilità di ADP (ossia una bassa richiesta di energia) rallenta la velocità di fosforilazione (stato 4 o stato di riposo della respirazione), portando ad un incremento del gradiente protonico ai lati della membrana interna e rallentando così la velocità di trasporto degli elettroni. Diversamente un aumento del contenuto di

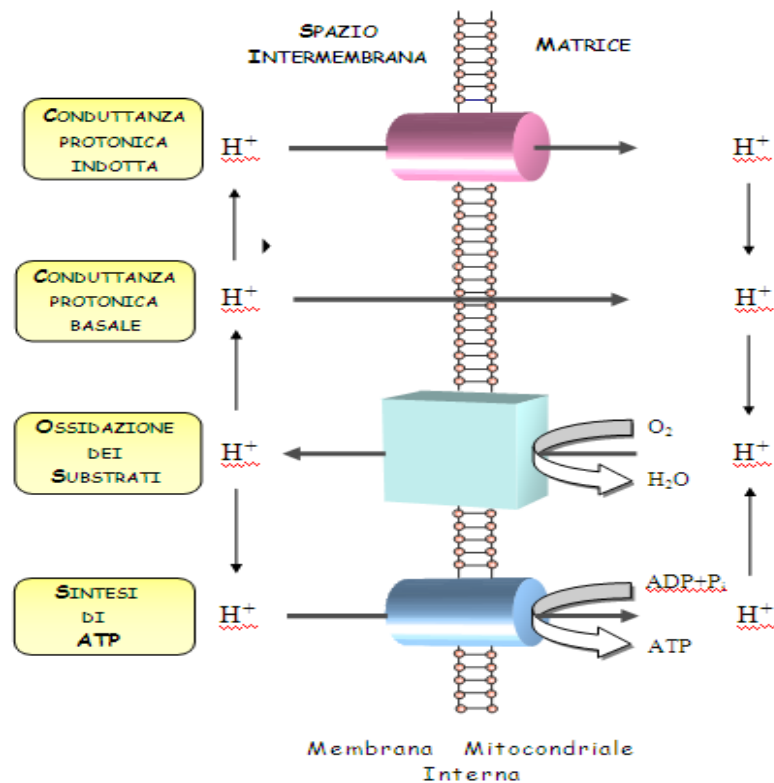
ADP (incrementato dall'idrolisi di ATP, dovuto ad una maggiore richiesta di energia), produce un aumento della velocità di fosforilazione da parte del complesso V, attenuando il gradiente protonico e stimolando il trasporto di elettroni e il consumo di ossigeno (stato 3 o stato attivo della respirazione). Infatti se ad un sistema isolato di mitocondri, allo Stato 4 della respirazione, si aggiunge una quantità saturante di ADP, il consumo di ossigeno aumenta bruscamente fino ad un massimo e contemporaneamente l'ADP viene fosforilato ad ATP, Stato 3. Quando l'ADP aggiunto è stato fosforilato, la velocità di consumo dell'ossigeno ritorna allo Stato 4. Questo fenomeno, in cui la velocità di trasporto degli elettroni è controllata dalla concentrazione di ADP, è chiamato controllo da parte dell'accettore o controllo respiratorio. L'indice di controllo da parte dell'accettore (RCR) è il rapporto tra la velocità di respirazione dei mitocondri in presenza di notevoli quantità di ADP e la velocità di respirazione in assenza di ADP. Questo rapporto è normalmente molto alto, può essere di 5 o più nei mitocondri intatti, ma quando i mitocondri sono danneggiati perdono la loro capacità di fosforilare l'ADP e il rapporto scende ad 1. L'RCR è quindi un'utile misura dell'integrità dei mitocondri isolati.

### **Efficienza e disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale.**

La sintesi di ATP e il trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria appaiono, dunque due processi strettamente accoppiati. Tuttavia, l'accoppiamento tra l'ossidazione di substrati e la sintesi di ATP non è pari al 100%. Questo disaccoppiamento risulta essere alla base della produzione di calore negli animali a sangue caldo. Esistono due tipi di disaccoppiamento (Fig.4):

- ∞ Il disaccoppiamento basale, il quale non è finemente regolato ed è presente in tutti i mitocondri.
- ∞ Il disaccoppiamento inducibile, il quale è catalizzato da proteine e si trova solo in alcuni tipi cellulari.

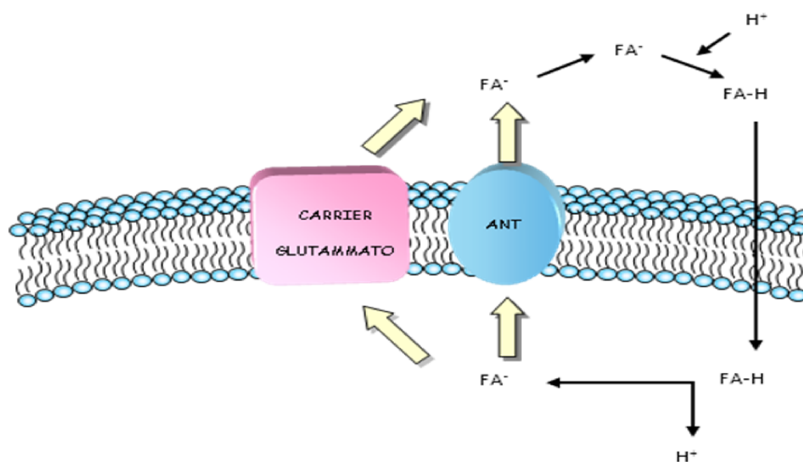
Il disaccoppiamento basale, definito anche conduttanza protonica basale<sup>40</sup> è dovuto ad una perdita protonica passiva da parte della membrana mitocondriale interna, determinata dalle caratteristiche intrinseche della membrana stessa. La conduttanza protonica basale non è il risultato di un artefatto nell'isolamento dei mitocondri, in quanto risulta essere presente anche nei mitocondri di cellule ed organi intatti, come fegato, timociti, linfociti, muscolo scheletrico, e cuore<sup>41</sup>. Il contributo della conduttanza protonica basale al consumo di ossigeno può essere molto elevato, con percentuali che oscillano dal 20% al 50% in tessuti quali il fegato ed il muscolo. In particolare, tale contributo è del 20% negli epatociti attivi e del 25% negli epatociti a riposo<sup>42</sup>. Per quanto riguarda il disaccoppiamento inducibile o conduttanza protonica indotta, in natura esistono diversi agenti disaccoppianti e tra questi vi sono gli acidi grassi.



**Figura 4. Conduttanza protonica attraverso la membrana mitocondriale interna**

Nelle cellule intatte e nei tessuti, essi rappresentano un eccellente substrato respiratorio in quanto forniscono elettroni alla catena respiratoria. Questa funzione maschera il loro potenziale effetto disaccoppiante che diventa evidente solo in speciali condizioni fisiologiche (digiuno, esercizio eccessivo) o patologiche (diabete), caratterizzate da un inusuale accumulo di acidi grassi<sup>43</sup>. Il coinvolgimento degli acidi grassi nell'indurre una variazione dell'accoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale è noto sin dagli anni 50. Alcuni ricercatori notarono che tali effetti venivano attenuati dalla presenza di albumina di siero bovino (BSA), una molecola che mostra un'alta capacità di legame per gli acidi grassi<sup>44-45</sup>. Successivamente si dimostrò che gli acidi grassi non esterificati a lunga catena (NEFA) erano i reali agenti disaccoppianti "naturali", ed in particolare la loro potenzialità dipendeva dalla lunghezza della catena e dal loro grado d'insaturazione<sup>46-47</sup>. La differenza fondamentale tra l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi e quello dei classici disaccoppianti sintetici, come il carbonilcianide-4-trifluorometossi-fenilidrazone (FCCP) e il dinitrofenolo, che agiscono da protonofori, è che gli acidi grassi agiscono sul potenziale di membrana e determinano una riduzione del pH nella matrice. Una possibile spiegazione di ciò è stato suggerito da Wrigglesworth e collaboratori<sup>48</sup>. Questi ricercatori hanno evidenziato che l'oleato può catalizzare il trasporto di  $K^+$  e di  $H^+$ , attraverso il doppio strato lipidico, mediante un meccanismo secondo il quale l'acido grasso può traslocare un protone nella matrice come acido associato ( $AH$ ) o come coppia ionica ( $A^- X^+$ ). La direzione del trasporto sarà

determinata dalla polarità del gradiente cationico e la sua velocità dipenderà dalla natura dell'acido grasso e dal particolare catione della coppia ionica. Secondo questo meccanismo, quindi, l'effetto disaccoppiante sarebbe la conseguenza di un afflusso di  $H^+$  nella matrice mitocondriale con conseguente riduzione del potenziale di membrana; in questo modo una parte dell'energia derivata dall'incrementato flusso di elettroni, attraverso la catena respiratoria, viene dissipata. Venne proposto quindi un modello che spiegasse l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi. Tale modello prevede l'esistenza di carrier mitocondriali, capaci di legare e trasportare gli acidi grassi carichi negativamente ( $FA^-$ ) fuori dal mitocondrio. Sul lato citosolico, gli acidi grassi subiscono una protonazione, a causa della differenza di pH, e penetrano nella matrice mitocondriale tramite un meccanismo flip-flop. Nella matrice mitocondriale gli acidi grassi vengono nuovamente deprotonati, causando così il trasferimento di un protone dallo spazio intermembrana alla matrice mitocondriale. (Figura 5) Studi successivi suggerirono che gli acidi grassi erano in grado di incrementare la conduttanza protonica nei mitocondri, interagendo con alcuni componenti della membrana mitocondriale interna. Il gruppo di Skulachev, infatti, osservò che alcuni inibitori dell'ANT erano in grado di abolire parte dell'effetto disaccoppiante del palmitato<sup>49</sup>. Tali evidenze portarono gli autori ad ipotizzare che l'ANT potesse essere coinvolta nel disaccoppiamento mediato dagli acidi grassi.



**Figura 5. Effetto disaccoppiante degli acidi grassi**

In particolare Schonfeld, utilizzando uno specifico inibitore del carrier ANT, quale la carbossiatrattiloside (CAT), evidenziò una correlazione tra il grado di attivazione del carrier stesso ed il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi<sup>50</sup>. Nel tessuto adiposo bruno (BAT), ossia il tessuto specializzato nella produzione di calore, è stato provato che il disaccoppiamento è mediato da una proteina disaccoppiante, l'UCP1<sup>51</sup>. Questa proteina forma un canale capace di aumentare il passaggio passivo di protoni, attraverso la membrana mitocondriale interna dissipando, sotto forma di calore, il gradiente protonico determinato dall'ossidazione dei substrati energetici nella catena respiratoria; offrendo così una via di rientro alternativa per i protoni rispetto a quella rappresentata

dall'ATP sintetasi. Nel 1997 sono state scoperte altre due proteine, omologhe alla proteina disaccoppiante 1: l'UCP2 e l'UCP3. La proteina UCP2 è stata trovata in tutti i tessuti dei mammiferi eccetto negli epatociti parenchimali<sup>52</sup>; la proteina UCP3 sembra essere una proteina specifica del muscolo scheletrico e del BAT<sup>53</sup>. Altre due proteine della stessa famiglia, infine, chiamate UCP4 e UCP5, sono state ritrovate nel cervello<sup>54-55</sup>. Sebbene inizialmente si pensasse che queste proteine disaccoppianti avessero un ruolo predominante nel disaccoppiamento mitocondriale, e quindi nella termogenesi, ulteriori studi hanno evidenziato che probabilmente il ruolo principale di queste proteine sia quello di trasportare i perossidi degli acidi grassi attraverso la membrana mitocondriale interna. In questo modo la faccia interna della membrana mitocondriale si libera dai perossidi degli acidi grassi che altrimenti potrebbero formare degli ossidanti altamente aggressivi, che danneggiano il DNA mitocondriale, l'aconitasi ed altre componenti della matrice mitocondriale. Allo stato stazionario, la concentrazione dei perossidi degli acidi grassi è noto essere basso, questo potrebbe spiegare perché l'UCP 2, 3, 4 e 5 sono presenti in piccole quantità generalmente insufficienti a dare un grosso contributo alla conduttanza protonica mitocondriale.

#### **Mitocondri del muscolo scheletrico: subsarcolemmatici ed intermiofibrillari.**

Differentemente, da altri organi o tessuti, in cui i mitocondri presenti hanno le stesse caratteristiche biochimiche e funzionali, costituendo un'unica popolazione mitocondriale, studi condotti sul muscolo scheletrico hanno dimostrato che i questi tessuti sono presenti due popolazioni mitocondriali, una localizzata direttamente sotto il sarcolemma (*mitocondri subsarcolemmatici, SS*) ed un'altra tra le miofibrille (*mitocondri intermiofibrillari, IMF*)<sup>56</sup>. È possibile isolare separatamente le due frazioni. Per esempio, i mitocondri SS sono stati isolati dal cuore con processore tissutale Polytron, mentre i mitocondri IMF sono stati ottenuti con una digestione nagarse del restante tessuto. Questi risultati sono stati convalidati da osservazioni al microscopio elettronico che mostravano, in seguito al trattamento col Polytron, una rottura del sarcolemma con liberazione dei sottostanti mitocondri, ma con ritenzione dei mitocondri intatti tra le miofibrille<sup>57</sup>. L'isolamento delle due popolazioni di mitocondri ha permesso una loro analisi separata. Tale studio ha dimostrato che queste popolazioni di mitocondri non solo presentano una localizzazione diversa nella cellula, ma anche differenze biochimiche e funzionali. Infatti, i risultati hanno indicato una maggiore attività della membrana mitocondriale interna e degli enzimi della matrice negli IMF rispetto agli SS. Le attività specifiche della succinico deidrogenasi e della citrato sintasi sono più alte nei mitocondri IMF rispetto a quelli SS, mentre quelle della carnitina-palmitoiltransferasi e dell' $\alpha$ -glicerolofosfato deidrogenasi sono approssimativamente le stesse in entrambe le popolazioni. La capacità ossidativa dei mitocondri IMF è più alta di quella dei

mitocondri SS con tutti i substrati utilizzati sperimentalmente<sup>58</sup>. Studi sulle caratteristiche biochimiche dei mitocondri IMF e SS isolati dal muscolo scheletrico sono potenzialmente molto importanti ai fini della comprensione dei ruoli che queste due frazioni mitocondriali occupano all'interno della cellula. Il muscolo scheletrico rappresenta un buon modello per la sua capacità di alterare il suo contenuto in mitocondri in risposta all'attività contrattile. Alterazioni della richiesta energetica, come ad esempio quelle imposte dall'attività contrattile, giocano un ruolo importante nel determinare la distribuzione cellulare e il contenuto in mitocondri. Numerosi esperimenti indicano che l'aumento o la diminuzione dell'attività muscolare portano a differenti adattamenti dei mitocondri SS e IMF<sup>59</sup>. Ulteriori lavori hanno dimostrato che in alcuni stati fisiologici e patologici, una delle due popolazioni di mitocondri muscolari può aumentare di numero<sup>60</sup>. Questo fenomeno suggerisce la presenza di un meccanismo compensatorio dei livelli degli organelli in risposta a specifiche stimolazioni della cellula. In conclusione le specifiche differenze biochimiche tra mitocondri IMF e SS del muscolo scheletrico sembrano coincidere con differenze nella capacità respiratoria, misurata utilizzando inibitori sito-specifici della catena di trasporto degli elettroni. Le differenze biochimiche possono essere in parte attribuite a un differente andamento della sintesi proteica mitocondriale. Occorrono ulteriori studi per identificare le specifiche proteine coinvolte, così come per mettere in relazione tali differenze con i possibili ruoli funzionali che queste due frazioni mitocondriali potrebbero giocare nel metabolismo energetico della cellula<sup>59</sup>.

### **Mitocondri e radicali liberi**

I mitocondri sono i maggiori produttori cellulari di radicali liberi e nel contempo i principali bersagli dei loro effetti dannosi. I radicali liberi ( $R\bullet$ ) sono specie chimiche capaci di esistenza indipendente e che possiedono uno o più elettroni spaiati nei loro orbitali. Si formano nelle cellule, sia in seguito alle loro reazioni metaboliche che a stimoli esterni: radiazioni ionizzanti, elevata tensione di ossigeno, sostanze chimiche, farmaci e stress. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) si suddividono in radicali e non radicali. Tra i primi abbiamo :

- ∞ Il radicale superossido  $O_2^{\cdot-}$
- ∞ Il radicale idrossile  $\bullet OH$
- ∞ Il radicale alcossile  $RO\bullet$
- ∞ Il radicale perossile  $ROO\bullet$

La specie dell'ossigeno non radicale è il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Nelle cellule l' $H_2O_2$  si forma come prodotto primario della riduzione dell'ossigeno da parte di numerose ossidasi, la maggior parte delle quali è localizzata a livello dei perossisomi. La pericolosità dell'acqua ossigenata non è dovuta ad un suo attacco diretto a livello dei componenti cellulari, bensì all'interazione con le forme ridotte di alcuni metallo-ioni e con il radicale superossido. I radicali

liberi in generale agiscono a livello delle membrane cellulari, portando alla perossidazione lipidica che comporta :

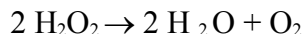
- ∞ Perdita di grassi polinsaturi;
- ∞ Alterazione della fluidità della membrana;
- ∞ Alterazione della permeabilità della membrana. Vengono alterati i rapporti tra i lipidi e le proteine che sono immerse nella membrana;
- ∞ Danni agli enzimi associati alla membrana;
- ∞ Alterato trasporto ionico. Molte proteine di membrana hanno la funzione di trasporto ionico.

Un esempio di proteina danneggiata dai radicali liberi è l'aconitasi, un enzima del ciclo di Krebs, dotata nel suo sito attivo di un cluster  $[4\text{Fe-4S}]$  che è il principale bersaglio dei superossidi. È stato proposto che il cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ , venga ossidato dallo ione superossido, formando il cluster inattivo  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$  a causa del rilascio reversibile del ferro<sup>61</sup>. In questa reazione si formerebbe ferro e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , perciò, l'inattivazione dell'aconitasi mitocondriale, mediata dal superossido, potrebbe incrementare la formazione del radicale idrossilico ( $\text{HO}\cdot$ ), attraverso la reazione di Fenton nei mitocondri. Questa selettiva e reversibile distruzione dei "cluster"  $[4\text{Fe-4S}]$ , può essere usata per stimare la concentrazione dei superossidi nelle cellule di mammifero<sup>62</sup>. Nelle cellule sane, l'accumulo di proteine ossidate è impedito dalla loro eliminazione, per proteolisi. Le proteine degradate sono sostituite da altre sintetizzate "de novo", che contengono grandi quantità di aminoacidi riciclati. Se l'attacco ossidativo è forte, può essere superata la capacità proteolitica delle cellule e in tali condizioni le proteine non digerite possono formare aggregati dannosi per la cellula. Inoltre i radicali liberi possono agire anche a livello del DNA nucleare o mitocondriale, determinando una rottura della doppia elica con formazione di legami destabilizzanti che possono sfociare in mutazioni. Nei mitocondri i siti maggiormente coinvolti nella produzione di ROS sono localizzati a livello della catena di trasporto degli elettroni (Figura 2). Il radicale superossido si genera quando una piccola frazione del flusso elettronico proveniente dai substrati, quali NADH e  $\text{FADH}_2$  sfugge ai complessi della catena respiratoria e riduce una molecola di ossigeno. Il principale sito di produzione del superossido è l'ubichinone, il quale si alterna tra gli stati di chinone (completamente ossidato) e semichinone (il prodotto della riduzione monovalente); durante tale processo vi è la tendenza per un elettrone di passare direttamente all'ossigeno, invece che al carrier successivo, con conseguente formazione di superossido. La catena di trasporto mitocondriale può, quindi, cedere un elettrone all'ossigeno, mediante il radicale semichinone dell'ubichinone<sup>63-64</sup>. Il radicale superossido che ne risulta può dare inoltre origine al perossido di idrogeno. Si ritiene comunemente che la generazione mitocondriale di  $\text{O}_2^{\cdot-}$  rappresenti la maggior fonte intracellulare di radicali dell'ossigeno in condizioni fisiologiche. L'importanza assunta dai

mitocondri nella produzione di ROS è evidenziata dagli effetti della carenza di enzimi antiossidanti, quali:

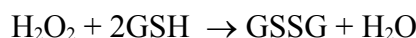
- ∞ La superossido dismutasi (SOD);
- ∞ La catalasi (CAT);
- ∞ La glutazione perossidasi (GPX);

La SOD catalizza la conversione  $O_2^{\bullet}$  in  $H_2O_2$ <sup>65</sup>, in modo da prevenirne l'azione tossica sui tessuti. L'  $H_2O_2$  prodotta deve essere convertita in  $H_2O$  per impedire che i complessi degli ioni metallici la convertano in  $\bullet OH$ ; l'enzima deputato a questo è la CAT tramite la seguente reazione:



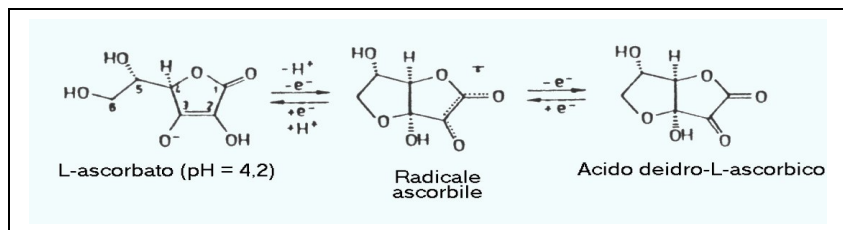
L'attività di quest' enzima aumenta all'aumentare della produzione di  $H_2O_2$ .

La GPX rimuove l'  $H_2O_2$ <sup>66</sup> tramite il glutazione (GSH) :



La glutazione perossidasi è costituita da quattro subunità proteiche, ciascuna delle quali contiene nel sito attivo un atomo di selenio come selenocisteina<sup>67</sup>, per cui tracce di Se sono essenziali nella dieta. Questo enzima è presente in tutti i tessuti, particolarmente in quelli a basso contenuto di CAT (muscolo e regioni del cervello). Il fegato invece contiene alte concentrazioni di entrambi gli enzimi. L'efficienza del sistema GPX-GSH richiede la riconversione del GSSG (glutazione ossidato) a GSH catalizzata dalla glutazione riduttasi (GR), la quale mantiene il rapporto GSH/GSSG ad un livello alto (> 10 : 1).  $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$

Il meccanismo di difesa contro i radicali liberi può essere effettuato non solo dall'azione degli enzimi antiossidanti, ma anche attraverso antiossidanti esogeni che provengono dall'alimentazione come l'acido ascorbico (o vitamina C) e tocoferolo (o vitamina E). La vitamina C è il più importante antiossidante dei fluidi extracellulari. L'ascorbato (Asc) riduce  $H_2O_2$ , formando il radicale monodeidro-ascorbato (radicale ascorbibile), la cui relativa stabilità e la dismutazione ad ascorbato e deidroascorbato è alla base dell'attività antiossidante dell'acido ascorbico (Figura 6).



**Figura 6. Attività antiossidante dell'acido ascorbico**

Esso è in grado di proteggere dall'azione dei radicali perossilici ed è stato osservato che contrasta l'ossidazione delle LDL mantenendo bassa la pressione arteriosa. La vitamina E è abbondante

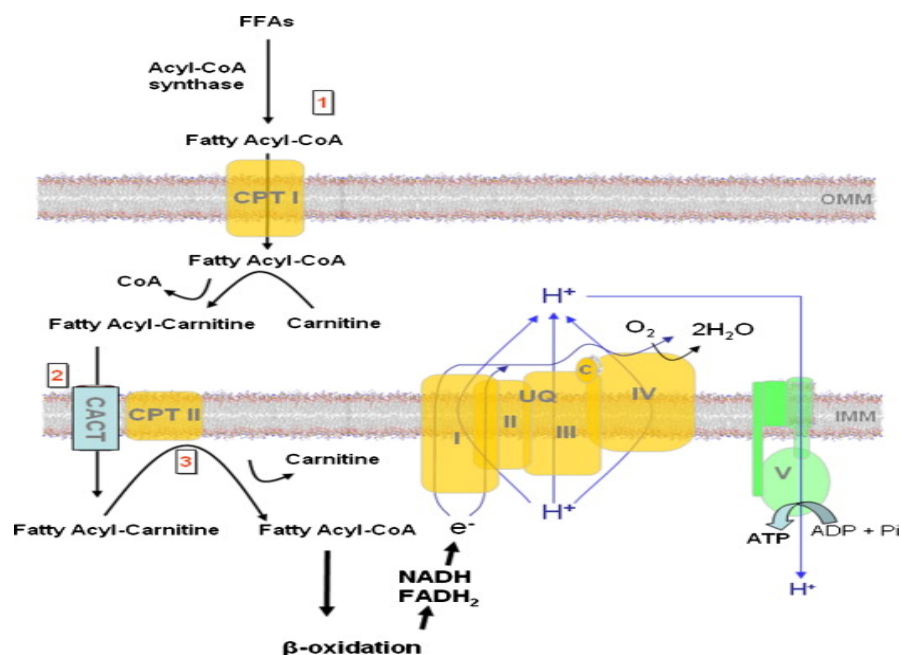


nella membrana mitocondriale e svolge un ruolo antiossidante nella prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, evento chiave nello sviluppo del processo di perossidazione lipidica, donando un elettrone ai radicali perossilipidici e rendendoli in tal modo meno reattivi. Durante questa reazione l' $\alpha$ -tocoferolo perde un elettrone formando il radicale  $\alpha$ -tocoferossile, che è relativamente stabile poiché l'elettrone spaiato è fortemente delocalizzato.  $\alpha\text{-TocH} + \text{LO}_2^{\bullet} \rightarrow \alpha\text{-Toc}^{\bullet} + \text{LO}_2\text{H}$ . A questo punto il radicale  $\alpha$ -tocoferossilico può reagire con la vitamina C o con il glutatione riformare l' $\alpha$ -tocoferolo.

### **Disfunzione mitocondriale e steatosi epatica.**

Da quanto detto precedentemente, i mitocondri giocano un ruolo importante nel metabolismo della cellula, essendo il principale sito di ossidazione degli acidi grassi e della fosforilazione ossidativa e, al tempo stesso, il più importante sito cellulare di produzione di ROS. I mitocondri negli epatociti sono abbondanti, infatti occupano circa il 18% dell'intero volume cellulare. Diverse prove sperimentali indicano che la disfunzione epatica mitocondriale gioca un ruolo centrale nella patogenesi della steatosi epatica non alcolica, considerata quindi una disfunzione mitocondriale<sup>68</sup>. Le anomalie mitocondriali associate con la NAFLD includono lesioni ultrastrutturali, diminuzione del DNA mitocondriale (mtDNA) che codifica per proteine importanti nella catena di trasporto degli elettroni, diminuzione dell'attività dei complessi della catena respiratoria I, III, IV, V<sup>69</sup>, alterata  $\beta$ -ossidazione. Anomali cambiamenti morfologici epatici sono stati osservati in pazienti e modelli animali con NASH<sup>70</sup>, infatti, la microscopia elettronica rivela che i mitocondri sono grandi e gonfi, scarsi di numero e che la matrice possiede delle inclusioni paracristalline. Queste lesioni sono state trovate in biopsie epatiche di pazienti trattati con 4,4'-dietilamminoetossiestrolo, un farmaco che inibisce l'attività della catena respiratoria mitocondriale e la  $\beta$ -ossidazione<sup>71</sup>. Il trattamento prolungato con questo farmaco è associato a steatosi epatica e steatoepatiti. Diversi meccanismi possono essere considerati per spiegare la disfunzione mitocondriale che si ritrova nei pazienti e nei modelli animali con NAFLD tra i quali l'alterata espressione del recettore gamma coattivatore 1 (PGC-1) che, normalmente, favorisce la biogenesi mitocondriale e stimola la capacità ossidativa mitocondriale a livello di diversi tessuti e l'eccessiva produzione di ROS. La  $\beta$ -ossidazione mitocondriale è un processo coinvolto nella degradazione di acidi grassi a corta, a media, a lunga catena, i cui enzimi coinvolti sono localizzati a livello della matrice mitocondriale. Mentre gli acidi grassi a corta e media catena entrano liberamente nei mitocondri, quelli a lunga catena, per passare dal citoplasma cellulare alla matrice mitocondriale, necessitano di un trasporto regolato dall'attività dell'enzima CPT1. Questo trasporto è essenziale per il metabolismo energetico della cellula, in quanto è nella matrice mitocondriale che gli acidi grassi vengono  $\beta$ -ossidati<sup>72</sup>. In particolare, gli acidi grassi una volta entrati devono subire una reazione ATP

dipendente che porta alla formazione di un legame tioestere tra il gruppo carbossilico dell'acido grasso ed il gruppo tiolico del coenzima A, formando così acil-CoA. L'acil-CoA ottenuto non può attraversare la membrana mitocondriale interna. Il gruppo acilico deve essere trasferito alla carnitina e questo avviene, appunto, ad opera della CPT1, localizzata sulla membrana mitocondriale esterna. Sulla membrana interna del mitocondrio, invece, è localizzato l'enzima carnitina-palmitoil transferasi II (CPTII), che catalizza la reazione di transesterificazione degli acidi grassi con CoA mitocondriale, rilasciando carnitina libera. A questo punto l'acil-CoA può andare incontro a successive reazioni enzimatiche caratteristiche della  $\beta$ -ossidazione. Gli elettroni, liberati durante l'ossidazione degli acidi grassi, passano attraverso la catena respiratoria dei mitocondri e, attraverso questa via, arrivano all'ossigeno con la concomitante fosforilazione di ADP ad ATP. (Figura 7) La disfunzione della catena respiratoria mitocondriale può direttamente portare alla produzione di ROS. Se il trasporto degli elettroni viene interrotto in qualche punto della catena respiratoria, il complesso respiratorio precedente all'interruzione può trasferire elettroni all'ossigeno molecolare con produzione, come visto in precedenza, di anione superossido e perossido d'idrogeno<sup>73</sup>. L'aumento della produzione di ROS, dovuto all'eccesso di acidi grassi liberi, è stata convalidata in modelli animali affetti da NASH<sup>74</sup> e successivamente confermata anche in fegati umani, fornendo un'ulteriore prova che in tali circostanze si ha un aumento dello stress ossidativo<sup>75</sup>.



**Figura 7. Trasporto degli acidi grassi a livello mitocondriale e  $\beta$ -ossidazione**

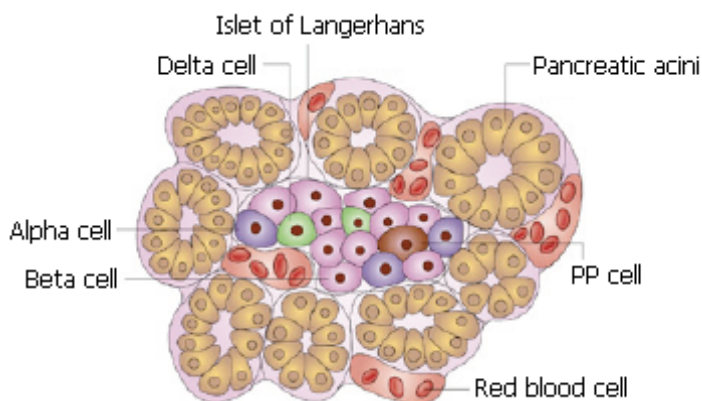
In pazienti con NASH gli epatociti sono sovraccaricati di FFA e diversi studi hanno evidenziato che, durante questa epatopatia, vi è un incremento della  $\beta$ -ossidazione lipidica, pertanto si verifica

un aumento dell'attività della CPT1 e, in aggiunta, PPAR  $\gamma$  (e PPAR $\alpha$ , appartenente alla stessa famiglia di PPAR $\gamma$ ), attivato da un aumento di FFA, favorisce l'espressione di enzimi che sono coinvolti nel trasporto e nell'ossidazione degli acidi<sup>76</sup>. Una delle conseguenze dell'aumento degli acidi grassi in pazienti con NASH è l'attivazione di vie alternative nei perossisomi ( $\beta$  ossidazione) e nei microsomi ( $\omega$  ossidazione) con un inevitabile aumento di radicali liberi<sup>77</sup>, per cui questo effetto cumulativo dell'ossidazione extra mitocondriale non fa altro che accrescere lo stress ossidativo. Nella NASH l'aumento del flusso degli acidi grassi liberi determina un'aumentata ossidazione lipidica da parte dei mitocondri, quindi una maggior produzione di donatori di elettroni (NADH e FADH<sub>2</sub>) nella catena di trasporto degli elettroni e, di conseguenza, la differenza di voltaggio, attraverso la membrana mitocondriale, aumenta fino a raggiungere una soglia limite. Il trasferimento degli elettroni all'interno del complesso III viene bloccato<sup>78</sup>, provocando il ritorno degli elettroni al coenzima Q, il quale cede uno per volta gli elettroni all'ossigeno molecolare, generando quindi superossido. I ROS possono attaccare gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), presenti anche a livello mitocondriale, e innescare fenomeni di perossidazione lipidica nelle cellule<sup>79</sup> con formazione di sottoprodotti aldeidici che, avendo emivita più lunga rispetto ai ROS, raggiungono distretti intra ed extracellulari distanti dal loro luogo di origine, amplificando gli effetti dello stress ossidativo. La perossidazione dei PUFA attenua la secrezione di VLDL nei roditori<sup>80</sup>. Come abbiamo già visto, la catena respiratoria mitocondriale genera ROS anche in mitocondri sani, tuttavia, in condizioni fisiologiche, i ROS sono neutralizzati chimicamente dagli antiossidanti e solo una piccola quantità persiste come radicale libero. In pazienti con NASH il danno ossidativo è, invece, maggiore perché si verifica anche una ridotta attività degli enzimi antiossidanti<sup>81</sup>. Gli studi finora effettuati portano alla conclusione che ci sia un rapporto inequivocabile di causa-effetto tra accumulo epatico di trigliceridi, stress ossidativo e progressione a NASH.

## LA RESISTENZA ALL'INSULINA

### Biosintesi, struttura e azioni dell'insulina.

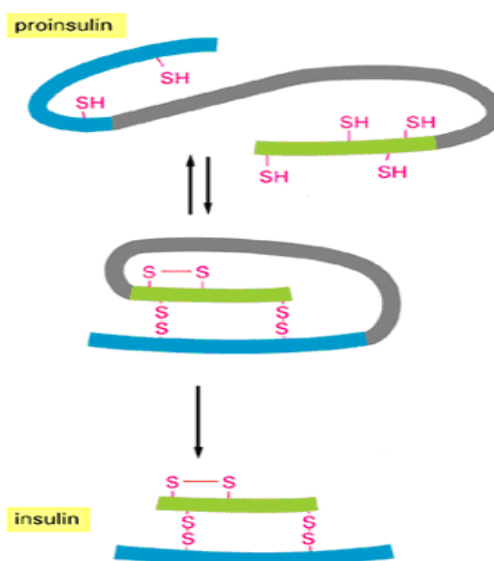
L'insulina è un ormone proteico anabolico le cui azioni interessano il metabolismo glucidico, lipidico e proteico. Essa è prodotta nel pancreas dalle cellule  $\beta$  delle Isole di Langerhans.



**Figura 8** Cellule  $\beta$  delle Isole di Langerhans che producono l'insulina.

L'azione principale di quest'ormone è di abbassare i livelli di glucosio nel sangue (glicemia), facilitando l'ingresso e l'utilizzo dello stesso all'interno delle cellule bersaglio, quali le cellule muscolari, le cellule epatiche e gli adipociti e inibendone la formazione a livello epatico (gluconeogenesi). L'insulina è secreta dal pancreas endocrino subito dopo un pasto, oppure, quando il livello del glucosio aumenta come risposta ad uno stimolo ad es. lo stress, che induce un innalzamento ematico dei livelli degli ormoni ad effetto iperglicemizzante. L'insulina è costituita da due catene polipeptidiche, note come  $\alpha$  e  $\beta$ . La catena  $\alpha$  è formata da 21 aa, la  $\beta$  da 30. Queste catene sono tenute assieme da ponti disolfuro, che si formano tra le cisteine in posizione 7 e 19 della catena  $\beta$  e tra le cisteine in posizione 7 e 20 della catena  $\alpha$ . L'integrità di questi ponti è essenziale per l'attività biologica dell'ormone<sup>82</sup>. L'insulina nella sua forma completa viene prodotta dalla proinsulina, mediante taglio proteolitico di un peptide di congiunzione di 33 aa, detto peptide C, mediante l'azione di un'endopeptidasi. La proinsulina a sua volta deriva dalla pre-proinsulina, mediante distacco di una sequenza (nota come sequenza pre), fondamentale per il suo trasporto e maturazione all'interno del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di golgi.(Figura 9) L'insulina viene sintetizzata e immagazzinata all'interno di vescicole o granuli secretori, situati vicino alla membrana interna delle cellule. In risposta ad uno stimolo appropriato queste vescicole si fondono con la membrana cellulare e l'insulina viene così rilasciata all'esterno della cellula; ciò significa che la sintesi dell'ormone non è regolata da fattori, bensì è continua. L'esocitosi dell'ormone, invece, è controllata; in particolare, è stimolata dall'eccesso di nutrienti presenti nel

sangue ed è inibita dalla loro carenza. La regolazione della secrezione è di notevole importanza perché se,



**Figura 9. La struttura dell'insulina**

normalmente, l'insulina serve a far diminuire le concentrazioni di glucosio nel sangue (infatti, è un ormone ipoglicemizzante), durante la fase di digiuno, quando, invece, la glicemia deve aumentare, con un rilascio non controllato di insulina si potrebbe andare incontro ad ipoglicemie. Sebbene sia un ormone peptidico, non è necessaria nessuna proteina di trasporto per mantenerne i livelli nel sistema circolatorio, infatti, il suo trasporto avviene in forma libera. La quantità di insulina secreta dal pancreas dipende dalla velocità con la quale si innalza la glicemia, questa velocità dipende dalla quantità di carboidrati che si assumono, e soprattutto dal loro indice glicemico. Quando si assumono carboidrati a basso indice glicemico: la glicemia s'innalza gradualmente, viene secreta una quantità normale di insulina che riporta gradualmente la glicemia ai livelli precedenti, il cervello è ben nutrito per molte ore e non richiede altro cibo. A seguito, invece, dell'ingestione di carboidrati ad alto indice glicemico, la glicemia subisce un brusco innalzamento; viene secreta una notevole quantità di insulina che causa un'altrettanto brusca diminuzione della glicemia. In questo caso il cervello va in crisi e richiede altro cibo. E' chiaro, quindi, che il fattore che stimola la secrezione di insulina è l'aumento della glicemia. Le molecole di glucosio entrate nelle cellule  $\beta$  del pancreas vengono demolite, mediante ossidazione con produzione di ATP, che induce la chiusura di particolari canali  $K^+$  (ATP sensibili) cui consegue una depolarizzazione ed apertura dei canali ionici  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti. A questo segue la liberazione dell'ormone. Quando la concentrazione di glucosio nel sangue è alta, come dopo un pasto, il pancreas secreta insulina che stimola il fegato a prelevare il glucosio dal sangue per immagazzinarlo. Siccome, la capacità del fegato di immagazzinare glucosio è piuttosto limitata (circa 70 grammi), i carboidrati in eccesso

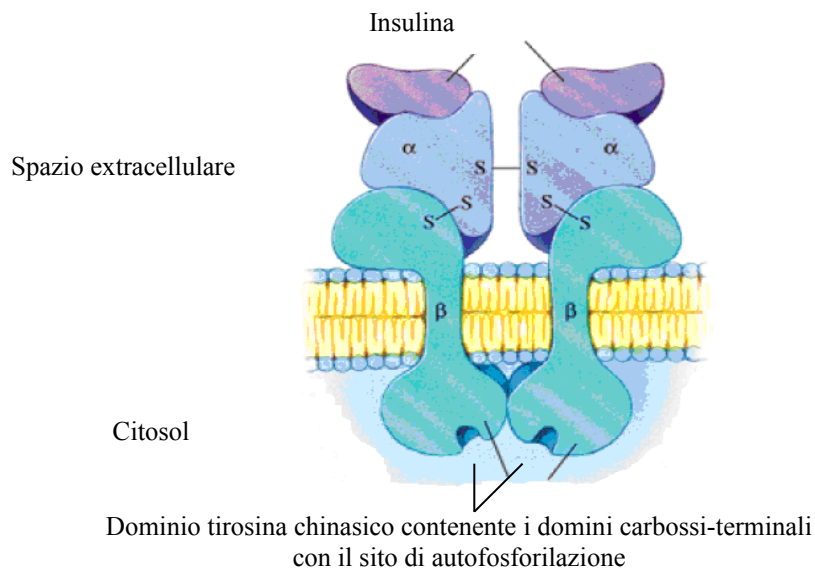
vengono convertiti in grassi e depositati nel tessuto adiposo. L'insulina provoca, quindi, una riduzione della glicemia, dei livelli di amminoacidi e della quantità di grassi nel sangue determinando un accumulo di questi nei tessuti. Nel fegato l'insulina stimola, la formazione di glicogeno, un polimero costituito da diverse molecole di glucosio legate chimicamente tra loro, il quale costituisce una riserva energetica utilizzabile nei periodi di digiuno; in tal modo gli organi e i tessuti avranno in qualunque momento della giornata un substrato energetico disponibile. Inoltre l'insulina favorisce la sintesi ed il deposito dei grassi nelle cellule adipose spingendo la cellula ad utilizzare i carboidrati come fonte energetica. Il principale ormone antagonista dell'insulina è il glucagone, il quale agisce a digiuno, quindi, nel momento in cui la concentrazione di glucosio nel sangue è bassa; svolge un'azione catabolica agendo principalmente sul fegato dove stimola la glicogenolisi e la gluconeogenesi, promuovendo, quindi, il rilascio di glucosio dalle sue scorte e la sua emissione in circolo; stimola, inoltre, la degradazione delle proteine e il trasporto degli amminoacidi, substrati necessari per la gluconeogenesi epatica. In definitiva, il glucagone ha l'effetto di mantenere le concentrazioni ematiche di glucosio entro valori fisiologici anche durante il digiuno. A causa delle opposte azioni dell'insulina e del glucagone, lo stato del flusso delle sostanze nutritive del metabolismo nell'organismo dipende dalle quantità relative dei due ormoni. Nello stato anabolico si registra un alto rapporto insulina-glucagone, in quello catabolico il rapporto è basso.

### **La via di trasduzione del segnale insulinico.**

L'insulina è una molecola ad alto peso molecolare e quindi non può entrare direttamente nelle cellule, ma agisce attraverso dei recettori presenti sulla loro membrana plasmatica. Infatti, ogni cellula dispone di recettori specifici per l'insulina. I recettori per l'insulina sono delle glicoproteine eterotetrameriche di grosse dimensioni, costituiti da due subunità  $\alpha$  e due  $\beta$  legate mediante ponti disolfuro. Le subunità  $\alpha$  sono completamente extracellulari e contengono un sito di legame per l'insulina, mentre le subunità  $\beta$ , trans membrana, comprendono sul lato citosolico un dominio dotato di attività tirosin chinasi<sup>83</sup>. (Figura 10)

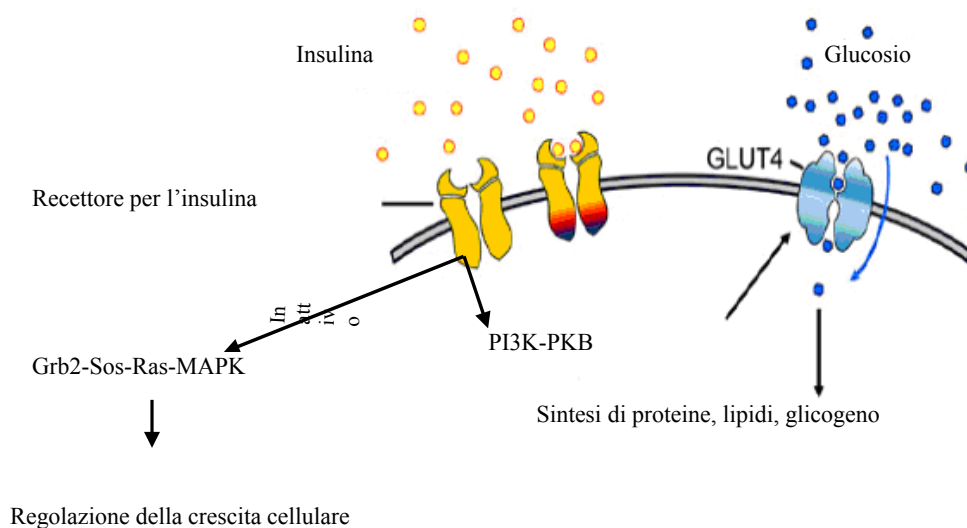
Il legame insulina-recettore dà il via ad una serie di reazioni a cascata e all'attivazione di diverse proteine bersaglio. In seguito all'interazione dell'insulina con il recettore, le subunità  $\beta$  vanno incontro ad autofosforilazione su alcuni residui di tirosina del dominio citosolico. L'autofosforilazione del recettore, ne stimola notevolmente l'attività tirosin chinasi e crea siti di legame per proteine che si associano così al dominio citosolico delle subunità  $\beta$ . Tra queste proteine vi è il substrato del recettore dell'insulina (IRS). L'IRS si associa al recettore e viene così fosforilata dal recettore su molti residui di tyr, creando a sua volta siti di legame per proteine con

domini SH<sub>2</sub>, come la subunità p85 dell'enzima fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) e la proteina legante i recettori dei fattori di crescita (GRB2).



**Figura 10. Il recettore insulinico.**

Si ha l'attivazione della *via di trasduzione Grb2-Sos-Ras-MAPK* e della *la via PI-3k-PkB (Akt)*. (Figura 4) Nel primo caso la molecola GRB2, attivata dall'interazione, mediante il dominio SH2<sup>84</sup>, con IRS1, lega il fattore di scambio di nucleotidi guaninici (SOS o GEF) il quale a sua volta, a livello del compartimento submembranario, lega ed attiva la proteina Ras, favorendo il passaggio dalla forma inattiva Ras-GDP a quella attiva Ras-GTP. La proteina Ras lega e attiva Raf-1, una serin treonin chinasi, che fosforila e attiva MEK (MAP chinasi chinasi) a livello di due residui di serina.



**Figura 11 Segnale insulinico e suoi effetti all'interno della cellula.**

La MEK fosforila la MAPK/ERK, la quale, a sua volta, è in grado sia di attivare delle proteine nel citosol e sia di traslocare nel nucleo. Nel nucleo MAPK/ERK attiva diversi fattori di trascrizione nucleari, come Elk-1, i quali, a loro volta, determinano la trascrizione e la traduzione di un gruppo di geni, i cui prodotti proteici portano a varie risposte cellulari, tra cui il differenziamento, la divisione e la sopravvivenza cellulare. Anche l'enzima PI3K, come Grb2, interagendo con IRS-1, attraverso il dominio SH2, viene attivato. Il PI-3K attivo converte il lipide di membrana "fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato", detto anche PIP<sub>2</sub>, in fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato, PIP<sub>3</sub>. Il PIP<sub>3</sub> può agire come secondo messaggero legandosi a particolari domini di certe proteine ad attività ser/thr chinasi, come la chinasi dipendente da fosfolipidi (PDK)<sup>85</sup>, la quale attiva la proteina chinasi B (PKB), una chinasi serina/treonina, anche conosciuta come Akt, la quale viene fosforilata a livello del residuo di treonina 308 ed attivata dalla PDK<sup>86-87</sup>. L'Akt è una proteina di 57 kDa di cui esistono tre isoforme  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , (Akt1, Akt2, Akt3, rispettivamente)<sup>88</sup>, è localizzata in diversi compartimenti subcellulari, incluso il Golgi, il reticolo endoplasmatico, i mitocondri e il nucleo<sup>89</sup>. La sua azione più importante è quella che si evidenzia in seguito alla sua attivazione da parte dell'insulina. L'ormone, infatti, attiva PKB $\alpha$  nel muscolo scheletrico e PKB $\beta$  negli adipociti<sup>90</sup>, la quale fosforila una delle sue proteine bersaglio, la glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3). Nella sua forma attiva, cioè, nello stato non fosforilato, l'enzima GSK3 fosforila la glicogeno sintasi, inattivandola e bloccando la sintesi del glicogeno. Quando GSK3 viene fosforilata dall'Akt, è convertita nella forma inattiva<sup>91</sup>; quindi, impedendo l'inattivazione della glicogeno sintasi, la cascata di fosforilazione di proteine indotta dall'insulina stimola la sintesi del glicogeno. Come già detto un'importante risposta al segnale dell'insulina è la stimolazione del trasporto del glucosio nelle cellule effettuato dal trasportatore 4 del glucosio (Glut4) che proprio per azione dell'insulina trasloca dal suo pool di riserva intracellulare alla membrana plasmatica<sup>92</sup> favorendo l'assunzione di glucosio dal sangue che viene conservato sottoforma di glicogeno da parte del muscolo cardiaco e scheletrico e di triacilgliceroli da parte degli adipociti. Si pensa che Akt sia anche coinvolta nel reclutamento di Glut4 alla membrana come dimostrato da numerosi studi. Si è visto, infatti, che l'over-espressione di PKB in cellule muscolari di ratto L6<sup>93-94</sup> determina un incremento dell'attività basale di PKB accompagnato da una significativa stimolazione dell'uptake di glucosio, dovuto al reclutamento di Glut4 ad un livello paragonabile a quella suscitata normalmente dall'insulina in cellule di controllo e da un concomitante aumento della sintesi del glicogeno e delle proteine. L'Akt fosforila le sue proteine bersaglio su residui di serina e treonina tra cui il "substrato 40 dell'Akt ricco in prolina" (PRAS40). Interessanti studi, che hanno avuto come oggetto questa proteina substrato, hanno dimostrato che la sua fosforilazione è indotta in risposta alla stimolazione con insulina in vivo in diversi tessuti bersaglio ed è, invece, marcatamente ridotta in uno stato di insulino-resistenza, indotta da una dieta



iperlipidica<sup>95</sup>. L'Akt determina la fosforilazione e l'attivazione di diverse proteine che sono coinvolte nella proliferazione cellulare, come il fattore nucleare quale "la proteina legante l'elemento responsivo all'AMPC" (CREB)<sup>96</sup> che, fosforilato da PKB, promuove la sopravvivenza cellulare ed inoltre inibisce l'apoptosi, inibendo l'attività di proteine che sono coinvolte in questo processo, come i fattori pro-apoptotici, NF-kB e la caspasi 9. Infatti, è stato dimostrato che l'espressione costitutiva di PKB $\alpha$  nelle cellule della ghiandola mammaria di topi transgenici, porta all'inibizione della morte cellulare<sup>97</sup>. Inoltre, PKB fosforilando la caspasi 9 sul residuo di serina 196, porta all'inattivazione dello stesso fattore pro-apoptotico<sup>98</sup>. Questa chinasi esercita, inoltre, anche un effetto neuroprotettivo contro il danno cerebrale nel topo geneticamente modificato che esprime una forma attiva della PKB nelle cellule neuronali<sup>99</sup>.

### **La resistenza all'insulina.**

Tra i meccanismi che conducono all'obesità gioca un ruolo importante l'insulino-resistenza<sup>100</sup>. Normalmente l'organismo ottiene il glucosio dalla digestione del cibo nell'intestino, sia direttamente che in seguito alla scissione di carboidrati più complessi in glucosio ed altri zuccheri semplici. Il glucosio viene, inoltre, sintetizzato nel fegato, in un processo noto come gluconeogenesi. Infine, esso viene accumulato nel fegato, nei muscoli ed in altri tessuti sottoforma di glicogeno. All'occorrenza il glicogeno viene scisso in glucosio e secreto nel sangue. Il glucosio viene trasportato nel sangue e da qui viene riassorbito nei tessuti. Dopo un pasto, circa l'80% del riassorbimento di glucosio viene effettuato dalle cellule muscolari. A digiuno, invece, oltre il 50% del riassorbimento di glucosio avviene ad opera del cervello. Questo squilibrio è dovuto al fatto che il glucosio rappresenta l'unica fonte di energia per il cervello e l'organismo deve assicurarne un adeguato apporto, infatti in condizioni di ipoglicemia il cervello non funziona correttamente. L'insulina è l'unico ormone in grado di abbassare i livelli di glucosio nel sangue, riducendo il processo di gluconeogenesi ed incoraggiando l'accumulo di glucosio, sottoforma di glicogeno. Il consumo eccessivo di prodotti a base di zucchero raffinato, però, determina una stimolazione elevata del pancreas nella produzione di insulina, e questo comporta a sua volta un abbassamento del livello di glucosio nel sangue, provocando una condizione di ipoglicemia. Quando il pancreas non produce più l'insulina per bilanciare il consumo di zucchero, il livello di glucosio nel sangue comincia a salire in modo significativo, per cui, quando la quantità di insulina naturale diventa inadeguata a causa di questo meccanismo, il fegato non riesce a trasformare l'eccesso di glucosio in glicogeno, causando quella condizione nota come diabete. Nel 1997, l'Organizzazione Mondiale della Sanità e l'American Diabetes Association si sono accordate su una nuova classificazione del diabete mellito. Le forme più frequenti sono il diabete di tipo 1 e di tipo 2. Il diabete di tipo 1 o insulino-dipendente si manifesta in genere durante l'infanzia o l'adolescenza, ed

è caratterizzato da una scarsa sintesi di insulina<sup>101</sup>. Il diabete di tipo 2, o insulino-indipendente, si sviluppa nell'età adulta, ma con l'aumentare dei casi di obesità, molti giovani presentano questo tipo di disturbo. La malattia si instaura quando, in seguito ad un danno a livello del recettore dell'insulina o dei segnali interni alla cellula che vengono attivati in seguito all'interazione insulina-recettore, l'ormone, pur essendo presente, non riesce ad agire, provocando un'iperglicemia cronica, la quale in mancanza di cure può portare al coma diabetico ed alla morte. Quindi, livelli serici di insulina elevati a digiuno associati a concentrazioni seriche di glucosio elevate o normali e la secrezione di grandi quantità di insulina in risposta a somministrazioni esogene di glucosio, sono caratteristiche di condizioni di insulino-resistenza, intolleranza al glucosio e diabete di tipo 2<sup>102-103-104</sup>. La maggior parte dei pazienti con diabete di tipo 2 o pre-diabetici sono caratterizzati da resistenza all'insulina, uno stato dato dall'incapacità dell'insulina di produrre i suoi effetti biologici a livello cellulare, di tessuto e di organo. All'insulino-resistenza sono associate condizioni cliniche, quali:

- ⌘ i fattori di rischio vascolare come l'ipertensione, la dislipidemia, l'iperuricemia e la trombofilia. E' da ipotizzare che gran parte di queste patologie associate all'insulino resistenza, sia da attribuire all'iperinsulinemia che scaturisce per compensare i ridotti effetti biologici dell'insulina. Al momento attuale, comunque, non è chiaro se la relazione causa-effetto, ammesso che essa esista realmente, sia quella riscontrata tra insulino-resistenza e fattori di rischio vascolare o quella rilevata tra tali fattori e l'iperinsulinemia<sup>105</sup>;
- ⌘ l'obesità, in quanto la maggioranza dei soggetti obesi è insulino resistente. E' interessante notare che l'insulino-resistenza dell'obesità ha caratteristiche qualitative e quantitative molto simili a quella del diabete di tipo 2. Appare quindi logico ipotizzare che proprio l'insulino resistenza costituisca l'elemento fisiopatologico che mette in relazione il diabete con l'obesità. La diversità nella sensibilità insulinica probabilmente è dovuta al fatto che l'insulino resistenza sembra avere una spiccata componente genetica<sup>106</sup>. I fattori che possono condurre a questo stato possono essere diversi:
  - ⌘ riduzione del numero o dell'affinità dei recettori per l'insulina;
  - ⌘ riduzione del numero o errata distribuzione intracellulare dei trasportatori del glucosio;
  - ⌘ iperglicemia;
  - ⌘ elevate concentrazioni di glucagone e/o ormone della crescita;
  - ⌘ aumento più o meno marcato dei trigliceridi plasmatici totali o della quantità di trigliceridi nelle VLDL;
  - ⌘ aumento della concentrazione ematica di acidi grassi liberi.

A questo proposito va detto che l'aumento degli acidi grassi plasmatici sopprime l'attivazione da parte dell'insulina della PI-3K associata a IRS-1, che gioca un ruolo fondamentale nel trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico<sup>107</sup> mediante stimolazione dell'attività di Glut4<sup>108</sup>. Studi sui ratti hanno dimostrato che l'infusione di metaboliti lipidici attiva la proteina chinasi C isoforma teta (PKC- $\theta$ ), la quale, attraverso una cascata di chinasi serina/treonina blocca la fosforilazione della tirosina dell'IRS-1 stimolata dall'insulina. Questo porta ad una riduzione del 50% dell'attività della PI-3K<sup>109</sup>. Inoltre, ratti con la PKC- $\theta$  disattivata sono protetti dall'insulino-resistenza nel muscolo scheletrico causata dai lipidi<sup>110</sup>. La scoperta che un aumento del contenuto intracellulare di metaboliti lipidici può direttamente inibire l'attività di trasporto del glucosio, ha importanti risvolti nel controllo della malattia, specialmente perché un simile meccanismo avviene nel fegato, dove l'accumulo di metaboliti lipidici intracellulari attiva una cascata che coinvolge anche l'isoforma  $\epsilon$  della PKC, determinando una diminuzione della fosforilazione della tirosina di IRS-2, un mediatore importante nell'azione dell'insulina a livello epatico<sup>111-112</sup>. Studi recenti sulla glicero-fosfato-acil-trasferasi (GPAT) mitocondriale disattivata nei ratti, hanno dimostrato chiaramente che il diacilglicerolo, un noto attivatore della PKC- $\epsilon$ , è l'interruttore che dà inizio a questo processo<sup>113</sup>. Una delle più importanti implicazioni di queste scoperte è che non è l'obesità di per sé che porta all'insulino-resistenza, bensì l'accumulo di metaboliti lipidici intracellulari (diacilglicerolo). Questo fenomeno è stato da alcuni definito "lipotossicità". In questa situazione clinica l'insulina è meno efficace rispetto agli individui normali, ciò fa sì che il pancreas produca quantità di insulina superiori alla norma, per cercare di mantenere la glicemia entro livelli normali. Ovviamente, si avrà una ridotta efficacia dell'insulina a mediare il riassorbimento di glucosio da parte delle cellule muscolari e del fegato; ed inoltre nel fegato si avrà produzione di glucosio per gluconeogenesi e per scissione del glicogeno. Pertanto, la resistenza all'insulina provoca un severo aumento della glicemia (iperglicemia), ciò aumenta ulteriormente lo stato di resistenza; condizione che può con il tempo sfociare nello sviluppo del diabete di tipo II. L'insulino-resistenza è una condizione patologica che può permanere per anni o persino per decenni in un individuo senza provocare disturbi rilevanti. La prolungata sovrastimolazione del pancreas, l'accumulo di fibre amieloidi nelle cellule di Langerhans ed il nocivo effetto degli acidi grassi in eccesso determinano l'esaurimento della capacità secretoria del pancreas, e quindi il controllo impossibile della glicemia.

## INFIAMMAZIONE E STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO

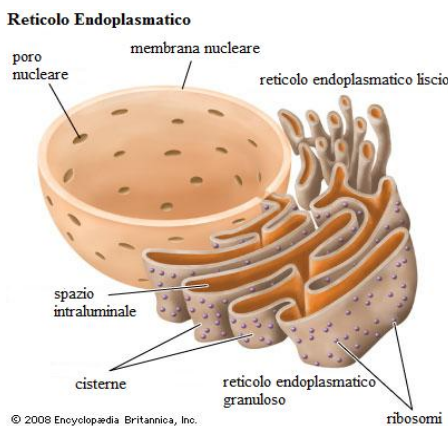
### OBESITÀ, INFIAMMAZIONE E INSULINO-RESISTENZA

L'insulino-resistenza e successivamente il diabete sono legati alla ridotta capacità da parte degli adipociti di accumulare trigliceridi nel tessuto adiposo. Se la capacità di accumulo del tessuto adiposo è insufficiente, un incremento dei depositi di grasso causa un aumento della presenza di adipociti ipertrofici. L'ipertrofia degli adipociti è una possibile condizione di stress per il reticolo endoplasmatico che potrebbe causare uno stato pro-infiammatorio nel tessuto adiposo. In questa condizione, il reticolo endoplasmatico attiverebbe delle vie metaboliche determinando insulino-resistenza, rilascio di proteine che chemioattraggono i macrofagi e, nell'infiammazione cronica, la morte degli adipociti ipertrofici. L'infiammazione del tessuto adiposo, con conseguente aumento dell'insulino-resistenza, porta ad un aumentato rilascio di acidi grassi liberi, che vanno ad incrementare lo stato di insulino-resistenza. Tutti questi processi, unitamente ai ridotti livelli di adiponectina e leptino-resistenza conducono ad una minore ossidazione dei lipidi nei tessuti non adiposici e, in questo modo, si attiva un accumulo ectopico di lipidi, lipotossicità e insulino resistenza anche in queste sedi. Vari studi sono stati condotti per chiarire il legame tra adiposità ed insulino-resistenza ed essi hanno mostrato che la percentuale di macrofagi in un dato deposito di tessuto adiposo è positivamente correlata con l'adiposità e con la dimensione degli adipociti<sup>114</sup>. Inoltre, questi studi hanno mostrato che i macrofagi del tessuto adiposo esprimono fattori proinfiammatori come il fattore di necrosi tumorale (TNF-alfa), l'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) e l'interleuchina 6 (IL-6)<sup>115</sup>. Altri studi, oltre a confermare la iper-espressione di geni macrofagici o infiammatori nel tessuto adiposo bianco (WAT) di topi con obesità genetica o indotta da dieta, hanno mostrato anche che la risposta infiammatoria del tessuto adiposo, aumenta con l'adiposità e si intensifica con l'insorgenza dell'iperinsulinemia<sup>116</sup>. Inoltre questi studi hanno dimostrato che nel WAT di topi obesi, l'espressione della proteina 1 chemioattrattrice dei monociti (MCP-1), una chemochina proinfiammatoria coinvolta nell'attivazione e nel reclutamento dei macrofagi, risulta significativamente aumentata dopo tre settimane di dieta ad alto contenuto lipidico. Un incremento della dimensione dell'adipocita dunque, è una condizione che induce l'adipocita stesso a sintetizzare determinate proteine che giocano un ruolo primario nell'infiammazione e nell'insulino-resistenza. In aggiunta a MCP-1, sembrerebbe che con un aumento dell'obesità, gli adipociti rilasciano altri segnali come il fattore inibitorio per la migrazione dei macrofagi (MIF) e il fattore stimolante le colonie di macrofagi (M-CSF-1). Da questi dati si deduce che la fonte principale delle proteine chemioattrattrici, sia lo stesso adipocita ipertrofico, come confermato da lavori sperimentali<sup>117</sup>. I macrofagi infiltrati potrebbero a loro volta secernere una varietà di chemochine (MCP-1) e citochine (TNF-alfa, ecc.) che promuovono

un ulteriore accumulo locale di macrofagi e potenziando la risposta infiammatoria, così da influenzare l'espressione genica dell'adipocita e determinare uno stato di insulino-resistenza<sup>114</sup>. Il meccanismo attraverso cui l'ipertrofia potrebbe provocare la morte dell' adipocita non è completamente chiaro, ma sembra sia coinvolto lo stress del reticolo endoplasmatico.

## IL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Il reticolo endoplasmatico (RE) è un organulo complesso, caratterizzato da un sistema di membrane che possono avere la forma di cisterne o tubuli. Lo spazio interno, che si identifica tra le pieghe del reticolo, è detto lume e presenta una serie di enzimi che catalizzano diverse reazioni chimiche. Il RE nelle cellule eucariotiche svolge una serie di importanti funzioni, quindi il suo corretto funzionamento è essenziale per la sopravvivenza cellulare. Vi sono due tipi differenti di RE, il reticolo endoplasmatico liscio (REL) e quello granuloso (REG), che si distinguono per morfologia e funzione e la proporzione relativa può variare a seconda del tipo cellulare di cui fanno parte. Questi due compartimenti intercomunicanti hanno in comune una membrana dello spessore di 5-6 nm, la cui struttura è simile a quella di altre citomembrane. I compartimenti differiscono per la forma delle cisterne delimitate da queste membrane e, nel caso del REG, per la presenza sulla faccia esterna di granulazioni dette ribosomi. (Figura 12)



**Figura 12. Organizzazione del Reticolo Endoplasmatico**

### Il reticolo endoplasmatico liscio

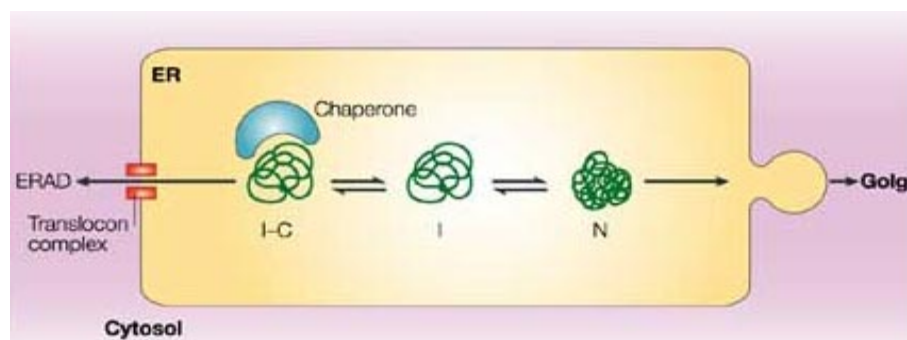
Il reticolo endoplasmatico liscio (REL) è costituito da un sistema di sacche tubolari ed è il maggior responsabile della sintesi dei lipidi, degli ormoni steroidei, del metabolismo del glicogeno, nonché la sede primaria del metabolismo di fosfolipidi, acidi grassi e steroidi. Esso ha inoltre il compito di eliminare sostanze dannose per l'organismo e per tale motivo esso è particolarmente rappresentato negli epatociti (in quanto il fegato è il principale organo preposto alla detossificazione). Si è osservato infatti che, dopo la somministrazione di sostanze tossiche, l'estensione del REL nelle

cellule epatiche aumenta notevolmente. Il REL infine, ha anche la funzione di immagazzinare ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), infatti esso è particolarmente esteso nel tessuto muscolare, dove tali ioni sono necessari per la contrazione.

### Il reticolo endoplasmatico granuloso

Il reticolo endoplasmatico granuloso (REG) è costituito da una serie di membrane piegate l'una sull'altra a formare cisterne. Il termine rugoso (o granuloso) si riferisce al fatto che il versante citoplasmatico delle sue membrane è ricco di ribosomi. Esso infatti, costituisce un vero e proprio sistema di controllo di qualità della sintesi proteica, in grado di permettere solo alle proteine che sono correttamente ripiegate di raggiungere la destinazione finale. Infatti, proteine o oligomeri con conformazione alterata che transitano nel lume reticolare, vengono trattenuti nel RE o degradati, qualora la loro alterazione persista minacciando l'integrità cellulare. Il RE è responsabile della biosintesi di circa un terzo delle proteine sintetizzate in una cellula eucariotica ed è in grado di fornire un ambiente unico sia per il folding delle proteine sia per le modificazioni post-traduzionali di polipeptidi destinati a vari distretti cellulari. Il folding proteico all'interno del RE, è facilitato da chaperoni molecolari e catalizzatori che mantengono la solubilità delle proteine, ne incrementano l'efficienza ed assicurano che solamente i prodotti proteici con una corretta conformazione tridimensionale possano essere traslocati al compartimento del Golgi. (Figura 13)

Gli chaperoni molecolari sono essenzialmente divisi in due gruppi: di tipo lectinico (leganti le porzioni glucidiche delle proteine), come calnessina e calreticulina, e chaperoni che legano la catena polipeptidica, come **BiP** (GRP78) e GRP94. La sintesi di proteine all'interno del RE varia con lo stato fisiologico della cellula che si adatta a queste variazioni modulando la sua capacità di favorire il folding proteico; quando tale equilibrio viene alterato, si parla di stress del RE.



**Figura 13. Folding delle proteine all'interno del Reticolo Endoplasmatico.**

## Stress del reticolo endoplasmatico

Negli organismi eucariotici tutte le proteine secretorie passano nel ER dove vengono ripiegate assumendo la loro struttura tridimensionale, in un processo detto folding, ed assemblate in complessi, prima di essere trasportate nel Golgi. Il reticolo endoplasmatico può essere considerato un sito d'integrazione tra la risposta immune e quella metabolica, tale struttura è infatti molto sensibile al glucosio, ai lipidi ed ai patogeni. Può essere ipotizzato che l'ER sia responsabile della percezione dello stress metabolico e della conseguente induzione di una risposta infiammatoria. L'aumento dell'adiposità nei soggetti obesi sovraccarica infatti la capacità funzionale del reticolo endoplasmatico e ne limita l'espansione, creando una condizione di stress. Il corretto funzionamento del RE è essenziale per la sopravvivenza delle cellule eucariotiche, in particolar modo per quelle cellule altamente specializzate nella sintesi proteica. Per sopravvivere alle condizioni di stress, le cellule innescano un meccanismo protettivo detto Unfolded Protein Response (UPR)<sup>118</sup>. Finora sono stati identificati quattro meccanismi funzionalmente distinti di risposta allo stress del RE. Il primo coinvolge l'aumento dell'espressione di geni codificanti proteine chaperon del RE, tra cui **BiP**/GRP78 e GRP94, che incrementano la capacità di folding del reticolo e prevengono l'aggregazione proteica; queste proteine condividono una sequenza consenso nel loro promotore, detta ER stress response element (ESRE) o unfolded protein response element (UPRE). La seconda risposta consiste nell'attenuazione traduzionale che avviene a livello dell'inizio della sintesi proteica, attraverso la fosforilazione di **eIF2 $\alpha$**  del residuo Ser51, che inibisce il legame dell'inziatore Met-tRNA al ribosoma. La terza risposta è la degradazione delle proteine con alterata conformazione, chiamata ER-associated degradation (ERAD): tali proteine sono riconosciute dal sistema di controllo del reticolo, retrotrasportate dal RE al citosol, e degradate via proteasoma<sup>119</sup>. Quando le funzioni del RE sono irreversibilmente danneggiate, la cellula va incontro ad apoptosi mediante l'induzione trascrizionale di CHOP/GADD153, l'attivazione della chinasi N-terminale di cJUN o l'attivazione della caspasi-12.

### I sensori dell'UPR: Ire1 $\alpha$ , ATF6 e PERK

Tre distinte proteine localizzate sulla membrana del RE, IRE1 (Inositol Requiring Protein 1), PERK (dsRNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase) e ATF6 (Activating Transcription Factor 6), trasmettono segnali di stress dal RE al nucleo in seguito a perturbazioni del folding proteico nel RE. I tre sensori sono normalmente mantenuti in uno stato inattivo mediante l'interazione con lo chaperone **BiP**. Quando le proteine non correttamente "foldate" si accumulano nel RE, il rilascio delle protein kinasi IRE1 $\alpha$ , PERK e ATF6 da BiP permette

l'attivazione di quest'ultimo. IRE1 $\alpha$  dimerizza e si autofosforila, determinando con il suo dominio RNAsico uno splicing non convenzionale dell'mRNA di XBP-1 che, a sua volta, determina la trascrizione di chaperoni e dei geni dell'ERAD (ER-associated degradation); anche PERK può dimerizzare e autofosforilarsi, determinando a sua volta la fosforilazione di eIF2 $\alpha$ . ATF6 invece, una volta liberata da BIP, trasloca nel Golgi dove subisce un taglio proteolitico ad opera di due proteasi, SP1 e SP2 (site-1 protease e site-2 protease). Il frammento citosolico di 50 kDa, formatosi da tale taglio, trasloca nel nucleo dove può attivare la trascrizione dello chaperone BIP, di XBP-1 e dei geni dell'ERAD. (Figura 14) I geni specifici coinvolti nella risposta allo stress del RE variano in tipi cellulari diversi, a seconda dei sensori dello stress che vengono attivati, dei fattori trascrizionali tessuto-specifici, ed inoltre dal tipo, grado e durata dello stress. Difatti, un'attivazione acuta o cronica di basso grado dell'UPR conduce ad una funzione protettiva e adattativa attraverso l'induzione degli chaperoni. Al contrario, un'attivazione severa e prolungata dello stress del RE porta, generalmente, a morte cellulare per apoptosi<sup>120</sup>.

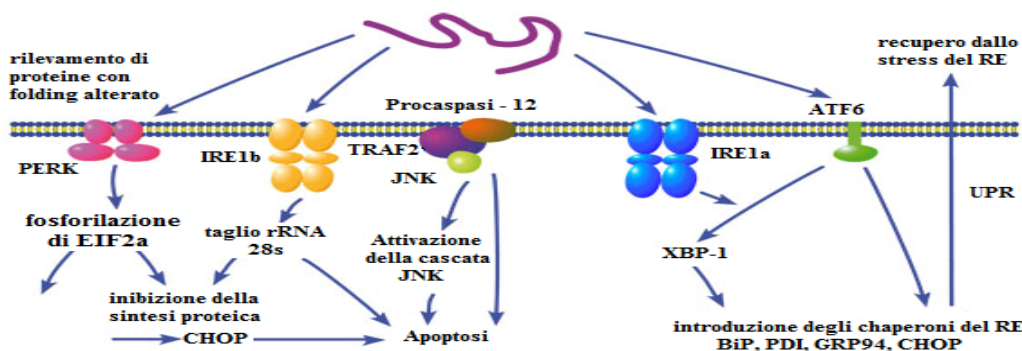


Figura 14. Vie di attivazione dell'UPR.

### Stress del reticolo endoplasmatico e insulino-resistenza

Numerose evidenze indicano che la disfunzione dell'UPR gioca un ruolo importante in diverse malattie umane, incluso il Diabete Tipo 2. È stato, infatti, descritto che lo stress del RE è coinvolto nell'apoptosi delle  $\beta$  cellule del pancreas; in topi Akita, che mostrano una mutazione spontanea nel gene dell'insulina Ins2, l'insulina mal ripiegata genera stress del RE, causando apoptosi delle  $\beta$  cellule e riduzione della massa  $\beta$  cellulare<sup>121</sup>. Topi knock-out per PERK hanno un fenotipo indicativo di Diabete Tipo 1 dovuto alla distruzione delle insulae pancreatiche a pochi giorni dalla nascita<sup>122</sup>. Mutazioni di PERK causano anche una rara forma ereditaria di Diabete Tipo 1 nell'uomo, la sindrome di Wolcott-Rallison<sup>123</sup>. Analogamente, la perdita della fosforilazione di eIF2 $\alpha$  per la mutazione indotta Ser51Ala causa alterazioni della funzione  $\beta$  pancreatiche, in aggiunta ad un effetto negativo sulla gluconeogenesi nel fegato<sup>124-125</sup>. Quindi, è



plausibile che lo stress del RE, indotto da stimoli appropriati, sia implicato nella progressione della disfunzione  $\beta$  cellulare. Recentemente diversi studi hanno mostrato il coinvolgimento dello stress del RE anche nell'insulino-resistenza. Infatti, in cellule epatiche, lo stress del RE determina lo spegnimento del signaling dell'insulina attraverso la fosforilazione in serina del recettore per l'insulina (IR) mediata da JNK (c-jun N-terminal kinase) e topi knock-out eterozigoti per il fattore di trascrizione XBP-1 risultano insulino-resistenti<sup>126</sup>. Lo stress del RE potrebbe dunque rappresentare un meccanismo unico alla base sia dell'insorgenza di insulino-resistenza, sia dell'alterata secrezione insulinica e giocare un ruolo cruciale nella patogenesi del Diabete Tipo 2. L'ER stress e l'attivazione di UPR possono essere indotti da una richiesta maggiore di sintesi di proteine e lipidi in seguito ad ipernutrizione ed espansione dell'adipocita. L'ER stress attiva, nell'adipocita ipertrofico, vie che innescano insulino-resistenza, rilascio di proteine chemioattrattive di macrofagi e poi, in condizioni di infiammazione cronica, conducono alla morte dell'adipocita ipertrofico. Gli adipociti insulino-resistenti, caratterizzati da scarsa capacità liposintetica ed elevata capacità lipolitica, inducono tra i vari cambiamenti, aumenti nei livelli circolanti di FFA e lipidi. Gli acidi grassi liberi inducono l'ER stress e l'apoptosi nelle cellule beta e, quindi, danneggiano la secrezione dell'insulina<sup>127</sup>. Inoltre i ridotti livelli circolanti di adiponectina e la leptino-resistenza agiscono insieme per ridurre l'ossidazione lipidica nei tessuti non adiposici, e ciò comporta un'accumulo ectopico di lipidi, uno stato lipotossico e l'insulino-resistenza. Inoltre sia gli FFA e i suoi metaboliti, quali diacilglicerolo (DAG) e ceramidi, che il TNF- $\alpha$  e le altre citochine infiammatorie, attivano una cascata di chinasi, come PKC (*protein kinase C*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e IKK- $\beta$  (*I kappa B kinase- $\beta$* ), le quali fosforilano la proteina IRS-1 in residui di serina o treonina, impedendone la fosforilazione in tirosina e quindi ostacolando il *signaling* insulinico, ivi compresa la fosforilazione insulino-dipendente della proteina chinasi B, mediatore cruciale nella via di segnalazione dell'insulina<sup>128-129</sup>. Gli acidi grassi potrebbero contribuire all'insulino-resistenza attraverso l'attivazione dei recettori TLR (Toll-like receptors), i quali sono stati ipotizzati essere coinvolti nell' induzione di infiammazione in adipociti e macrofagi. Il difetto nella risposta all'insulina comporta un ulteriore accumulo di FFA, creando cos' un circolo vizioso. Inoltre l'attivazione di IKK- $\beta$  causa anche l'ulteriore induzione di molecole infiammatorie, quali il TNF- $\alpha$ , creando anche in questo contesto un circuito a feedback positivo<sup>130-131</sup>. In conclusione, tutte le condizioni che aumentano i livelli serici circolanti di FFA e di lipidi e che compromettono fortemente la secrezione/funzione di adiponectina e leptina, aumentano lo stato lipotossico nei tessuti magri e aumentano quindi la loro insulino resistenza<sup>132</sup>.

### **Altri mediatori di infiammazione: SOCS ed iNOS**

Oltre ai pathway dipendenti dalle serin/treonin chinasi, ci sono altri fattori che contribuiscono all'insulino-resistenza indotta da infiammazione. Infatti, almeno tre membri della famiglia di SOCS (*soppressor of cytokine signalling*), SOCS-1,-3, -6, sono coinvolti nell'inibizione della fosforilazione in tirosina di IRS-1 e -2 o nella loro degradazione proteasomale. Inoltre SOCS-1 e -3 possono essere correlate all'insorgenza d'insulino-resistenza in quanto attivatori di SREBP-1c. Una vasta gamma di citochine, inclusi il TNF- $\alpha$  e l'interleuchina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), inducono l'espressione di una o più SOCS in maniera tessuto-specifica. La stimolazione di citochine infiammatorie può anche causare l'induzione di iNOS e quindi la sovrapproduzione di ossido nitrico (NO), coinvolta nell'inibizione sia dell'azione insulinica nel muscolo che della funzionalità delle  $\beta$ -cellule del pancreas. Inoltre la sovraespressione di iNOS nel fegato è stata correlata all'insorgenza di disfunzioni mitocondriali<sup>133</sup>.

## SCOPO DELLA TESI

Le prime osservazioni di ridotta incidenza di malattie cardiovascolari, associata a una dieta ricca di pesce, sono state confermate da studi sperimentali su popolazioni eschimesi ed hanno evidenziato la correlazione tra prevenzione cardiovascolare e alti livelli di assunzione di EPA e DHA, dei quali il pesce grasso che vive nei mari freddi è particolarmente ricco. Più recentemente è stato dimostrato che anche i livelli endogeni di questi acidi grassi altamente insaturi, direttamente influenzati dalla composizione lipidica della dieta, sono associati alla riduzione del rischio di sviluppare patologie coronariche; per cui l'attenzione del mondo scientifico si è focalizzata su tali benefici e sui meccanismi d'azione che li determinano. Quindi gli effetti benefici degli acidi grassi omega-3, nella prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardiovascolari, sono una realtà ampiamente dimostrata e consolidata. Lo scopo della mia tesi è stato quello di mettere in evidenza gli effetti che le diete iperlipidiche ricche in olio di pesce (acidi grassi polinsaturi), rispetto a diete iperlipidiche ricche in lardo (acidi grassi saturi), hanno sull'insorgenza dell'obesità e delle patologie ad essa correlate quali l'insulino-resistenza, la steatosi epatica e stress del reticolo endoplasmatico in un modello sperimentale animale che utilizza ratti maschi Wistar. A tale scopo i ratti sono stati sottoposti ad un periodo di trattamento per 6 settimane. Gli effetti del trattamento sulla composizione corporea e sul bilancio energetico sono stati messi in evidenza confrontando il peso iniziale e quello finale e di conseguenza il guadagno di peso e l'energia introdotta in ratti alimentati con dieta standard (N), che rappresenta il gruppo di controllo, ratti alimentati con dieta iperlipidica ricca il lardo (L) o in olio di pesce (F). Alla fine del trattamento ho valutato a livello ematico alcuni indicatori di dislipidemia (trigliceridi, NEFA -acidi grassi liberi non esterificati-, colesterolo) e di infiammazione (TNF- $\alpha$ ) nonché i livelli di leptina e adiponectina. Per valutare gli effetti delle diete iperlipidiche ricche in olio di pesce rispetto alle diete iperlipidiche ricche in lardo sulla steatosi ho analizzato il contenuto epatico di trigliceridi e poiché è noto che disfunzioni mitocondriali sono associate allo sviluppo di tale patologia, ho determinato l'efficienza e l'ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale epatico, attività della carnitina palmitoil transferasi (CPT) e dell'enzima aconitasi, come indice di stress ossidativo. Successivamente ho valutato la capacità che la dieta con olio di pesce ha di migliorare la tolleranza al glucosio, cioè ho voluto verificare se l'olio di pesce è in grado di indurre un minore stato di insulino-resistenza rispetto ai ratti alimentati con dieta iperlipidica. L'insulino-resistenza è una patologia in cui la funzione dell'ormone è inferiore a quella attesa, per una mancata trasduzione del segnale. L'azione dell'insulina è quella di consentire il passaggio del glucosio dal sangue alle cellule, impedendo che la sua concentrazione ematica si alzi troppo dopo un pasto, e di favorirne la conservazione sottoforma di glicogeno nel fegato e nel muscolo e di triacilgliceroli negli adipociti. La poca sensibilità all'insulina dei tessuti in una condizione di insulino-resistenza mantiene, invece, un

livello di glucosio alto nel sangue con conseguente sforzo del pancreas a secernere altra insulina, si instaura una condizione di iperglicemia e iperinsulinemia. Ho, quindi, determinato le concentrazioni di insulina e glucosio presenti nel sangue dei ratti alimentati con dieta iperlipidica ricca in olio di pesce o lardo dopo carico orale di glucosio. Ho poi rivolto la mia attenzione al muscolo scheletrico, principale bersaglio dell'insulina. Ho valutato anche in questo caso l'effetto dovuto al danno mitocondriale, andando a determinare efficienza e ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri del muscolo scheletrico, nonché l'attività dell'enzima aconitasi. Studi hanno, inoltre, dimostrato che stati cellulari di insulino-resistenza coinvolgono anche un'alterata attivazione della chinasi PKB/Akt. A tale scopo, sono andato a valutare il grado di fosforilazione dall'Akt a livello muscolare, poiché è l'organo maggiormente coinvolto nell'insulino-resistenza e ho voluto verificare le eventuali differenze degli effetti delle due diete. Per completare l'analisi della diversa risposta tissutale alle due diete iperlipidiche, ho ritenuto interessante un esame istologico su sezioni di fegato e muscolo. Infine ho valutato anche il grado d'infiammazione dei diversi tessuti, andando a determinare, mediante western blot, i livelli d'espressione di diversi fattori coinvolti nell'infiammazione e nell'ER stress, quali: TGF- $\beta$ , MCP-1, BIP ed eIF2- $\alpha$ .

## PARTE SPERIMENTALE

### Disegno sperimentale

Negli esperimenti condotti in questa tesi sono stati utilizzati ratti maschi Wistar di 60 giorni di età, dal peso di circa 250 g.

I ratti sono stati suddivisi in 3 gruppi, di cui:

- un primo gruppo è stato sottoposto ad un trattamento con dieta standard di laboratorio per 6 settimane (ratti N);
- un secondo gruppo è stato sottoposto ad un trattamento con dieta ad elevato contenuto di grassi, ricca in lardo (40%) per 6 settimane (ratti L);
- un terzo gruppo è stato sottoposto ad un trattamento con dieta ad elevato contenuto di grassi, ricca in olio di pesce (40%) per 6 settimane (ratti F).

Il contenuto energetico della dieta standard di laboratorio è di 15,88 kJ/g, mentre il contenuto energetico delle diete iperlipidiche somministrate ai ratti L ed F è di 20 kJ/g.

### Composizione della dieta

Componenti	Dieta controllo	Dieta lardo	Dieta olio di pesce
		g/100g dieta	
Cibo standard g	100g	51,03	51,03
Caseina <sup>a</sup> g	-----	9,25	9,25
Lardo g	-----	21,8	-----
Olio di pesce g	-----	-----	21,8
Olio di girasole g	-----	1,24	1,24
AIN 76 Mineral mix <sup>b</sup> g	-----	1,46	1,46
AIN 76 Vitamin mix <sup>c</sup> g	-----	0,42	0,42
Colina bitartrata g	-----	0,08	0,08
Metionina g	-----	0,12	0,12
H <sub>2</sub> O	-----	14,6	14,6
Densità energetica <sup>d</sup> , kJ/g diet	15,88	20	20
Energia (J/100J)			
Proteine %	29	29	29
Lipidi %	10,6	40	40
Carboidrati %	60,4	31	31

<sup>a</sup> Caseina purificata, contenente 88% proteine

<sup>b</sup> American Institute of Nutrition (1977)

<sup>c</sup> American Institute of Nutrition (1980)

<sup>d</sup> La densità energetica è stata calcolata mediante bomba calorimetrica.

Tutti i ratti sono stati stabulati individualmente, acclimatati in una stanza a temperatura controllata (24°C) e sottoposti ad un ciclo circadiano luce-buio (12 ore luce/12 ore buio). Trattamento, stabulazione e sacrificio degli animali sono stati eseguiti in conformità alle linee guida del

Ministero della Sanità Italiana. Durante tutto il periodo del trattamento è stato controllato sia il peso corporeo che la quantità di cibo introdotta. Alla fine del periodo di trattamento, i ratti sono stati anestetizzati mediante un'iniezione intraperitoneale di cloralio idrato (40mg/100g di peso corporeo) e successivamente decapitati. Tale trattamento è stato ripetuto più volte allo scopo di rendere possibile l'effettuazione di differenti misure.

***- misura della composizione corporea, del bilancio energetico e di parametri serici.***

In una prima serie sperimentale è stata effettuata una valutazione del bilancio energetico e della composizione corporea degli animali. Ho misurato il peso corporeo durante tutto il periodo sperimentale e poi il contenuto in lipidi, acqua e proteine della carcassa, nonché il contenuto energetico della stessa. Ho determinato, inoltre, il bilancio energetico totale, focalizzando l'attenzione soprattutto sul guadagno di peso, sul guadagno energetico e sul metabolismo basale. Su tale serie sperimentale sono state inoltre effettuate anche delle misure dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi, NEFA, ALT (alanino ammino transferasi), leptina, adiponectina e TNF- $\alpha$  da campioni di sangue che sono stati prelevati durante il sacrificio dalla vena cava inferiore.

***- determinazione del grado di insulino-resistenza mediante valutazione della tolleranza orale al glucosio e del grado di fosforilazione della proteina chinasi B.***

In questa serie sperimentale l'interesse è stato prevalentemente rivolto allo studio dell' insulino resistenza a livello muscolare, per cui è stata valutata la tolleranza orale al glucosio mediante curva da carico. I ratti utilizzati sono stati tenuti a digiuno per 16 ore, avendo però libero accesso all'acqua, al fine di valutare la glicemia e l'insulinemia in seguito a somministrazione di glucosio. Inoltre è stato valutato il grado di fosforilazione dell'Akt in risposta all'insulina. A tal fine, tre gruppi di ratti, N, L ed F, sono stati suddivisi in due sottogruppi. Alla fine delle sei settimane, tutti gli animali sono stati posti a digiuno per cinque ore e mezzo al termine delle quali, hanno ricevuto un'iniezione intraperitoneale di soluzione fisiologica (i gruppi N, L ed F) o di insulina, 10 U/kg di peso corporeo<sup>135</sup>, (i gruppi Ni, Li ed Fi). Dopo trenta minuti dall'iniezione, i ratti sono stati anestetizzati tramite iniezione intraperitoneale di cloralio idrato (40 mg/100 g di peso corporeo) e successivamente decapitati. Il muscolo gastrocnemio è stato prelevato, congelato in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi, tramite Western Blot, dell'Akt.

***- determinazione dei parametri mitocondriali epatici e muscolari e valutazione preliminare del grado d'infiammazione e stress del reticolo endoplasmatico.***

In questa serie sperimentale è stata valutata la funzionalità mitocondriale epatica, in termini di efficienza energetica,  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi ed attività degli enzimi: citrato sintasi,

carnitina palmitoil transferasi (CPT) ed aconitasi, sullo sviluppo della steatosi e per le analisi istologiche di tale organo. In questo caso tutti i ratti sono stati sacrificati allo stato alimentato. Lo stesso protocollo sperimentale è stato riproposto per i mitocondri muscolari, al fine di valutare l'insorgenza dell'insulino resistenza. In ultima analisi si è valutato il grado d'infiammazione e stress del reticolo endoplasmatico (ER-stress), determinando il livello d'espressione, mediante western blot, di fattori quali: MCP-1, una chemochina proinfiammatoria e di TGF $\beta$ , citochina chiave nel passaggio da steatosi a fibrosi e quindi coinvolta in una risposta infiammatoria più ampia. Per quanto riguarda l'ER-stress si sono valutati, sempre mediante western blot, i livelli d'espressione di mediatori chiave in questo processo, quali: BIP e eIF2 $\alpha$ .

## **METODICHE UTILIZZATE A LIVELLO CORPOREO**

### **Misura della composizione corporea e del bilancio energetico.**

Il peso corporeo e l'assunzione di cibo sono stati monitorati giornalmente per l'intero periodo sperimentale. Inoltre per l'analisi del bilancio alcuni ratti sono stati sacrificati all'inizio del trattamento, per avere la determinazione dei punti zero (N0), prima del protocollo sperimentale. In seguito al sacrificio dei ratti le carcasse sono state pesate ed autoclavate per 50 minuti, tagliate in piccoli pezzi ed infine omogenizzate con acqua (volume finale uguale a due volte il peso della carcassa), mediante l'utilizzo di un omogenizzatore Politron. Successivamente aliquote dell'omogenato sono state utilizzate per analizzare la composizione corporea, misurando:

- il contenuto lipidico, secondo il metodo di Folch<sup>134</sup>;
- il contenuto di acqua, con un processo di essiccamento della carcassa;
- il contenuto energetico, con l'uso di una bomba calorimetria;

Il contenuto proteico è stato ottenuto dalla differenza tra il contenuto energetico totale corporeo e il contenuto energetico dei lipidi corporeo. Durante tutto il periodo del trattamento dietetico è stato controllata giornalmente anche la quantità di cibo introdotta dai ratti, per poter così calcolare l'energia introdotta sottoforma di cibo durante l'intero periodo sperimentale, cioè l'introito calorico lordo, considerando il valore energetico della dieta standard di laboratorio (15,88 KJ/g) e quello delle diete iperlipidiche (20 kJ/g) con cui sono stati nutriti gli animali. Tali valori sono stati ottenuti, come sopra riportato, mediante l'utilizzo della bomba calorimetria (calorimetro adiabatico di Parr). L'utilizzo di tale strumento ha consentito la determinazione del contenuto energetico anche delle feci, raccolte durante l'intero periodo sperimentale, e della carcassa. Infatti da aliquote di omogenato dell'animale essiccato in stufa 60 °C per 48 ore, è stato possibile determinare il contenuto energetico della carcassa. Partendo da queste misure sono stati calcolati:

◆ il *guadagno di peso corporeo*, per differenza tra il peso corporeo misurato alla fine del trattamento e quello misurato all'inizio del periodo sperimentale ;

- ◆ il *guadagno lipidico*, per differenza tra il contenuto lipidico calcolato alla fine del trattamento, mediante il metodo di Folch, e quello calcolato all'inizio;
- ◆ il *guadagno proteico*, per differenza tra il contenuto proteico calcolato alla fine del trattamento e quello calcolato all'inizio;
- ◆ il *guadagno energetico* ottenuto dalla differenza tra il contenuto energetico corporeo finale e il contenuto energetico corporeo iniziale;
- ◆ l'*energia metabolizzabile (ME)* introdotta, calcolata sottraendo all'introito calorico lordo sia il contenuto energetico delle feci che l'energia persa con le urine (circa il 4%);
- ◆ l'*efficienza energetica*, ottenuta dal rapporto percentuale tra il guadagno energetico e l'energia metabolizzabile assunta.
  - ◆ *l'efficienza di deposito dei lipidi*, ottenuta dal rapporto tra guadagno lipidico/energia metabolizzabile.
  - ◆ *il metabolismo basale*, inteso come la minima spesa energetica necessaria per mantenere l'organismo in vita. Per questa misura è stato utilizzato un metabolimetro a circuito aperto.

### **Determinazione del metabolismo corporeo**

Alla fine del periodo sperimentale la velocità metabolica a riposo (RMR) è stata misurata ai tre gruppi di ratti tra le 11:00 e le 11:30 di mattina, con un metabolimetro a circuito aperto, in una camera a 24°C. Ai ratti è stato permesso di adattarsi nella gabbia di misura per circa un'ora, e si è passati poi alla misura del metabolismo per almeno 10 minuti accertandosi che in tale periodo il ratto non si muovesse. Le misure di RMR sono state effettuate dopo 16 ore di digiuno, per eliminare l'effetto termico del cibo.

### **Misura del contenuto di acqua della carcassa.**

Il contenuto di acqua della carcassa è stato ottenuto distribuendo aliquote di omogenato in apposite vaschette; queste sono state pesate, poste in una stufa e fatte essiccare per 48 ore a 60°C. Una volta essiccate è stata calcolata la differenza del peso della vaschetta contenente l'omogenato prima e dopo l'essiccamento, e quindi si è calcolata la percentuale d'acqua corporea.

### **Misura del contenuto lipidico della carcassa.**

Il contenuto lipidico è stato calcolato mediante il metodo di Folch<sup>134</sup>, da aliquote di omogenato di carcassa, diluito 20 volte in una miscela cloroformio/metanolo (2:1), seguito da filtrazione; al filtrato ottenuto vengono aggiunti 0,2 volumi di NaCl 0,29% e dopo una agitazione vigorosa di 30 minuti e una centrifugazione a 1000 g per 20 minuti (21°C), si osserva la separazione di una fase acquosa superiore ed una fase lipidica inferiore. A questo punto la fase acquosa viene aspirata e



l'interfaccia con la fase lipidica viene lavata con una soluzione contenente cloroformio/metanolo/NaCl (3:48:47), allo scopo di eliminare i contaminanti non lipidici dall'estratto. Successivamente, mediante l'utilizzo dell'evaporatore rotante di Heidolph è stato possibile ottenere il peso dei lipidi per grammo di carcassa e considerando il coefficiente 39,2 kJ/g conoscere il contenuto lipidico in kJ di energia corporea depositata sotto forma di lipidi.

### **Misure del contenuto energetico della carcassa.**

IL contenuto energetico della carcassa è stato ottenuto, grazie all'utilizzo della bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico Parr) da campioni dell'omogenato essiccato ridotti in polvere e pressati in modo da ottenere delle pasticche di peso 200 mg. Per la misura ogni pasticca è posta su un piattello di platino, in contatto con un filo di nichel agganciato a due uncini di platino, attraverso cui è fatta passare corrente elettrica. Questo sistema è posto in un recipiente di acciaio (vaso di Dewar) circondato da un volume noto di acqua distillata, il tutto completamente separato dall'esterno da una intercapedine di materiale isolante. Nel recipiente di acciaio è compresso ossigeno alla pressione di 35 atm, per rendere possibile la combustione del campione. Il calore fornito dall'ossidazione dei substrati presenti nel campione fa innalzare la temperatura di un volume di acqua distillata noto, che circonda il recipiente di acciaio. Ogni misura può essere suddivisa in tre fasi:

1. una prima fase in cui viene dato alle varie parti del calorimetro il tempo di raggiungere l'equilibrio termico ( $T_i$ );
2. una seconda fase in cui il campione è ossidato e nel sistema si ha una variazione di temperatura ( $T_f$ );
3. una terza fase in cui il calorimetro raggiunge nuovamente l'equilibrio termico.

Attraverso il registratore della temperatura collegato al termometro immerso in acqua, viene misurato l'innalzamento termico ( $\Delta T$ ), come differenza tra la temperatura massima alla fine della combustione ( $T_f$ ) e quella prima della combustione ( $T_i$ ). La capacità termica  $C$  dell'apparecchio è stata determinata utilizzando come standard l'acido benzoico. La variazione di calore ( $Q$ ) viene calcolata moltiplicando la variazione di temperatura ( $\Delta T$ ) per la capacità termica ( $C$ ) della bomba calorimetrica,  $Q = \Delta T \times C$ , così è stato possibile poi calcolare il calore di combustione del campione  $\Delta H$  espresso in calorie per grammo, il  $\Delta H = (Q-f)/m$  dove,  $m$  = massa del campione di carcassa in esame,  $f$  = correzione per il filo fusibile in calorie. Il valore del contenuto energetico della carcassa essiccata così ottenuto viene poi corretto per il contenuto di acqua della carcassa, per ottenere il valore effettivo per grammo di carcassa.

### **Misure del contenuto proteico della carcassa.**

Infine il contenuto proteico della carcassa è stato ottenuto sottraendo il contenuto energetico dei lipidi dal contenuto energetico corporeo totale, utilizzando il coefficiente di 23.5 KJ/g, cioè sapendo che un grammo di proteine libera 23,5 kJ di energia, è stato possibile determinare i grammi di proteine per grammi di carcassa.

### **Determinazione dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi, NEFA e ALT**

Durante il sacrificio sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena cava inferiore, sottoposte a centrifugazione alla temperatura di 20°C per 10 minuti alla velocità di 500rpm, per separare il siero più leggero dal pellet, e conservati ad una temperatura di -20°C, per poi essere utilizzati per la determinazione necessarie. I NEFA sono stati valutati mediante un metodo enzimatico colorimetrico usando un kit commerciale (Roche Diagnostic, Italia per gli FFA e Pokler, Italia, per il glucosio), mentre i livelli di trigliceridi e colesterolo sono stati valutati mediante l'invio dei sieri ad un laboratorio di analisi esterne.

### **Glicemia ed insulinemia ad un carico orale di glucosio.**

Per poter costruire la curva da carico del glucosio, i ratti sono stati sottoposti ad un digiuno per 16 ore, avendo, però, libero accesso all'acqua. Il glucosio (3g/Kg di peso corporeo)<sup>136</sup> è stato somministrato per via orale sotto forma di soluzione acquosa, mediante una siringa sprovvista di ago. Il prelievo del sangue, e quindi, la determinazione della glicemia e dell'insulinemia (a digiuno), è stato effettuato al tempo zero, per valutare il valore basale di questi due parametri, e successivamente ad intervalli regolari di 30 minuti per tre ore, dopo aver somministrato il carico orale di glucosio. Il prelievo del sangue viene fatto eseguendo un piccolo taglio all'apice della coda dell'animale e la concentrazione ematica di glucosio viene determinata mediante l'utilizzo di un glucometro. Il sangue, poi, è stato raccolto e centrifugato alla velocità di 1500 rpm per 15 minuti al fine di separare il siero, rappresentato dal surnatante, dalla parte corpuscolata del sangue, cioè, il pellet. I campioni di siero sono stati in seguito utilizzati per la determinazione dei livelli serici di insulina.

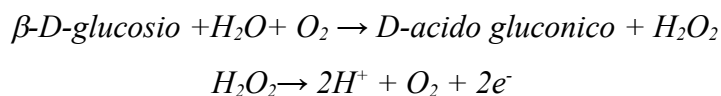
### **Dosaggio del glucosio: principio e metodo utilizzati.**

Il dosaggio del glucosio è stato effettuato utilizzando il glucometro ASCENSIA BRIO, con il quale sono stati forniti le strisce reattive per la misurazione della glicemia ed un chip di programmazione, nonché una striscia di controllo che consente di effettuare, in qualunque momento, un test per verificare il corretto funzionamento dello strumento. In seguito all'inserimento della striscia reattiva e all'applicazione della goccia di sangue sull'area di

applicazione del campione, compare il valore della glicemia sul display in mg/dL. Il test si basa sulla misurazione della corrente elettrica generata dalla reazione del glucosio con i reagenti presenti sull'elettrodo della striscia reattiva. Ogni cm<sup>2</sup> di reagente contiene i componenti nelle concentrazioni di seguito elencate:

∞	Glucosio ossidasi	4.2%
∞	Trasportatore di elettroni	29.5%
∞	Protettore di enzimi	4.6%
∞	Ingredienti non reattivi	61.7%

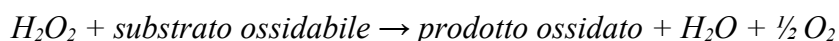
Il sangue penetra all'interno dell'area di applicazione del campione della striscia reattiva per azione capillare. Il campione reagisce con la glucosio ossidasi, stimolando l'ossidazione del glucosio nel sangue. L'enzima glucosio ossidasi è specifico per il glucosio e non reagisce con altri zuccheri, come il maltosio ed il galattosio, eventualmente presenti nel sangue. L'ossidazione del glucosio, catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi produce perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Il perossido di idrogeno liberato, si ossida in corrispondenza dell'elettrodo e produce una corrente di elettroni proporzionale alla concentrazione di glucosio nel campione. La reazione catalizzata dell'enzima in questione è la seguente:



#### **Dosaggio ELISA di insulina, leptina, adiponectina e TNF-alfa.**

Il dosaggio ELISA utilizzato è del tipo immunoenzimatico a sandwich. Il kit è costituito da: una micropiastra di 96 pozzetti con un anticorpo anti-antigene ancorato sulla parete interna di ogni pozzetto, standards di antigene a differenti concentrazioni, una soluzione concentrata di anticorpo anti-antigene coniugato con perossidasi di rafano, una soluzione cromogeno di tetrametilbenzidina (TMB, substrato dell'enzima coniugato) in buffer citrato con perossido idrogeno, una soluzione di lavaggio e da una soluzione per bloccare la reazione, generalmente contenente acido solforico 0.5M. Agli standards, controlli e campioni, pipettati negli appositi pozzetti, viene aggiunta una soluzione di anticorpo anti-antigene coniugato all'enzima perossidasi di rafano. La piastra viene incubata a 25°C per 2 ore per consentire la formazione del complesso antigene-anticorpo. L'antigene si lega durante tale periodo con uno dei suoi epitopi all'anticorpo immobilizzato sulle pareti del pozzetto e con un altro epitopo all'anticorpo marcato e coniugato all'enzima. Dopodiché, per eliminare i residui di antigene e di anticorpo non legato, sono stati effettuati dei lavaggi in modo da evitare una sovrastima della misura a causa della presenza in eccesso dell'anticorpo. A questo punto è stato aggiunto il cromogeno TMB ed è stata incubata la piastra per 15 minuti a temperatura ambiente. Durante l'incubazione, l'enzima provvisto del suo substrato

ha potuto catalizzare la reazione di ossidazione della tetrametilbenzidina con formazione di un composto colorato. La reazione catalizzata dall'enzima in questione è la seguente:



L'aggiunta nei pozzetti della soluzione contenente il substrato dell'enzima coniugato all'anticorpo marcato ha come scopo quello di andare a dosare l'enzima mediante l'assorbanza del suo prodotto e di ricavare indirettamente da tale dosaggio la concentrazione dell'anticorpo marcato e, quindi, quello dell'antigene. Trascorsi i 15 minuti di incubazione, è stata aggiunta la soluzione di acido solforico ad ogni pozzetto in modo da far variare il pH e bloccare la reazione. Bloccata la reazione della perossidasi è stata posta la piastra in uno spettrofotometro e sono stati letti i valori di assorbanza a 450 nm. Il dosaggio dell'enzima da cui si può indirettamente ricavare la concentrazione dell'insulina nei sieri, richiede di costruire una retta di taratura. E' stata calcolata la media dell'assorbanza per ogni standard e campione. E' stata costruita una retta di taratura, plottando il logaritmo della media dell'assorbanza sull'asse delle x in funzione del logaritmo della concentrazione degli standards sull'asse delle y, applicando una regressione lineare. Sono state calcolate le concentrazioni di antigene dei campioni in esame in base alla loro assorbanza riportata sulla retta di taratura.

### **Analisi delle proteine mediante Western Blot.**

Il Western blot, o immunorivelazione, è una tecnica immunochimica che permette di valutare l'espressione quantitativa di una determinata proteina e la sua localizzazione in una miscela di proteine precedentemente sottoposte ad una elettroforesi su gel di poliacrilammide che è stata eseguita secondo il metodo di Laemmli per la realizzazione di gel discontinui<sup>137</sup>.

Questa metodica prevede la preparazione di due tipi di gel:

- stacking gel (per il caricamento dei campioni);
- separating gel (per la separazione delle proteine).

La preparazione dello stacking gel è stata eseguita utilizzando:

TRIS 0.125 M, SDS 0,1 % pH 6.8 e miscela di acrilammide 4%, TEMED 0,1%, ammonio persolfato 0.05%. Il separating gel viene preparato utilizzando: TRIS 0.375 M, SDS 0,1 % pH 8.8, miscela di acrilammide 13%, TEMED 0,1%, ammonio persolfato 0.05%. La preparazione di questi gel prevede che venga versata prima la miscela di separating gel per la separazione delle proteine, e, dopo la sua polimerizzazione, si effettua il versamento della miscela di stacking gel per il caricamento dei campioni. I campioni proteici (30 µg di lisato), caricati nei pozzetti, sono precedentemente diluiti in una soluzione costituita da: TRIS 50 mM, DTT 10 mM, Glicerolo 10%, SDS 2 %, Blu di bromofenolo 0.001% pH 6.8. Prima di essere caricati sul gel i campioni vengono riscaldati a 95° C per 5 minuti. La corsa viene effettuata a 200V per 1h, utilizzando come tampone

una soluzione costituita da: TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1 % pH 8.6. Dopo la corsa elettroforetica, il materiale proteico viene trasferito su una membrana di nitrocellulosa in un tampone di trasferimento contenente: TRIS 16.5mM, glicina 150 mM pH 8.3, metanolo 20% utilizzando un voltaggio di 100 V per 45 minuti. Al termine del trasferimento, la membrana è asciugata all'aria per 15 minuti al fine di rimuovere il metanolo. La membrana è, in seguito, lavata per 5 minuti nel tampone TBS-tween composto da PBS 1x, %. (che si ottiene diluendo 1:10 il PBS 10X: NaCl 1.37M, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18mM), tween 20. Per ottenere il blocco di siti aspecifici tra la nitrocellulosa e le proteine, la membrana viene incubata a temperatura ambiente per 1 ora in una soluzione di TBS-tween e agente bloccante (latte 5%). Successivamente il filtro viene incubato tutta la notte a 4°C con 1µg/ml di anticorpo primario (anticorpo policlonale rabbi anti-Human Akt; Chemicon International, Inc) nel tampone che contiene TBS-tween-latte 2% per la forma totale e BSA al 5% per la forma fosforilata. In seguito per allontanare l'anticorpo legato in modo aspecifico, la membrana viene sottoposta a 4 lavaggi di 15 minuti ognuno per rilevare la proteina totale, mentre 3 lavaggi di 5 minuti ognuno per rilevare la forma fosforilata della proteina stessa col tampone TBS-tween. Terminati i lavaggi, il filtro viene incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario appropriato (Goat anti-rabbit), coniugato con l'enzima perossidasi (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) diluito 1:4000 in TBS-tween e latte al 7% per la forma fosforilata e latte al 2% per la forma totale. Anche questa volta, per allontanare l'anticorpo secondario legato in modo aspecifico, vengono effettuati gli stessi lavaggi. Per rilevare il segnale della proteina viene utilizzata la reazione di chemiluminescenza effettuata con un mix di incubazione composto da 5 ml di luminolo 1,25 mM, 50 µl di acido cumarico 6.8.mM, 15 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. La membrana viene, quindi, incubata con questo mix per 1 minuto e successivamente viene esposta con una lastra per autoradiografia in cassette radiografiche a temperatura ambiente per 45-50 minuti. Dopodichè è possibile sviluppare la lastra sulla quale si osservano delle bande corrispondenti alla proteina di interesse che viene quantizzata mediante un software di densitometria.

### **Determinazione del contenuto epatico e muscolare di trigliceridi**

L'estrazione dei lipidi da fegato e muscolo è stata effettuata in accordo con il metodo di Folch<sup>134</sup>, precedentemente descritto. I trigliceridi sono stati determinati nell'estratto lipidico, mediante l'utilizzo di un Kit commerciale colorimetrico.

### **ANALISI ISTOLOGICA**

Il fegato è stato analizzato istochimicamente per valutare il contenuto di grasso. Al momento del sacrificio sezioni di fegato sono state fissate in Tissue Tek e congelate. Successivamente sezioni di

10  $\mu\text{m}$  sono state inviate ad un laboratorio di analisi istologiche dove sono state colorate con il Sudan Black per la rilevazione del grasso.

### **Preparazione dei campioni**

Pezzetti di tessuto muscolare prelevati durante il sacrificio, sono stati fissati in Carnoy preparato con 60ml di alcool etilico 100°, 30 ml di cloroformio, 10 ml di Acido Acetico. Dopo alcool 100° i pezzi sono passati in xilolo I e dopo 15 minuti in xilolo II, in seguito messi in xilolo paraffina, per togliere i residui di xilolo dal pezzo, successivamente sono spostati in paraffina I, mantenuti ad una temperatura di 58° C nella stufa e dopo un'ora in paraffina II, si mantengono sotto vuoto spinto, per una notte alla temperatura di 58°C.

### **Preparazione del tessuto per la microscopia ottica**

I pezzi inclusi in Carnoy dopo una notte sotto vuoto spinto, sono inclusi in blocchetti di paraffina paraplast, per essere affettati con spessore di 5 $\mu\text{m}$  al microtomo. Alcune sezioni ottenute sono state colorate con l'emallume eosina, per osservare la struttura istologica del tessuto e altre sezioni sottoposte a tecniche di immunocitochimica come la PAS, per evidenziare la presenza di glicogeno nei tessuti.

### **PAS (periodic acid Schiff), tecniche per rilevare il glicogeno**

Sezioni di muscolo sono state sottoposte alla reazione istochimica con acido periodico e reattivo di Schiff (PAS) per rilevare la presenza del glicogeno. La PAS è una reazione che evidenzia i polisaccaridi neutri (glicogeno, mucina). I gruppi ossidrilici (-OH) degli zuccheri sono ossidati dall'acido periodico con la formazione di gruppi aldeidici (-CHO). Il reattivo di Schiff (che è incolore) reagisce con tali gruppi virando a rosso-magenta. Il procedimento segue vari step: la sparaffinatura delle sezioni in concentrazioni decrescenti di alcool etilico; l'ossidazione con acido periodico 0,5% in termostato, per un tempo variabile da 2 a 15 minuti; lavaggio in acqua corrente e poi in acqua distillata. Seguono 10 minuti di incubazione con Schiff e nel frattempo, si prepara il post-Schiff con parti uguali di Metabisolfito di sodio e HCl 0,1N. con il post-Schiff si effettuano 3 lavaggi di 2 minuti, quindi lavaggio con acqua, colorazione dei nuclei con emallume, disidratazione, montaggio dei vetrini.

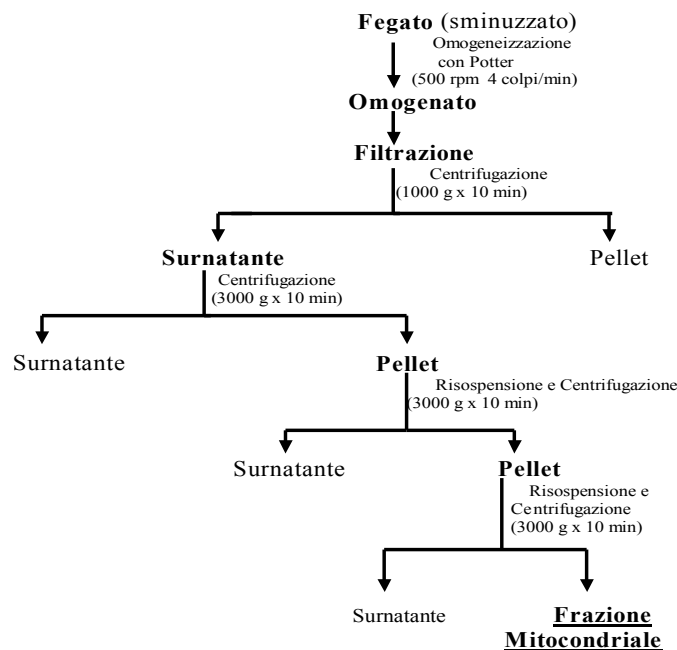
## **ANALISI DEI PARAMETRI MITOCONDRIALI**

### **Preparazione dei mitocondri da fegato.**

Subito dopo il sacrificio, il fegato è stato prelevato, finemente sminuzzato ed omogeneizzato in una soluzione contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM e

0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi (BSA) a pH 7.4 (diluizione 1:10), in un omogenizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) settato a 500 rpm (4 colpi/min). L'omogenato è stato, poi, filtrato attraverso delle garze sterili e privato di cellule intatte e nuclei attraverso una centrifugazione a 1000g per 10 minuti; i surnatanti ottenuti sono stati di nuovo centrifugati a 3000g per 10 minuti. Il pellet mitocondriale così ottenuto è stato lavato due volte ed infine risospeso in un tampone contenente LiCl 80 mM, HEPES 50 mM, Tris P 5 mM, EGTA 1 mM, 0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi a pH 7.0. Caratterizzazioni microscopiche ed enzimatiche hanno mostrato che la nostra procedura di isolamento (centrifugazione a 3000 g per 10 minuti) fornisce una frazione cellulare che è costituita essenzialmente da mitocondri<sup>138</sup>. I mitocondri isolati sono stati usati per misurare la velocità dell'ossidazione degli acidi grassi, l'efficienza mitocondriale e il danno ossidativo, quest'ultimo mediante il dosaggio dell'attività dell'aconitasi, un enzima sensibile al danno da radicali liberi e, per tale, utilizzato come indice di stress ossidativo.

#### Metodica di isolamento dei mitocondri di fegato



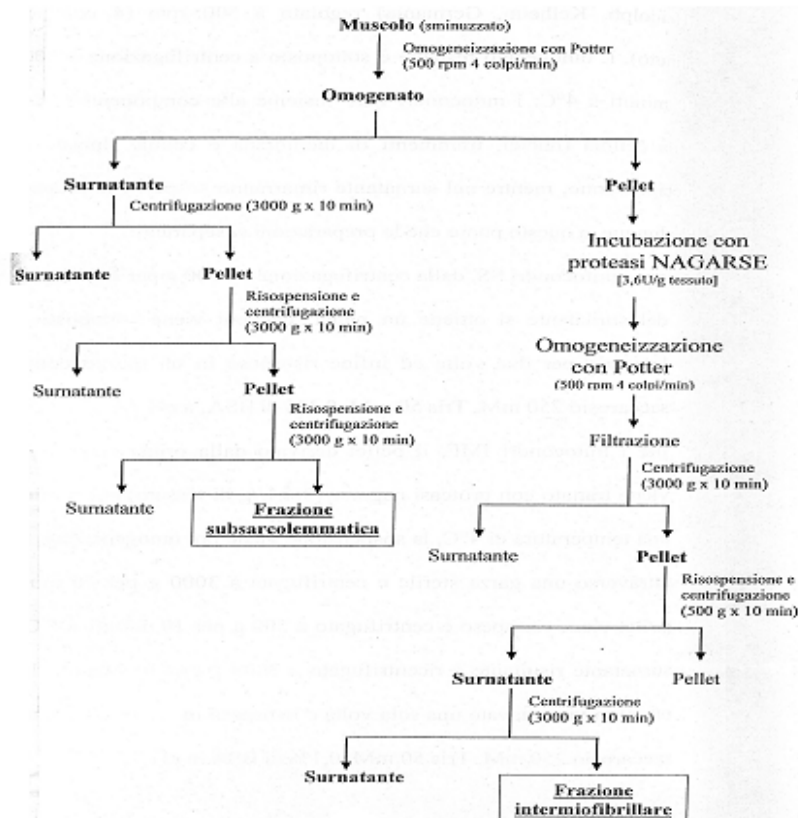
#### **Preparazione dei mitocondri da muscolo.**

Durante il sacrificio sono stati prelevati i muscoli scheletrici: gastro e tibiale, immersi in una soluzione di sali con pH finale di 7,5: KCl 100 mM, Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM in cui viene precedentemente sciolto BSA (albumina di siero bovino) 0,1%, che lega gli acidi grassi circolanti. Il muscolo viene immediatamente ripulito dal tessuto connettivo e mantenuto in ghiaccio per bloccare l'attività enzimatica. Successivamente viene sminuzzato e omogeneizzato nella stessa soluzione con Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) a 500 rpm per 1 minuto. L'omogenato risultante viene centrifugato a 500 g per 10 minuti a 4°C e dal

surnatante si ottengono i mitocondri sub-sarcolemmatici (SS) mentre dal pellet, contenente pezzi di membrana, cellule intatte, nuclei e le miofibrille che sono rimaste integre, verranno estratti i mitocondri intermiofibrillari (IMF). La metodica per i due tipi di mitocondri si differenzia :

- per i mitocondri SS, il surnatante viene centrifugato a 3000 g (5700 rpm) per 12 minuti a 4°C, si ottiene un pellet che viene sottoposto a due lavaggi identici e infine risospeso in una soluzione a pH 7,5 contenente: saccarosio 250 mM, Tris 50 mM, BSA0,1%.
- per i mitocondri IMF il pellet raccolto dalla prima centrifuga viene incubato con proteinasi nagarse (5,5 µL/g di tessuto) per 5 minuti, poi omogeneizzato a 500 rpm per 1 minuto, filtrato con garza sterile e centrifugato a 3000 x g per 10 minuti a 4°C. Il pellet raccolto è risospeso con soluzione iniziale, omogeneizzato per 1 minuto e centrifugato a 500 g (2000 rpm) per 10 minuti a 4°C. Da questo step si recupera il surnatante e si centrifuga a 3000 g ( 5700 rpm) per 10 minuti a 4°C. Il pellet è risospeso e centrifugato un'ultima volta a 3000 g ( 5700 rpm) per 10 minuti a 4°C ed infine risospeso in una soluzione di saccarosio 250 mM, Tris 50 m, BSA0,1%, a pH 7,5.

### Metodica di isolamento dei mitocondri da muscolo



### **Determinazione della massa proteica mitocondriale e misura dell'attività della citrato sintasi**

La misura della massa proteica mitocondriale è stata determinata dalla misura dell'attività di un enzima marker mitocondriale, la citrato sintasi, determinata sia negli omogenati, sia nei mitocondri isolati dal muscolo scheletrico La citrato sintasi è stata determinata in accordo con Srere<sup>139</sup>. La



misura si realizza incubando, alla temperatura di 30°C, i mitocondri o l'omogenato, diluiti 1:10 in Triton 0,5%, in un buffer costituito da DTNB (1 mM), Acetil-CoA (10 mM), Ossalacetato (10 mM). Inoltre la misura è realizzata in presenza del Triton 0,5%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare. La determinazione dell'attività della citrato sintasi è stata effettuata spettrofotometricamente monitorando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 412 nm ogni 30 secondi per tre minuti. L'attività della citrato sintasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}$ . Quindi, dalla media dei  $\Delta A \text{ min}^{-1}$  per ogni campione, si calcola la molarità del CoA formatosi al minuto, corrispondente all'attività della citrato sintasi, per i mg di proteine mitocondriali o i g di tessuto incubati.

### **Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati.**

I mitocondri sono stati utilizzati per valutare il consumo d'ossigeno polarograficamente, mediante l'utilizzo dell'elettrodo di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Oh, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e da un anodo d'argento, entrambi immersi in una soluzione di KCl (0,1 M) e separati dalla soluzione in esame, tramite una membrana di teflon, permeabile solo all'ossigeno. Quest'ultimo diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. In tal modo, l'ossigeno al catodo si riduce e origina una corrente proporzionale all'attività dell'ossigeno presente in soluzione, nel momento in cui è applicato agli elettrodi un voltaggio di 0.5 – 0.8 volts. All'anodo, infatti, sono prodotti quattro elettroni a loro volta utilizzati per ridurre una molecola di ossigeno al catodo. La tensione di ossigeno al catodo, quindi, tende ad azzerarsi promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. L'elettrodo di Clark consente, quindi, di misurare i rapidi cambiamenti che si riscontrano nell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari. Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando, per il fegato, un mezzo di incubazione contenente KCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 mM, PH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA. Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri sono indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori per la  $\beta$ -ossidazione, quali la palmitoil-carnitina (40 $\mu\text{M}$ ) e malato (2,5 mM). Le misure sono state effettuate in assenza (Stato 4 o stato non fosforilante della respirazione) o in presenza (Stato 3 o stato fosforilante della respirazione) di 0,6 mM di ADP. In tal modo è stato possibile misurare il Rapporto del Controllo Respiratorio (RCR, velocità dello stato3 diviso velocità stato 4) in accordo con il metodo di Estabrook<sup>140</sup>, e pertanto verificare l'integrità dei mitocondri isolati. Il consumo di ossigeno è espresso in ng atomi di O al minuto per mg di proteine mitocondriali.

### **Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati**

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato utilizzando la lettura spettrofotometrica, ottenuta mediante uno spettrofotometro (JASCO) a doppia lunghezza d'onda, della safranina, un colorante che in virtù della sua carica elettrica si lega alla membrana mitocondriale in maniera proporzionale al potenziale<sup>141</sup>. Lo spettrofotometro adoperato è programmato in modo tale che la lunghezza d'onda di riferimento (533 nm) coincida con il punto isosbestico della safranina, cioè quel punto dello spettro di assorbimento in cui la molecola di colorante mostra la stessa assorbanza sia nello stato legato che in quello non legato alla membrana mitocondriale. La lunghezza d'onda di lettura è invece 511 nm. Per risalire al potenziale di membrana dai valori dell'assorbanza, si effettuano misure dell'assorbanza della safranina in presenza di valinomicina 3  $\mu\text{M}$ , un trasportatore specifico del potassio, e di quantità crescenti di KCl necessarie ad alterare la concentrazione esterna di potassio nel range 0.1 - 20 mM. A questo punto si costruisce una retta di taratura che mette in relazione le variazioni di assorbanza al logaritmo della concentrazione di potassio esterna, e che, quindi, consente di risalire alla concentrazione extra ed intramitocondriale di tale ione. Per estrapolazione da tale retta, infatti, si ricava la concentrazione interna di potassio, considerando che quando la variazione di assorbanza della safranina è nulla anche il potenziale di membrana è pari a zero e quindi, in base all'equazione di Nernst, le concentrazioni di potassio esterna ed interna si equivalgono. Ottenute le concentrazioni di potassio esterna ed interna alla membrana mitocondriale, mediante l'equazione di Nernst ( $\Delta\Psi = 61 \text{ mV} \times \log ([\text{K}^+]_{\text{in}} / [\text{K}^+]_{\text{out}})$ ), si può calcolare il potenziale di membrana dei mitocondri e realizzare un grafico per mettere in relazione i valori di potenziale di membrana con l'assorbanza della safranina. A questo punto dalla curva si potranno ottenere i valori del potenziale di membrana mitocondriale nelle varie condizioni sperimentali utilizzate.

### **Misura della conduttanza protonica basale**

L'applicazione del metodo di Brand ha consentito la valutazione della conduttanza protonica basale dei mitocondri isolati. Questa metodica consiste in una titolazione della respirazione con il succinato a partire dallo Stato 4 della respirazione, in presenza di oligomicina, con quantità crescenti di malonato, un inibitore competitivo del secondo complesso della catena respiratoria, la succinico deidrogenasi, e permette di determinare le variazioni del potenziale di membrana associate alle variazioni del consumo di ossigeno ottenute in queste condizioni. Per poter determinare sperimentalmente la conduttanza protonica basale si adopera l'oligomicina, un antibiotico capace di abolire il flusso di protoni attraverso l'ATP sintetasi, prevenendo il passaggio dei protoni attraverso la subunità Fo. In questo modo si fa sì che il flusso protonico valutato dipenda solo dalla conduttanza protonica basale. Per una determinazione accurata della conduttanza protonica basale può essere valutata la risposta cinetica del potenziale di membrana

mitocondriale a variazioni del consumo di ossigeno, ottenute diminuendo progressivamente le reazioni di ossidazione del succinato del mitocondrio nello Stato 4 con un inibitore della catena di trasporto degli elettroni, quale il malonato. Al diminuire della velocità di ossidazione del substrato diminuisce la velocità di pompaggio di protoni all'esterno e quindi anche il valore del potenziale di membrana. La variazione del consumo di ossigeno in funzione del potenziale di membrana, in mitocondri che respirano in assenza di fosforilazione, ci permette di valutare la variazione cinetica della conduttanza protonica in funzione del potenziale di membrana. Infatti le curve di titolazione così ottenute sono una misura indiretta della conduttanza protonica perché, in stato stazionario, la velocità del consumo di ossigeno (cioè il flusso protonico in uscita) nei mitocondri in assenza di fosforilazione equivale al flusso protonico in entrata dovuto alla conduttanza protonica. In effetti il potenziale di membrana ( $\Delta p$ ) è costituito da due componenti:

- ∞ la differenza di potenziale elettrico ai capi della membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi$ );
- ∞ la differenza di potenziale chimico protonico ( $\Delta pH$ ).

Sperimentalmente è possibile abolire il  $\Delta pH$  facendo in modo che il  $\Delta p$  risulti uguale al  $\Delta\Psi$  a questo scopo si utilizza la nigericina, uno scambiatore  $H^+/K^+$ , in grado di annullare la differenza di pH a livello della membrana mitocondriale interna, e di conseguenza abolire la differenza di potenziale chimico, trasformandola in differenza di potenziale. Le misure sono state effettuate a 30°C in una soluzione contenente per il fegato LiCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, Tris- $PO_4$  5 mM, pH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA libera da acidi grassi. Per ogni misura a questa soluzione è stato aggiunto succinato 10 mM, rotenone 3.75  $\mu M$ , oligomicina 2 $\mu g/ml$ , safranina (83.3 nmol/mg) e nigericina (80 ng/ml).

La titolazione dello Stato 4 della respirazione è stata eseguita mediante sequenziali aggiunte di malonato a concentrazioni crescenti fino a 5 mM.

### **Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi**

Per avere informazioni sul disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stata anche effettuata la determinazione della cinetica della *conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi* in analogia a quella effettuata per la conduttanza protonica basale. Tale determinazione è stata ottenuta titolando la respirazione ed il potenziale di membrana in presenza di oligomicina, succinato e palmitato con quantità crescenti di malonato fino a 0.6 mM per i mitocondri epatici. Le concentrazioni di palmitato da aggiungere sono state calcolate tenendo conto dell'interazione tra gli acidi a lunga catena e l'albumina<sup>142</sup>. Le concentrazioni di acido grasso che effettivamente si aggiungono nella camera di misura sono di 85  $\mu M$ .

### **Determinazione dell'attività totale della Carnitina-palmitoil- transferasi**

L'attività totale della Carnitina-Palmitoil-Transferasi (CPT) è stata misurata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 412 nm, seguendo la cinetica della produzione di CoA-SH carnitina-dipendente in presenza di acido 5,5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB) usando palmitoil-CoA come substrato. Il metodo spettrofotometrico è basato sul rilascio di CoA dai tioesteri dell'Acil-CoA. Ciò induce la riduzione del DTNB ad acido 5-tio-2-nitrobenzoico che determinerà lo sviluppo di un colore giallo. La reazione è stata misurata seguendo la metodica di Alexon e Nedergard<sup>143</sup>, incubando i mitocondri in: 75 mM di Hepes (pH 7.5), 10 mM di EDTA, 10 mg/ml di BSA, 2.5 ml di Palmitoil-CoA, 3 mM di DTNB. Tutte le provette contenenti le soluzioni sono state incubate per 3 minuti a 35°C prima di aggiungere Palmitoil-CoA e carnitina. La concentrazione dei tioli rilasciati è stata calcolata dal coefficiente di estinzione molare,  $E_{412nm} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  dopo aver corretto per la reazione aspecifica dei gruppi sulfidrilici dell'enzima con DTNB e per l'idrolisi non specifica della Palmitoil-CoA.

### **Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale**

Il dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare "in vivo" i danni prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche<sup>144</sup>. Infatti l'aconitasi è un enzima particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali dell'ossigeno<sup>145-146</sup>, per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi nel suo sito attivo, un cluster [4Fe-4S], che è il principale bersaglio dei radicali liberi. Il meccanismo di inattivazione dell'aconitasi da parte dei radicali liberi è il rilascio di ferro dal cluster [4Fe-4S]. L'aconitasi è un enzima del ciclo di Krebs, che catalizza la conversione reversibile di acido citrico in isocitrico, che viene poi ossidato dalla isocitrico deidrogenasi ad  $\alpha$ -chetoglutarato, con formazione di NADP ridotto (NADPH). Il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm dovuto alla formazione di NADPH. I campioni sono stati incubati a 25°C in un buffer costituito da Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 e MnCl<sub>2</sub> 0,6 mM, NADP<sup>+</sup> 0,2 mM, sodio-citrato 30 mM e 2 U/ml di isocitrico deidrogenasi e la formazione di NADPH è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm a 25°C. La misura è stata realizzata in presenza di Triton 1%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare. L'attività dell'aconitasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  del NADPH,  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Il livello dell'attività di questo enzima, misurata nell'estratto mitocondriale, eguaglia l'aconitasi attiva (livello basale). L'aconitasi inibita dai ROS è stata riattivata affinché l'attività totale potesse essere misurata mediante l'incubazione degli estratti mitocondriali in un mezzo contenente ditiotreitolo (DTT) 50 mM, Na<sub>2</sub>S 0,2 mM e solfato ammonio ferroso 0,2 mM.

## **ANALISI STATISTICHE**

I dati ottenuti sono stati riportati come le medie  $\pm$  errore standard delle medie (ES) di cinque differenti ratti. Le analisi statistiche sono state compiute usando l'analisi della varianza ANOVA ad una via. Il confronto tra i singoli gruppi è stato fatto tramite il Newmann-Keuls. Il livello minimo di significatività scelto è stato  $P < 0,05$ . Tutte le analisi sono state compiute usando il programma Graphpad Prism. (Graphpad software inc., San Diego, CA,USA)

## RISULTATI.

### **Bilancio energetico, composizione corporea e livelli serici di trigliceridi, colesterolo, NEFA, leptina, adiponectina, TNF- $\alpha$ e ALT.**

Nella tabella 1 sono riportati i dati sul peso corporeo iniziale e finale, sul guadagno di peso, sulla composizione corporea e sul contenuto energetico dei tre gruppi di ratti. I risultati mostrano che dopo 6 settimane di trattamento i due gruppi di ratti alimentati con le due diverse diete iperlipidiche, pur introducendo la stessa quantità di energia metabolizzabile, mostrano un differente guadagno di peso, infatti i ratti alimentati con diete in lardo mostrano un incremento del 56 % rispetto agli N, mentre nei ratti alimentati con olio di pesce tale incremento è solo del 23 %. Per quanto riguarda il contenuto energetico corporeo, si osserva un aumento significativo nei ratti L del 25% rispetto agli N, mentre non si osservano variazioni significative nei ratti F rispetto ai ratti N. Per quanto riguarda la composizione corporea alla fine delle 6 settimane di trattamento, si osservano variazioni significative sia per il contenuto di acqua che di lipidi corporei. Il contenuto di acqua corporea diminuisce significativamente del 15% nei ratti L rispetto ai ratti N, mentre nei riguardi di questo parametro i ratti F non mostrano variazioni significative rispetto ai ratti N. Il contenuto lipidico subisce un significativo incremento del 45% nei ratti L rispetto ai ratti N, mentre nei ratti F aumenta solo del 25% rispetto ai ratti N. I ratti F mostrano rispetto ai ratti L un decremento significativo del contenuto lipidico del 38%. Il contenuto proteico, invece, non presenta variazioni significative tra i tre gruppi di ratti. Per quanto riguarda il bilancio energetico, sono stati valutati parametri quali: il guadagno energetico corporeo, il guadagno lipidico, l'energia metabolizzabile, la spesa energetica e l'efficienza energetica (tabella 2). Il guadagno energetico nelle 6 settimane di trattamento aumenta del 67% nei ratti L e del 27% nei ratti F rispetto ai ratti N. Il guadagno energetico dei ratti F è più basso del 68% rispetto ai ratti L. Il guadagno lipidico nelle 6 settimane di trattamento, è ovviamente maggiore nei ratti alimentati con dieta iperlipidica rispetto ai ratti alimentati con la dieta di controllo. Tale incremento del guadagno lipidico è però del 75% nei ratti L e del 54% nei ratti F rispetto ai ratti N. Quindi i ratti F hanno un guadagno lipidico minore dell'86% rispetto ai ratti L. Inoltre a parità di energia metabolizzabile introdotta nei due gruppi di ratti a dieta iperlipidica, superiore rispetto ai ratti di controllo, i ratti F presentano un aumento della spesa energetica che può spiegare il minore guadagno di peso osservabile in questi ratti rispetto ai ratti L. In aggiunta dai dati relativi al metabolismo basale, determinato mediante metabolimetro a circuito aperto, risulta che i ratti alimentati con dieta ricca in olio di pesce mostrano un metabolismo basale significativamente più alto sia rispetto ai ratti N che L. I ratti F ed L presentano un quoziente respiratorio inferiore rispetto agli N e conseguentemente mostrano un consumo di substrati energetici diversi rispetto agli stessi controlli. (Tabella 3) Da

questi primi risultati si può dunque concludere che la dieta iperlipidica con olio di pesce rispetto a quella con lardo porta ad una riduzione del guadagno di peso corporeo, del guadagno lipidico e dell'efficienza corporea ed un aumento della spesa energetica. Nella tabella 4 sono riportati i valori dei livelli sierici di colesterolo, trigliceridi NEFA, ALT, leptina, adiponectina, TNF- $\alpha$  e contenuto lipidico epatico. I dati mettono in evidenza che i livelli sierici di questi parametri, tranne l'adiponectina, nei ratti L sono significativamente più elevati rispetto a quelli degli N e che nei ratti F tali valori risultano significativamente ridotti se confrontati ai ratti L. L'adiponectina, invece, essendo inversamente proporzionale alla massa grassa, risulta diminuita nei ratti L sia rispetto agli N che agli F. Questi risultati dimostrano che l'assunzione di olio di pesce diminuisce anche nel nostro modello sperimentale i livelli sierici di colesterolo, trigliceridi e NEFA a conferma dell'effetto ipolipidemizzante degli acidi grassi omega-3. Anche il contenuto epatico di lipidi è raddoppiato nei ratti L rispetto agli N e diminuito negli F del 19% rispetto agli L. Inoltre i valori dell'ALT (alanina amminotransferasi), risultano significativamente più alti nei ratti L, se confrontati agli N, indice dunque di un maggiore danno epatico in tali ratti; mentre nei ratti F tale valore è significativamente più basso rispetto agli L. Questi due ultimi parametri indicano come la dieta con olio di pesce riduca l'insorgenza della steatosi epatica. In figura 1 sono riportate le foto dei fegati prelevati dai ratti al momento del sacrificio con le rispettive immagini delle analisi istologiche e il contenuto lipidico epatico. Dalle foto dei fegati si evince che i ratti alimentati con dieta iperlipidica (L), sia rispetto ai ratti alimentati con la dieta standard di laboratorio (N) che a quelli a dieta con omega 3, hanno un maggiore accumulo di grasso nel fegato. Il loro fegato, infatti, ha un colore più chiaro rispetto a quello degli altri due gruppi. Questi dati confermano che la dieta con olio di pesce è in grado di ridurre l'accumulo di lipidi epatici. Tali osservazioni sono avvalorate dai risultati ottenuti dall'analisi istologica delle sezioni di fegato, infatti tali sezioni mostrano la presenza di un maggior numero di goccioline lipidiche nei ratti L rispetto agli N, mentre le sezioni del fegato dei ratti F mostrano un numero di goccioline lipidiche ridotto rispetto ai ratti L.

### **Determinazione del grado di insulino-resistenza mediante valutazione della tolleranza orale al glucosio e del grado di fosforilazione della proteina chinasi B.**

I risultati riportati in tabella 5 indicano che i livelli sierici basali del glucosio sono più alti del 26% sia nei ratti L che F rispetto agli N mentre i livelli sierici basali di insulina aumentano del doppio solo nei ratti L rispetto agli N e nei ratti F si mantengono simili a quelli degli N. Questi dati si riflettono nell'indice HOMA che è significativamente più alto nei ratti L, mentre negli F si osservano livelli simili rispetto agli N, indicando un minor grado di insulino-resistenza. Per quanto riguarda la risposta della glicemia ad un carico orale di glucosio, nelle figura 2 e tabella 6 si

osserva che nei ratti L ed F i livelli di glicemia si mantengono più elevati nelle tre ore successive al carico orale di glucosio e presentano una più ampia area sotto la curva (AUC) rispetto ai ratti N. Invece per quanto riguarda la risposta dei livelli sierici di insulina al carico di glucosio, si nota che tali livelli si mantengono elevati e presentano un AUC maggiore nei ratti L rispetto ai ratti N ed F nelle tre ore successive al carico di glucosio. Da questi risultati si evince, quindi, che l'olio di pesce migliora la tolleranza al glucosio, poiché i ratti F secernono una minore quantità di insulina per riportare la glicemia a livelli basali. In figura 3 sono riportati i livelli di fosforilazione della chinasi PKB a livello del muscolo scheletrico. La fosforilazione dell'Akt insulino-indotta è diminuita nei ratti L rispetto ai ratti N, mentre nei ratti F è, comunque, diminuita rispetto ai ratti N, ma è aumentata rispetto ai ratti L. Da questi ultimi risultati si può concludere che nei ratti F la sensibilità all'insulina è maggiore rispetto ai ratti L.

## **Parametri mitocondriali**

### **Fegato**

Tenendo presente che variazioni nell'efficienza energetica corporea totale possano riflettere variazioni nell'efficienza energetica cellulare, ho ritenuto interessante valutare anche l'efficienza energetica a livello dei mitocondri che sono la centrale energetica della cellula. Ho quindi isolato i mitocondri epatici ed ho condotto diverse analisi. Nella tabella 7 sono riportati i dati relativi alla massa proteica mitocondriale come misura dell'attività della citrato sintasi. Dopo sei settimane di trattamento l'attività dell'enzima espressa per grammo di tessuto è risultata invariata negli omogenati dei fegati dei ratti N ed L mentre è aumentata nei ratti F. Per quanto riguarda l'attività dell'enzima a livello mitocondriale è risultata diminuita nei ratti L e invariata nei ratti F rispetto agli N. Infine ho determinato la massa proteica mitocondriale, data dal rapporto tra i valori dell'attività della citrato sintasi a livello mitocondriale e l'attività dell'enzima a livello dell'omogenato. I dati mostrano come in entrambi i gruppi di ratti a dieta iperlipidica, ci sia un simile aumento della massa proteica mitocondriale, rispetto ai ratti N, ma a parità di massa, l'attività dell'enzima a livello mitocondriale, risulta diminuita nei ratti L e conservata nei ratti F.

Nella figura 4 sono stati riportati i valori della respirazione nei mitocondri epatici durante lo stato 3. I dati mostrano che nei ratti L il consumo di ossigeno diminuisce significativamente rispetto ai controlli, mentre nei ratti F i valori sono significativamente più alti rispetto ai ratti L, ad indicare una maggiore funzionalità mitocondriale.

In figura 5a è riportata la velocità di *ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri epatici*. I risultati mettono in evidenza che la velocità respiratoria mitocondriale, in presenza di malato e palmitoil-carnitina, come substrati, è più alta nei ratti L e ancor più nei ratti F se paragonati ai ratti N rispettivamente del 25% e del 59%. In figura 5b sono riportati i valori relativi all'attività della CPT.



Tale valore è aumentato significativamente nei ratti L rispetto agli N del 42% ed è ulteriormente aumentato nei ratti F rispetto agli N del 70%. Questi dati mettono in evidenza che l'assunzione di olio di pesce incrementa non solo l'ossidazione, ma anche il trasporto degli acidi grassi nei mitocondri epatici. Nella figura 6a sono riportati i risultati della conduttanza protonica basale, come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni della respirazione nei mitocondri dei ratti N, L ed F in seguito alle 6 settimane di trattamento. La curva risultante dalla titolazione dello Stato 4 della respirazione in funzione del potenziale di membrana in assenza di fosforilazione ossidativa è una misura indiretta della conduttanza protonica, ossia della perdita protonica mitocondriale. La misura della conduttanza protonica basale, cioè in assenza di acidi grassi, ha evidenziato che per mantenere un certo potenziale di membrana, i mitocondri dei ratti F consumano più ossigeno rispetto agli N e agli L. Questi dati dimostrano quindi che nei ratti F la conduttanza protonica basale è maggiore rispetto ai ratti L ed N, per cui si riscontra una minore efficienza mitocondriale in questo gruppo di ratti. Nella figura 6b è riportata la cinetica della conduttanza protonica indotta dal palmitato e si osserva che mentre i ratti L presentano una conduttanza protonica indotta minore rispetto agli N, i ratti F presentano una conduttanza protonica indotta dal palmitato maggiore rispetto ai ratti L e ai ratti N. Quindi l'efficienza energetica mitocondriale aumenta nei ratti L (che dimostrano una minore conduttanza protonica indotta rispetto agli N) e diminuisce nei ratti F (che dimostrano una maggiore conduttanza protonica sia basale che indotta). L'andamento dell'efficienza energetica mitocondriale rispecchia l'andamento dell'efficienza energetica a livello corporeo totale. Poiché lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella patogenesi della steatosi, ho voluto misurare anche un parametro dello stress ossidativo, quale è, appunto, l'aconitasi, enzima del ciclo di Krebs, sensibile alle specie reattive dell'ossigeno. In figura 7 viene riportata, quindi, la misura del rapporto tra aconitasi basale/aconitasi totale, il cui decremento è direttamente proporzionale all'aumento della produzione di ROS. I risultati indicano che la dieta ad alto contenuto di grassi saturi nei ratti L induce un maggior stress ossidativo. Infatti quando paragonati ai ratti N, i ratti L mostrano una maggiore inibizione dell'attività dell'aconitasi, come indicato dal diminuito rapporto aconitasi basale/aconitasi totale, mentre nei ratti F è risultato aumentato rispetto ai ratti L. Quindi, questi dati indicano che ratti alimentati con una dieta ricca in olio di pesce rispetto ai ratti alimentati con una dieta ricca in lardo hanno esibito una riduzione dello stress ossidativo epatico mitocondriale.

## **Muscolo**

Per quanto riguarda la funzionalità mitocondriale a livello muscolare, non ho riscontrato alcuna differenza nei tre gruppi di ratti sia in termini di velocità respiratoria sia di ossidazione degli acidi grassi che di efficienza energetica nella popolazione mitocondriale IMF, mentre ho riscontrato

delle differenze nella popolazione SS. Infatti dallo studio della respirazione nei mitocondri SS, l'attività respiratoria durante lo Stato 3, in presenza di succinato, risulta che nei ratti trattati con la dieta ricca in lardo si ha un decremento del 15% rispetto ai ratti N, mentre nei mitocondri dei ratti F si ha un incremento del 20,4% rispetto ai ratti L (figura 8) che riporta il valore della respirazione a livello di quella dei ratti di controllo. In presenza di palmitoil carnitina e di malato, nei mitocondri SS durante lo stato 3, la velocità di ossidazione degli acidi grassi è maggiore nei ratti L ed F rispetto ai controlli N (figura 9a). Inoltre l'attività della CPT è aumentata significativamente nei ratti L e nei ratti F rispetto agli N (figura 9b). Per quanto riguarda l'efficienza energetica mitocondriale non ho riscontrato alcuna differenza nella conduttanza protonica basale tra i tre gruppi di ratti (figura 10a), mentre per quanto riguarda la conduttanza protonica indotta (figura 10b), questa è risultata minore nei ratti L rispetto ai ratti N. Infatti, a parità di velocità respiratoria di consumo di ossigeno, i ratti L presentano un potenziale di membrana maggiore. I mitocondri SS dei ratti F, presentano una conduttanza protonica indotta più alta rispetto sia agli L che agli N. Quindi i mitocondri SS dei ratti L sono quelli che presentano la minore conduttanza protonica indotta e la maggiore efficienza energetica mitocondriale, mentre i ratti F mostrano la massima conduttanza protonica e la minore efficienza. Inoltre i ratti F mostrano un minor accumulo di lipidi sia a livello corporeo che in sede ectopica, quale appunto il muscolo, come mostrato in figura 12. Considerando che lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella patogenesi dell'insulino-resistenza, ho voluto misurare anche un parametro dello stress ossidativo, quale è, appunto, l'aconitasi. In figura 11 viene riportata, quindi, la misura del rapporto tra aconitasi basale/aconitasi totale, il cui decremento è direttamente proporzionale all'aumento della produzione di ROS. I risultati indicano che la dieta ad alto contenuto di grassi saturi nei ratti L induce stress ossidativo a livello mitocondriale, comportando una maggiore produzione di ROS. Infatti, quando paragonati ai ratti N, i ratti L mostrano una maggiore inibizione dell'attività dell'aconitasi, come indicato dal diminuito rapporto aconitasi basale/aconitasi totale e nessuna variazione significativa è stata riscontrata nei ratti F rispetto ai controlli. Quindi, questi dati indicano che ratti alimentati con una dieta ricca in olio di pesce, rispetto ai ratti alimentati con una dieta ricca in lardo hanno esibito una riduzione dello stress ossidativo muscolare

### **Analisi istologica muscolare.**

Per quanto riguarda l'analisi istologica, nella figura 12 sono riportate le immagini delle sezioni di muscolo sottoposte alla tecnica della PAS, da cui risulta una colorazione debole e delimitata in poche zone nei ratti L rispetto ai ratti N, mentre negli F si ha una colorazione più marcata e più estesa rispetto ai ratti L, che evidenzia la presenza di depositi di glicogeno maggiori. Questi risultati si correlano alla funzionalità dell'insulina nell'attivare la glicogenosintesi nei tessuti

osservati nei tre gruppi di ratti. Una maggiore presenza di depositi di glicogeno nei ratti F indica una minore insulino-resistenza in questo gruppo di ratti

### **Infiammazione e ER stress.**

Per quanto riguarda lo stato d'infiammazione e di stress del reticolo endoplasmatico (ER-stress) ho valutato tramite western blot vari parametri. In figura 13 sono riportati i livelli d'espressione di MCP-1 a livello epatico. Nei ratti a dieta con lardo e con omega 3, si osserva un livello più alto della chemochina MCP-1 rispetto ai controlli. Nei ratti F i livelli sono significativamente più bassi rispetto ai ratti L. Livelli più elevati di MCP-1 nei ratti L indicano un più alto stato infiammatorio, con presenza di una maggiore quantità di macrofagi. In fig. 14 sono mostrati i dati relativi al TGF- $\beta$ , quale indice di infiammazione avanzata e di progressione da steatosi a fibrosi. Anche in questo caso si osserva un'espressione significativamente più alta del TGF- $\beta$  nei ratti L ed F rispetto ai controlli, ma nei ratti a dieta con olio di pesce si osserva un livello significativamente più basso rispetto ai ratti a dieta con lardo, ad indicare una minore infiammazione. I dati relativi all'ER-stress mostrano una maggior attivazione della risposta UPR nei ratti F rispetto agli L, ciò indica che in quest'ultimo gruppo di ratti è presente un più alto grado di ER-stress e di apoptosi .

In figura 15 sono mostrati i dati relativi a BIP, chaperone chiave che incrementa la capacità di *folding* del reticolo e previene l'aggregazione proteica. I risultati mostrano che i livelli di BIP sono significativamente più alti nei ratti L sia rispetto ai controlli che ai ratti a dieta con omega 3, ad indicare un maggior ER-stress in questo gruppo di ratti. In figura 16 invece sono riportati i dati relativi al grado di fosforilazione di eIF2 $\alpha$ . Questo fattore nello stato fosforilato è inattivo e quindi minore risposta UPR. I risultati mostrano che il grado di fosforilazione di eIF2 $\alpha$  aumenta nei ratti L in maniera significativa rispetto ai controlli e ulteriormente incrementata nei ratti F. La maggiore fosforilazione in quest'ultimo gruppo di ratti indica che la dieta con omega 3 favorisce una migliore risposta cellulare all'ER-stress.

**Tabella 1****Peso e composizione corporea dei ratti N, L ed F.**

	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>F</b>
Peso corporeo iniziale (g)	373 ± 5	372 ± 6	371 ± 6
Peso corporeo finale (g)	484 ± 10	547 ± 10*	509 ± 12 #
Guadagno di peso (g)	111,6 ± 10	175 ± 12*	138 ± 5,3#
Contenuto energetico (KJ/g)	9 ± 0.2	12,4 ± 0.5*	10,3 ± 0.3*#
Acqua corporea (%)	62,5 ± 0,6	54,8 ± 2,2*	60,3 ± 0.4#
Contenuto lipidico (%)	11,9 ± 0.6	22,2 ± 1,6*	16,2 ± 0.7* #
Contenuto proteico(%)	18,4 ± 1	15,7 ± 0,9	17,2 ± 1

I valori sono le medie ± ES di 7 differenti esperimenti.

\* P <0.05 rispetto ai ratti N

#P <0.05 rispetto ai ratti L

**Tabella 2**

**Guadagno energetico, guadagno proteico e lipidico, energia metabolizzabile ed efficienza energetica dei ratti N, L ed F.**

	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>F</b>
Peso corporeo iniziale (g)	373 ± 5	372 ± 6	371 ± 6
Peso corporeo finale (g)	484 ± 10	547 ± 10*	509 ± 12 #
Guadagno di peso (g)	111,6 ± 10	175 ± 12*	138 ± 5,3#
Contenuto energetico (KJ/g)	9 ± 0.2	12,4 ± 0.5*	10,3 ± 0.3*#
Acqua corporea (%)	62,5 ± 0,6	54,8 ± 2,2*	60,3 ± 0.4#
Contenuto lipidico (%)	11,9 ± 0.6	22,2 ± 1,6*	16,2 ± 0.7* #
Contenuto proteico(%)	18,4 ± 1	15,7 ± 0,9	17,2 ± 1

I valori sono le medie ± ES di 7 differenti esperimenti.

\* P <0.05 rispetto ai ratti N

#P <0.05 rispetto ai ratti L

**TABELLA 3**

**Consumo di ossigeno, produzione di anidride carbonica e  
quoziente respiratorio nei ratti N, L ed F**

	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>F</b>
<b>VO<sub>2</sub>(ml/min/kg<sup>0,75</sup>)</b>	<b>6,6 ± 0,6</b>	<b>8,6 ± 0,4*</b>	<b>11,8 ± 0,9*#</b>
<b>VCO<sub>2</sub>(ml/min/kg<sup>0,75</sup>)</b>	<b>6,4 ± 0,5</b>	<b>7,4 ± 0,3*</b>	<b>10,3 ± 0,8*#</b>
<b>RQ</b>	<b>0,96 ± 0,02</b>	<b>0,86 ± 0,01*</b>	<b>0,88 ± 0,02*</b>

VO<sub>2</sub>= consumo di ossigeno

VCO<sub>2</sub>= produzione di anidride carbonica

RQ= quoziente respiratorio

I valori sono le medie ± ES di 7 differenti esperimenti.

\* P <0.05 rispetto ai ratti N

#P <0.05 rispetto ai ratti L

**Tabella 4**

**Livelli serici di colesterolo, trigliceridi, NEFA,  
ALT, Leptina, adiponectina e TNF- $\alpha$**

	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>F</b>
<b>Colesterolo mg/dl</b>	47,8 $\pm$ 1,11	72,2 $\pm$ 8,67*	47,5 $\pm$ 1,2#
<b>Trigliceridi mg/dl</b>	51,6 $\pm$ 4,00	73,25 $\pm$ 2,40*	55 $\pm$ 3,0#
<b>NEFA, mmol/l</b>	0,27 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,02*	0,34 $\pm$ 0,01*#
<b>ALT, UI</b>	41,0 $\pm$ 3,6	67,8 $\pm$ 1,5*	54,6 $\pm$ 1,8*#
<b>Leptina mg/dL</b>	10,7 $\pm$ 0,9	19,2 $\pm$ 1,2*	14,1 $\pm$ 1,2 *#
<b>Adiponectina <math>\mu</math>g/ mL</b>	5,57 $\pm$ 1	4,93 $\pm$ 0,85*	5,80 $\pm$ 1,21#
<b>TNF-<math>\alpha</math> ng/mL</b>	0,112 $\pm$ 0,02	0,207 $\pm$ 0,04*	0,136 $\pm$ 0,04#

**ALT= alaninoammino transferasi**

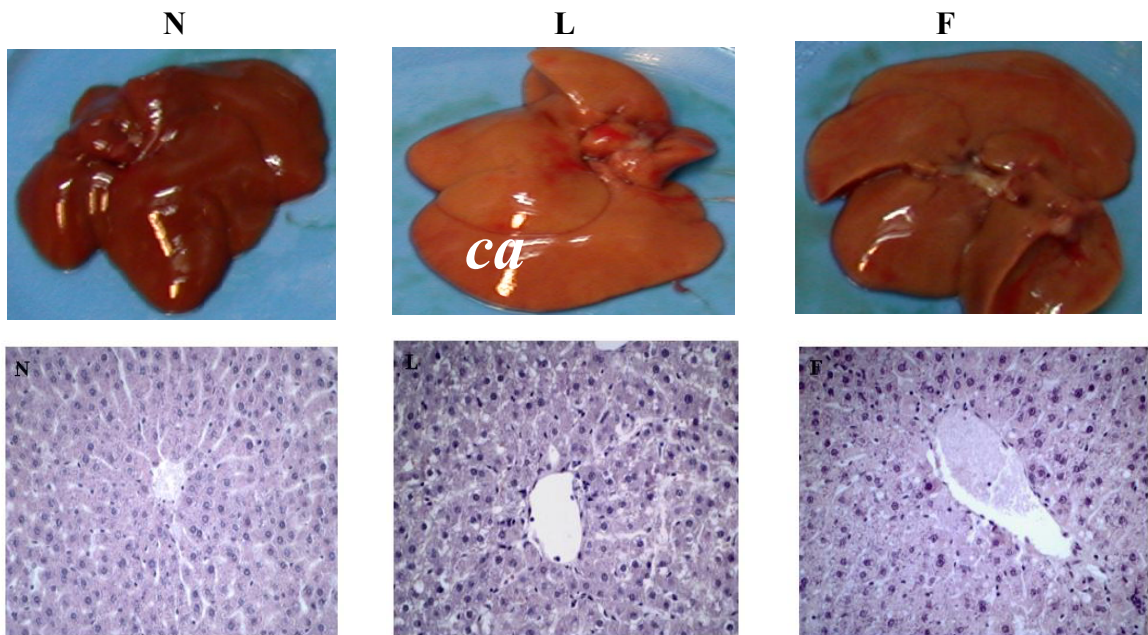
I valori sono le medie  $\pm$  ES di 7 differenti esperimenti

\*P<0,05 rispetto a N

# P<0,05 rispetto a L

FIGURA 1

Accumulo epatico di lipidi nei ratti N, L ed F



Contenuto lipidico (mg/g di tessuto epatico)		
4,1 ± 0,2	8,5 ± 0,3*	5,9 ± 0,8#

\* P<0,05 rispetto a N

# P<0,05 rispetto a L



**Tabella 5**

**Livelli serici basali di glucosio, insulina, indice HOMA e contenuto lipidico muscolare nei ratti N, L ed F**

	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>F</b>
<b>Glucosio mg/dL</b>	84,1 ± 2,58	106,8 ± 5,30*	105,8 ± 7,29*
<b>Insulina µg/ L</b>	0,598 ± 0,156	1,234 ± 0,228*	0,610 ± 0,072#
<b>Indice HOMA</b>	2,89 ± 0,6	7,57 ± 0,7*	3,71 ± 0,31#

I valori sono le medie ± ES di 7 differenti esperimenti

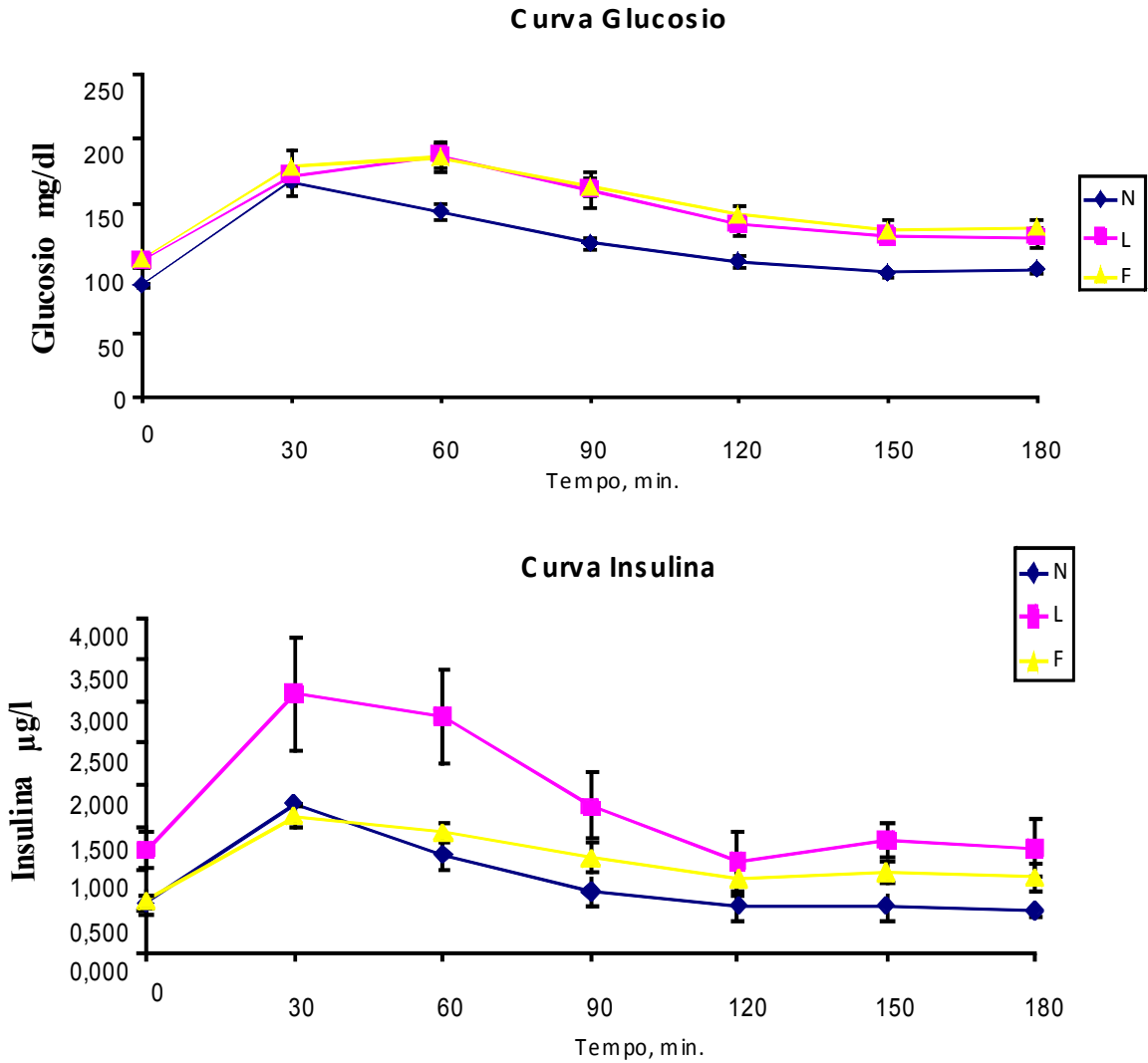
\*P<0.05 rispetto ai controlli. ;

#P<0.05 rispetto ai ratti L.

Indice H.O.M.A. = [glucosio(mg/dL) x insulina (mU/L) ] / 405

Figura 2 e tabella 6

Risposta del glucosio e dell'insulina ad un test da carico orale di glucosio (OGTT) e area sotto la curva (AUC).



	N	L	F
AUC glucosio	21509 ± 704	27264 ± 995*	26606 ± 800*
AUC insulina	159,8 ± 13	339,4 ± 20*	203,9 ± 10 <sup>#</sup>

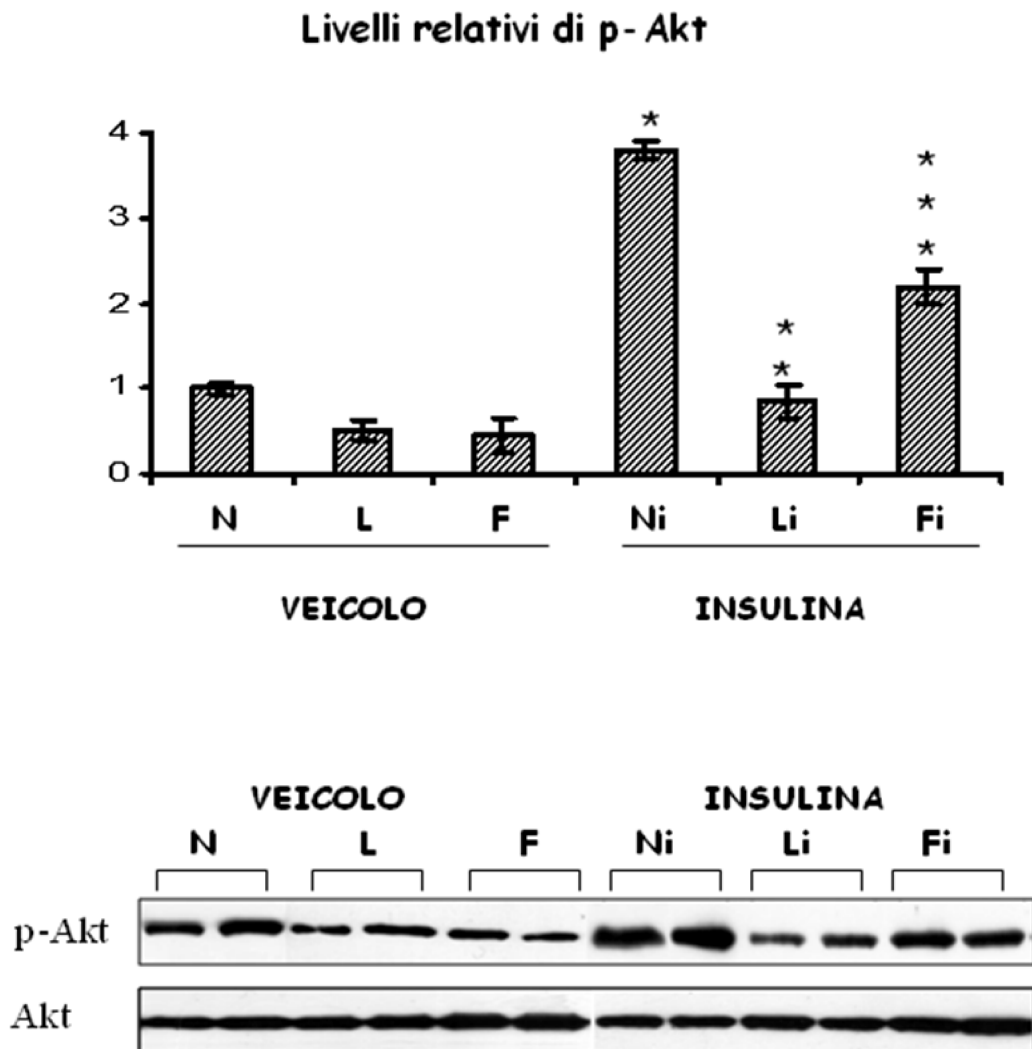
I valori sono le medie ± ES di 7 differenti esperimenti.

\*P<0.05 rispetto ai controlli;

<sup>#</sup>P<0.05 rispetto ai ratti L

**FIGURA 3**

**Fosforilazione dell'Akt indotta dall'insulina a livello muscolare  
nei ratti N, L ed F.**



\*\* P<0,05 rispetto agli N

\*\*\* P<0,05 rispetto agli L

**Tabella 7**

**Attività della Citrato sintasi (CS) nei ratti N, L ed F**

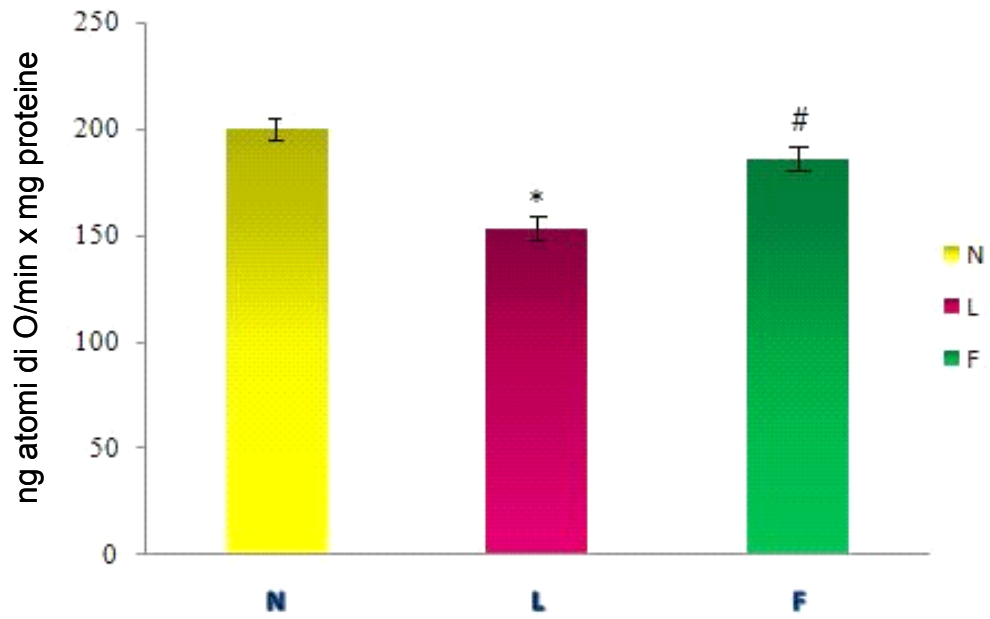
	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>F</b>
<b>Omogenato CS (<math>\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{gr tessuto}</math>)</b>	<b>11,9 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>11,1 <math>\pm</math> 0,37</b>	<b>15.5 <math>\pm</math> 0,7*#</b>
<b>Mitocondri CS (<math>\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg proteine}</math>)</b>	<b>0,46 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>0,31 <math>\pm</math> 0,02*</b>	<b>0,40 <math>\pm</math> 0,05#</b>
<b>Massa proteica mitocondriale (mg/g fegato)</b>	<b>25,8 <math>\pm</math> 1,41</b>	<b>35.4 <math>\pm</math> 1,0*</b>	<b>38.8 <math>\pm</math> 3.0*</b>

I dati sono la media  $\pm$  SE di 7 differenti esperimenti.

\*P<0,05 rispetto agli N

#P<0,05 rispetto agli L

**Figura 4**  
**Respirazione nei mitocondri epatici dei ratti N, F ed L.**



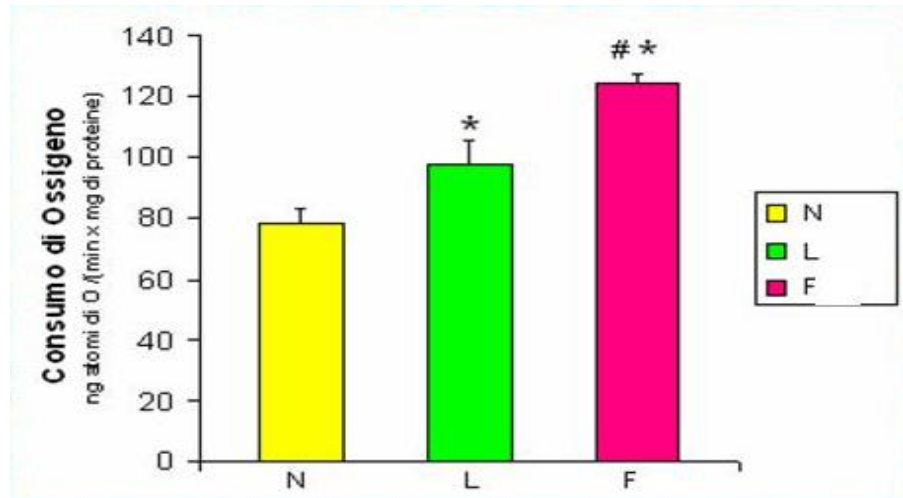
I valori sono le medie  $\pm$  ES di 7 differenti esperimenti

\*  $P < 0,05$  rispetto a N

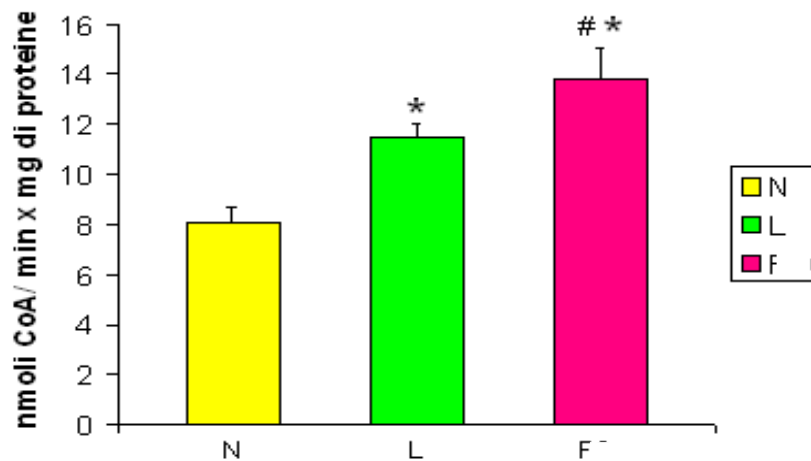
#  $P < 0,05$  rispetto a L

Figura 5

a) Ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri epatici dei ratti N, L ed F



b) Attività della Carnitina palmitoil transferasi (CPT) nei mitocondri epatici dei ratti N, L ed F



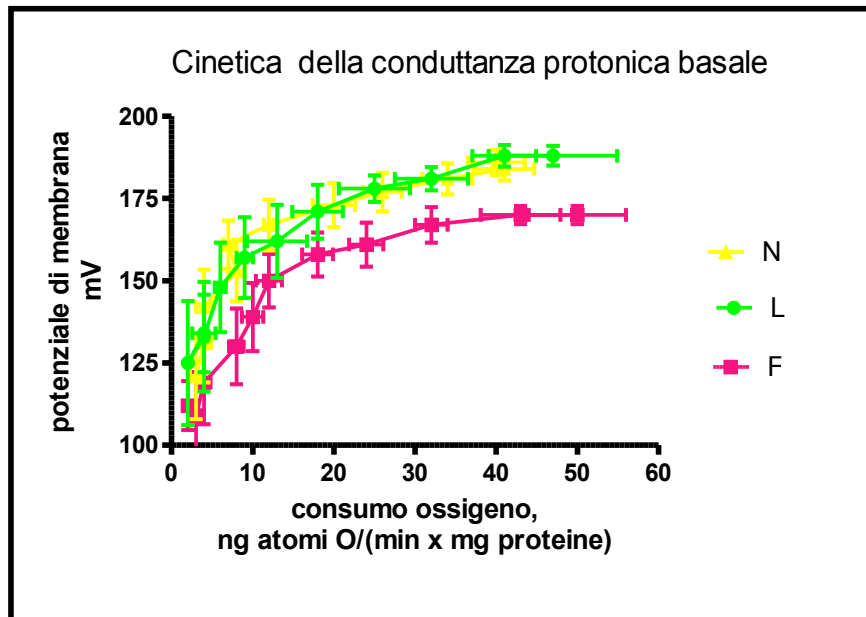
I valori sono le medie  $\pm$ ES di 7 differenti esperimenti

\*  $P < 0,05$  rispetto a N

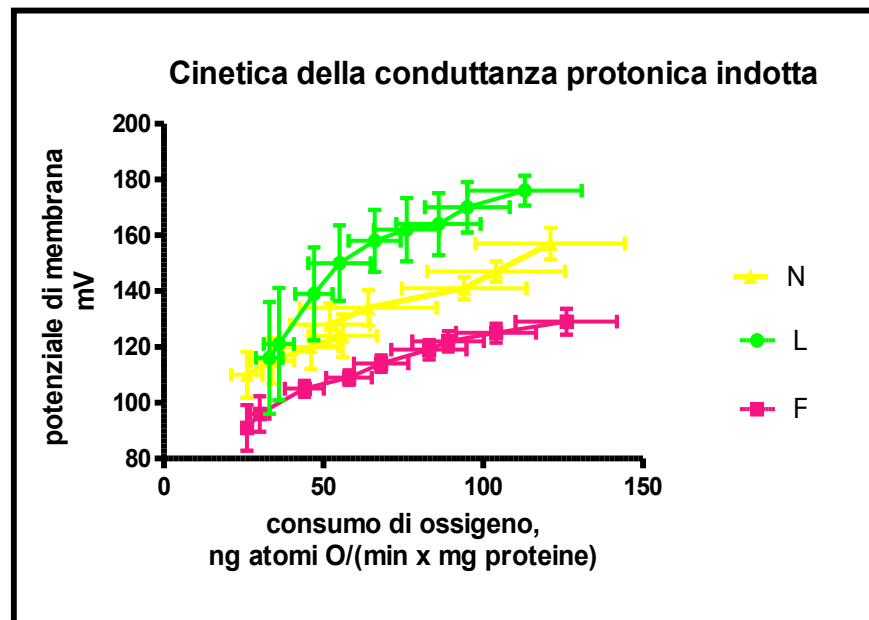
#  $P < 0,05$  rispetto a L

Figura 6

a) **Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri epatici dei ratti N, L ed F**



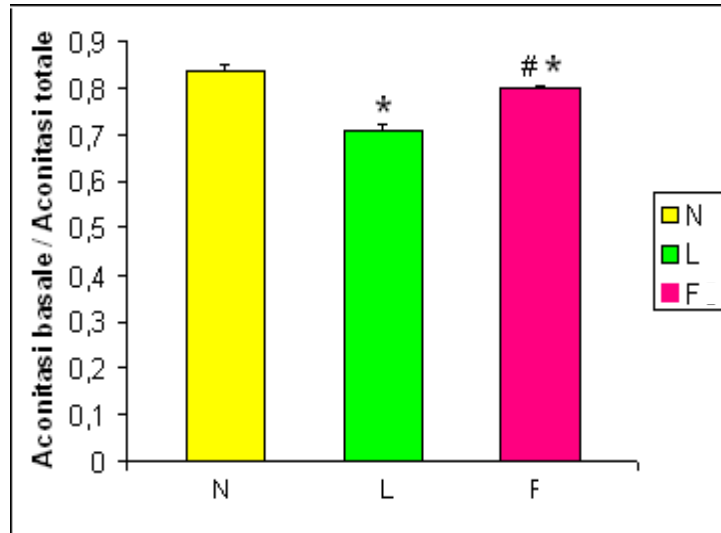
b) **Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri epatici dei ratti N, L, F**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di 7 differenti esperimenti

**Figura 7**

**Misura del rapporto aconitasi basale /aconitasi totale  
nei mitocondri epatici dei ratti N, Led F**



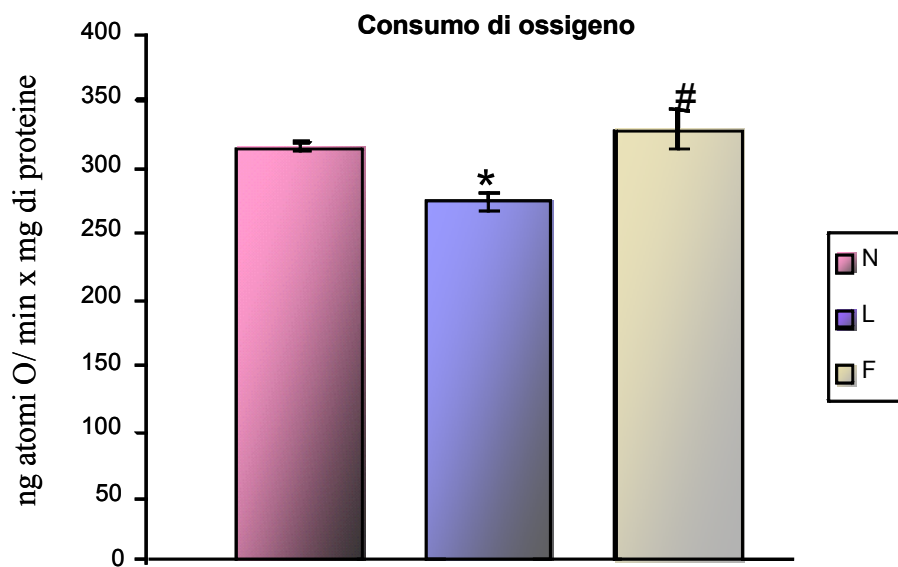
I valori sono le medie  $\pm$  ES di 7 differenti esperimenti

\*  $P < 0,05$  rispetto a N

#  $P < 0,05$  rispetto a L



**Figura 8**  
**Respirazione nei mitocondri SS. nei ratti N. L ed F**



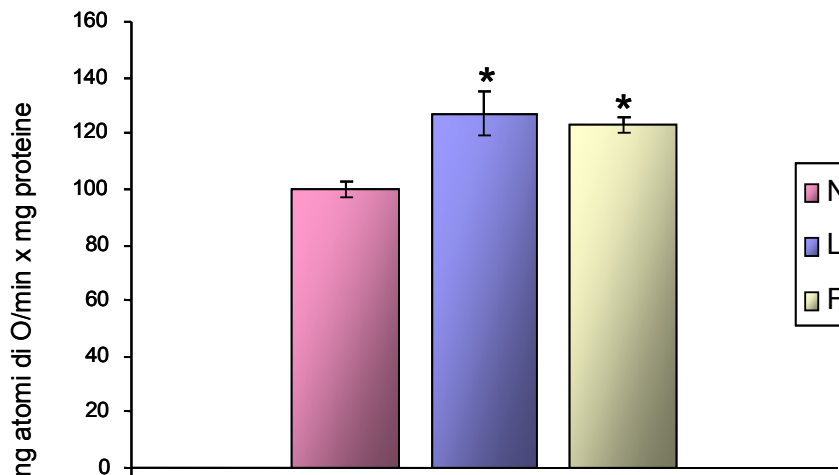
I valori sono le medie  $\pm$  ES di 7 differenti esperimenti

\* $P < 0,05$  rispetto ai controlli

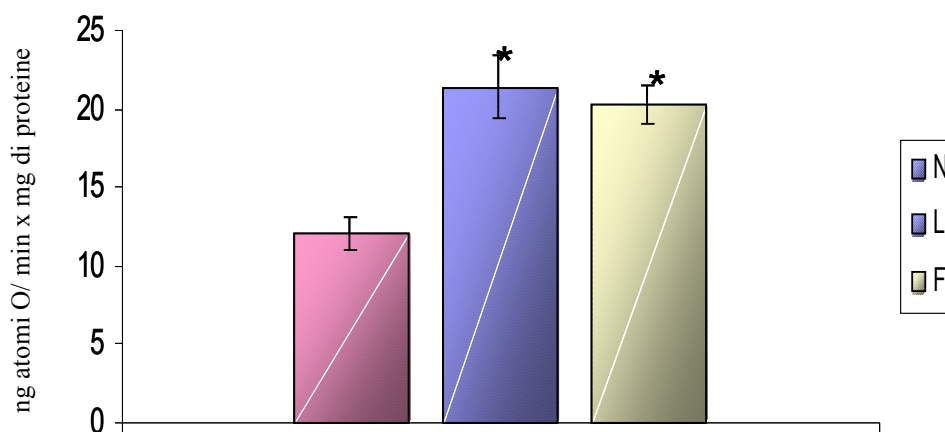
# $P < 0,05$  rispetto ai ratti L

**Figura 9**

**a) Beta ossidazione nei mitocondri SS, Stato 3 nei ratti N, L ed F**



**b) Attività della Carnitina palmitoil transferasi (CPT)**

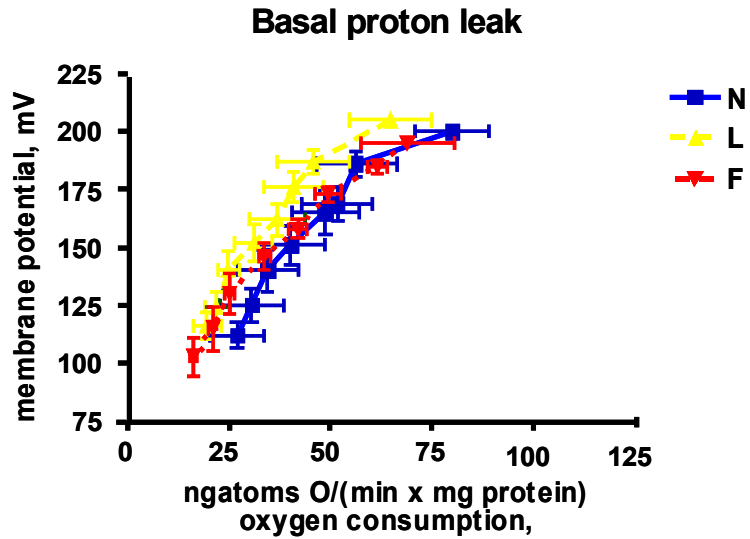


I valori sono le medie  $\pm$  ES di 7 differenti esperimenti

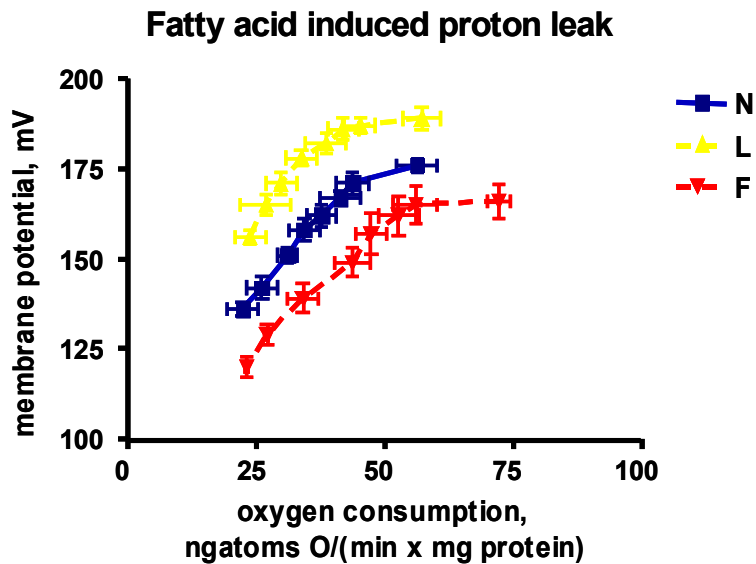
\*  $P < 0.05$  rispetto ai controlli.

Figura 10

- a) Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri muscolari dei ratti N, L ed F



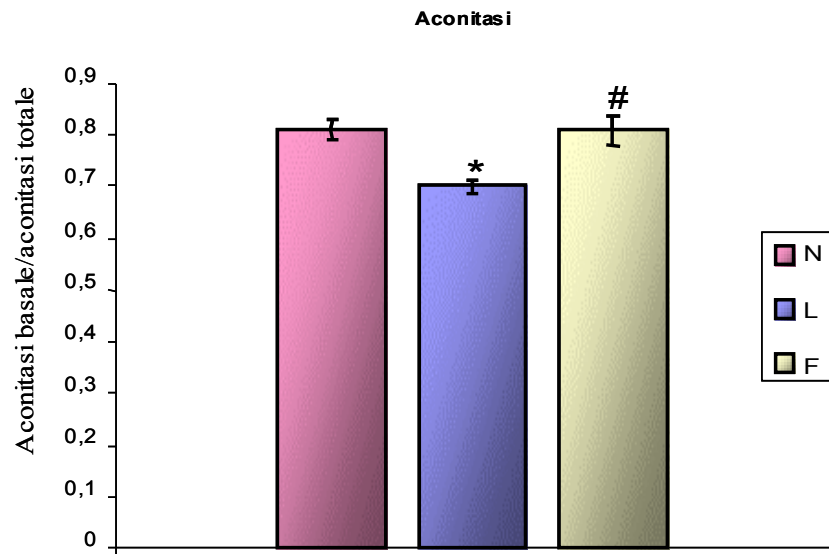
- b) Cinetica della conduttanza protonica indotta nei mitocondri muscolari dei ratti N, L ed F



I valori sono le medie  $\pm$  ES di 7 differenti esperimenti.

**Figura 11**

**Misura del rapporto aconitasi basale/aconitasi totale  
in mitocondri muscolari dei ratti N, L ed F**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di 7 differenti esperimenti

\*  $P < 0.05$  rispetto ai ratti N

#  $P < 0.05$  rispetto ai ratti L.

## Figura 12

### Analisi istologica

#### PAS nel muscolo dei ratti N, L ed F



N

L

F

$1,35 \pm 0,15$	$1,94 \pm 0,16^*$	$1,47 \pm 0,11^\#$
-----------------	-------------------	--------------------

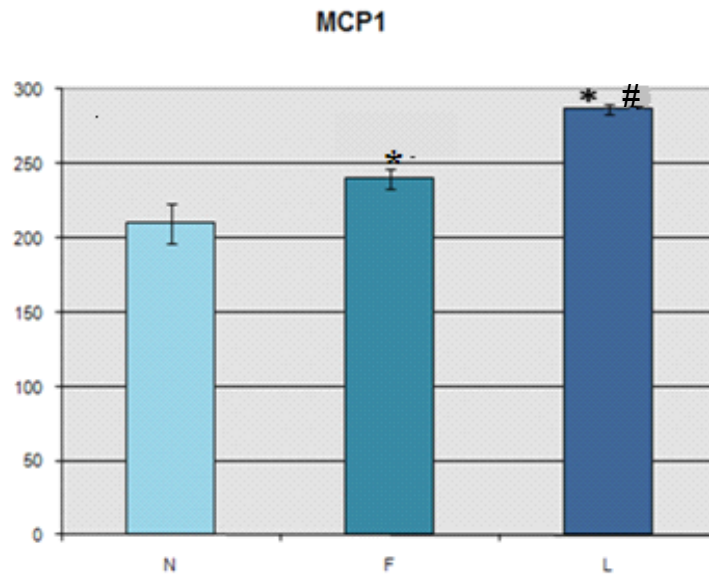
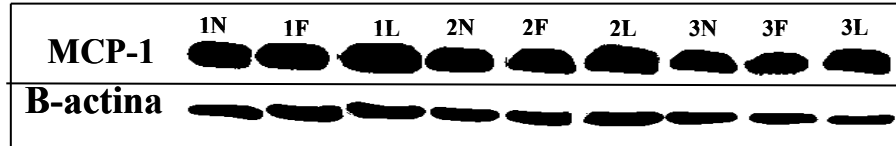
#### Contenuto di lipidi muscolare (mg/g tessuto)

\*  $P < 0,05$  rispetto a N

#  $P < 0,05$  rispetto a L

Figura 13

Livelli di espressione a livello epatico di MCP-1

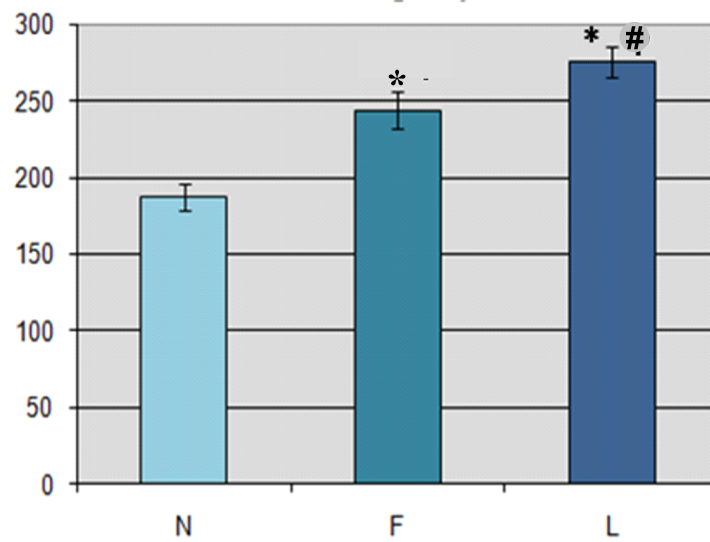
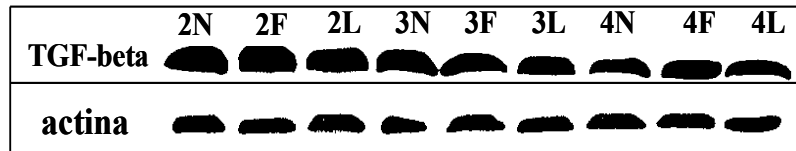


\* =  $P < 0,05$  rispetto a N

# =  $P < 0,05$  L rispetto a F

Figura 14

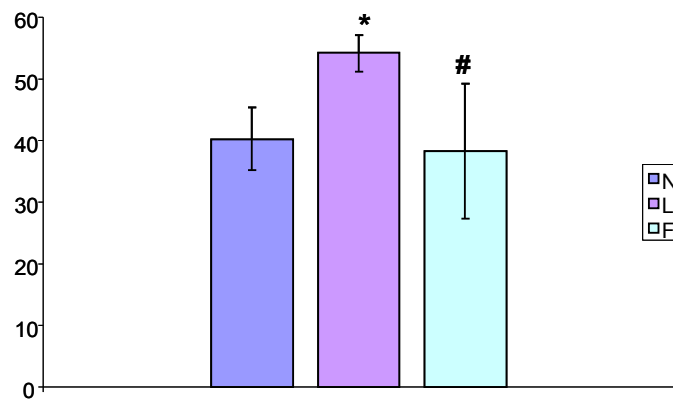
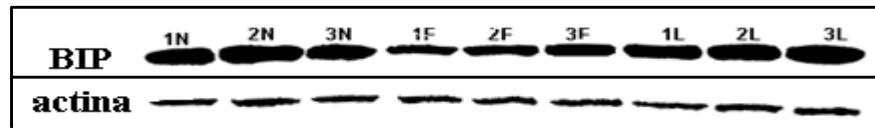
Livelli di espressione epatica di TGF- $\beta$



\* =  $P < 0,05$  rispetto a N

# =  $P < 0,05$  L rispetto a F

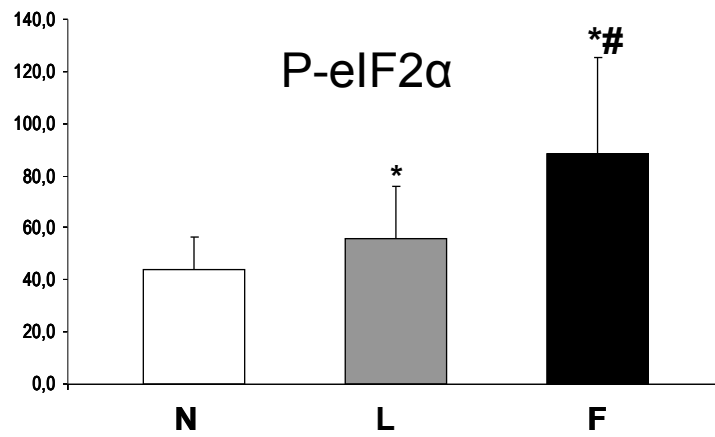
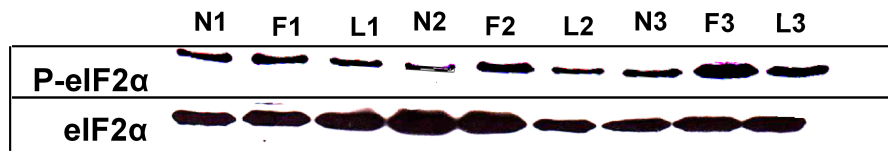
**Figura 15**  
**Contenuto epatico di BIP**



\* =  $P < 0.05$  L rispetto agli N  
# =  $P < 0.05$  F rispetto agli L



**Figura 16**  
**Contenuto epatico di eIF2 $\alpha$**



**\* = P<0.05 rispetto a N**  
**# = P<0.05 rispetto a L**

## DISCUSSIONE.

Molti studi sono stati condotti sull'utilizzo dell'olio di pesce come supplemento nella dieta sia in modelli animali che nell'uomo. Nella mia tesi ho ritenuto interessante andare a valutare gli effetti di diete iperlipidiche, in cui la fonte principale di grasso è l'olio di pesce, su alcuni parametri relativi allo sviluppo dell'obesità, della steatosi epatica ed insulino resistenza, per vedere se gli effetti siano diversi rispetto a diete iperlipidiche ricche in lardo. L'interesse dei nutrizionisti per gli acidi grassi omega 3, in particolare per l'olio di pesce, è nato più di trenta anni fa, epoca in cui fu osservato che gli Eschimesi della Groenlandia avevano una bassissima incidenza di eventi coronarici, pur se abituati a consumare una dieta molto ricca in grassi. È da notare, però, che la dieta di queste popolazioni era, sì molto ricca in grassi, ma questi grassi erano quasi tutti di origine marina, cioè essenzialmente acido eicosapentaenoico e acido docosaesaenoico<sup>147</sup>. Gli acidi grassi omega 3 somministrati con la dieta o con integratori, sembrano abbassare il rischio di incorrere in malattie metaboliche normalmente associate all'obesità, come le malattie cardiovascolari e il diabete di tipo 2. A tal scopo ho esaminato gli effetti dell'olio di pesce sullo sviluppo dell'obesità, nel modello sperimentale animale, quando l'olio di pesce (ricco in omega 3) viene somministrato in maniera massiva tramite dieta, confrontandolo con l'effetto di diete ricche in lardo (ricche di grassi saturi). I risultati dimostrano innanzitutto che il trattamento con diete iperlipidiche ricche in lardo o in olio di pesce, influenzano in maniera differente la composizione corporea e il bilancio energetico. In entrambi i gruppi di ratti alimentati con dieta iperlipidica, pur assumendo una simile quantità di energia, non si ha un uguale incremento nel guadagno di peso corporeo. Infatti, nei ratti a dieta con lardo (L), si ha un aumento del guadagno di peso corporeo maggiore rispetto ai ratti di controllo (N) del 56%, mentre nei ratti a dieta con olio di pesce (F) tale incremento è solo del 23 %. Inoltre nei ratti L si ha un incremento significativo della percentuale lipidica corporea dell' 83% ed una diminuzione significativa del contenuto di acqua rispetto ai controlli. Il trattamento con diete ricche di olio di pesce, invece, porta ad un decremento della percentuale lipidica corporea rispetto ai ratti L senza variazioni significative della percentuale di acqua. Alle variazioni delle percentuali lipidiche corporee si associano variazioni nel contenuto energetico corporeo, che, infatti, nei ratti L aumenta significativamente rispetto ai ratti N. Inoltre i ratti F esibiscono un più alto metabolismo basale espresso come consumo d'ossigeno e una minore efficienza energetica (calcolata come rapporto tra guadagno energetico ed energia metabolizzabile introdotta). Quindi buona parte dell'energia assunta non viene depositata sotto forma di lipidi, ma dissipata grazie ad un aumento della spesa energetica e una diminuzione dell'efficienza totale. Per questo motivo, a parità di energia assunta, i ratti alimentati con diete ricche in omega-3 vanno incontro ad un minore sviluppo dell'obesità. Poiché è noto che gli acidi grassi omega-3 riducono il rischio di malattie associate all'obesità come patologie

cardiovascolari, tramite un effetto ipolipidemizzante, ho ritenuto interessante andare a valutare alcuni parametri ematici. Infatti, si evidenzia che i livelli basali sierici di colesterolo, trigliceridi e NEFA nei ratti F hanno valori simili ai ratti N, confermando l'effetto ipolipidemizzante degli acidi grassi omega-3. Inoltre ho riscontrato un più alto livello di leptina e un più basso livello di adiponectina nei ratti L, correlabili con una maggiore massa grassa e quindi con un più alto grado di obesità rispetto ai ratti alimentati con omega 3. E' evidente dai risultati ottenuti che una dieta ricca di grassi omega 3 è sicuramente meno dannosa rispetto ad una dieta ricca di acidi grassi saturi in quanto lo stato d'infiammazione dovuto all'aumento di peso e quindi a un certo grado di obesità è molto più accentuato in soggetti sottoposti ad una dieta iperlipidica ricca in lardo. Infatti i miei risultati confermano un maggior stato d'infiammazione, dimostrato dai livelli sierici di TNF- $\alpha$ , più alti nei ratti L rispetto agli N e più bassi nei ratti F rispetto ai ratti a dieta con lardo. Successivamente ho rivolto la mia attenzione al tessuto epatico, valutando l'azione delle diete iperlipidiche su quest'organo nell'insorgenza dell'obesità e della steatosi epatica. Infatti, i ratti L rispetto ai controlli N presentano steatosi epatica, come dimostrato dal colore più chiaro del fegato e dall'analisi istologica, la quale mette in evidenza un elevato accumulo di goccioline lipidiche. Nei ratti F, invece, si osserva un grado di steatosi ridotto: il colore del fegato di questi ratti è meno chiaro rispetto agli L e più simile agli N, indicando che l'utilizzo dell'olio di pesce riduce l'accumulo di lipidi. Il dato è confermato dall'analisi istologica di sezioni di fegato e anche dalla misura dei livelli di lipidi epatici che mettono in evidenza un aumento di tali livelli negli L, rispetto ai controlli, ed una riduzione nei ratti F rispetto agli L. Un ridotto danno epatico nei ratti alimentati con dieta ricca in omega 3 è stato ulteriormente confermato dai valori di ALT meno elevati in questo gruppo di ratti. Poi ho focalizzato il mio interesse sulla funzionalità dei mitocondri epatici, dal momento che la disfunzione mitocondriale sembra avere un ruolo importante nella patogenesi della steatosi epatica. I risultati relativi alla massa proteica mitocondriale indicano che ad un simile aumento di tale massa nei ratti L ed F rispetto ai controlli, corrisponde una maggiore attività della citrato sintasi nei ratti F rispetto agli L, dato confermato anche dai risultati ottenuti dalla respirazione mitocondriale. Lo stato 3 della respirazione, infatti, in termini di consumo di ossigeno, risulta più elevato nei ratti F rispetto agli L, indicando una maggiore funzionalità mitocondriale nei ratti a dieta con olio di pesce, mentre nei ratti L i mitocondri sono maggiormente danneggiati. Inoltre, per quanto riguarda il contenuto epatico di trigliceridi, i ratti L mostrano un valore più alto rispetto ai ratti N, mentre negli F tale valore risulta più basso rispetto agli L. Quindi, un'alimentazione con diete ricche in olio di pesce, rispetto all'alimentazione con diete ricche in lardo, nel modello animale, porta ad una diminuzione del contenuto epatico di trigliceridi. La spiegazione convenzionale sull'accumulo di trigliceridi negli epatociti è che l'aumento della massa degli adipociti e l'aumento dell'idrolisi dei trigliceridi

contribuisce all'aumento dei livelli plasmatici di acidi grassi liberi (FFA). La velocità di ingresso degli FFA negli epatociti non è regolata ed è, perciò, direttamente proporzionale alla concentrazione di FFA nel plasma. Gli FFA, entrati nel fegato, sono metabolizzati generalmente mediante due pathways: la  $\beta$ -ossidazione per generare ATP o l'esterificazione per produrre trigliceridi che, o sono incorporati nelle particelle di VLDL per fuoriuscire dall'epatocita, o sono depositate all'interno dell'epatocita. Difetti in uno di questi due pathways possono provocare steatosi. Quindi l'aumento sia di arrivo di FFA al fegato che della sintesi epatica di trigliceridi, molto probabilmente giocano un ruolo importante nello sviluppo della steatosi. Nei mitocondri epatici dei ratti L, la  $\beta$ -ossidazione è aumentata rispetto ai ratti N. I miei risultati mostrano sia un aumento della beta ossidazione che dell'attività del sistema di trasporto della carnitina palmitoil transferasi (CPT) nei ratti L rispetto ai controlli e ancor più nei ratti F. Questi risultati sono in accordo con quelli di altri autori, i quali attestano che un aumento del carico di FFA a livello epatico provoca un aumento della  $\beta$ -ossidazione mitocondriale<sup>148</sup>. Questo meccanismo di compensazione avviene durante un'alimentazione ad elevato contenuto di grassi. Un aumento della beta ossidazione, si riscontra in topi ob/ob che presentano un alto grado di steatosi<sup>148</sup> e in pazienti obesi affetti da NASH. I meccanismi responsabili dell'aumento della  $\beta$ -ossidazione nei pazienti con NASH sono scarsamente conosciuti, ma sono state avanzate diverse ipotesi. Un meccanismo potrebbe essere l'attivazione del PPAR- $\alpha$  epatico da parte dell'aumentato pool di FFA. Un secondo meccanismo potrebbe, invece, essere l'aumento della stimolazione dell'attività della CPT-1 che promuoverebbe, l'ulteriore ingresso di acidi grassi a lunga catena nei mitocondri epatici. L'aumentata attività e/o espressione della CPT-1 è stata, infatti, riscontrata anche in topi modello con steatosi epatica. Tale incremento sembra essere dovuto all'attivazione del PPAR- $\alpha$ , ma alcuni studi suggeriscono che anche gli acidi grassi a lunga catena sono capaci di incrementare l'espressione di CPT-1 in modo PPAR- $\alpha$  indipendente<sup>149</sup>. Nonostante, però, l'aumento della  $\beta$ -ossidazione mitocondriale in presenza di steatosi, questa non è in grado di compensare l'aumentato carico di acidi grassi liberi, per cui gli FFA in eccesso vengono convertiti in trigliceridi; di questi, una parte viene conservata all'interno del citoplasma, causando steatosi, mentre un'altra parte viene secreta nel plasma, causando iperlipidemia. Anche i risultati della mia tesi, quindi, portano ad ipotizzare che l'aumento della  $\beta$ -ossidazione nei mitocondri epatici, riscontrato nei ratti L, non sia in grado di compensare l'aumentato carico di FFA che sopraggiunge al fegato, portando ad un aumentato deposito di trigliceridi, come confermato dall'aumento del contenuto epatico di trigliceridi nei ratti L, rispetto agli N. Per quanto riguarda invece i ratti alimentati con dieta iperlipidica ricca in omega-3, i risultati indicano che in tali ratti, si ha un ulteriore aumento della  $\beta$ -ossidazione rispetto ai ratti L. Quest'ulteriore stimolazione dell'ossidazione degli acidi grassi potrebbe contribuire al minore accumulo di trigliceridi che si

osserva nei ratti F rispetto ai ratti L, grazie probabilmente ad una migliore compensazione del carico di FFA che dal circolo ematico arriva al fegato. Un altro meccanismo attraverso il quale le diete iperlipidiche ricche in omega-3 potrebbero portare ad uno sviluppo minore di steatosi epatica rispetto a quelle ricche in lardo, potrebbe essere la capacità di indurre una minore efficienza mitocondriale di utilizzazione dei substrati, quindi una diminuzione dell'efficienza dell'accoppiamento mitocondriale tra ossidazione del substrato e produzione di ATP (effetto termogenico). L'efficienza attraverso la quale l'energia dei substrati viene convertita in ATP, cioè l'accoppiamento tra velocità della catena respiratoria e la fosforilazione ossidativa, dipende dall'entità della conduttanza protonica, distinta in due tipi:

- **conduttanza protonica basale**, che non è finemente regolata ed è presente in tutti i mitocondri. Essa è una via di perdita protonica passiva dovuta ad una proprietà intrinseca della membrana mitocondriale interna;
- **conduttanza protonica inducibile**, caratterizzata da proteine e indotta da agenti disaccoppianti, quali acidi grassi che nello spazio intermembrana legano i protoni e nella forma protonata entrano nella matrice e li rilasciano. Ho quindi determinato l'efficienza mitocondriale misurando questo flusso protonico attraverso la membrana mitocondriale non associato a sintesi di ATP, sia in assenza (conduttanza protonica basale) che in presenza di palmitato (conduttanza protonica indotta). I risultati hanno dimostrato che l'efficienza energetica mitocondriale è aumentata nei ratti alimentati con diete iperlipidiche ricche lardo, come riscontrato dalla diminuzione della conduttanza protonica basale. Nei ratti F, invece, l'efficienza energetica mitocondriale è diminuita rispetto ai ratti L e N, come riscontrato dall'aumento sia della conduttanza protonica basale sia dell'indotta. La diminuzione dell'efficienza energetica mitocondriale può essere uno dei meccanismi che contribuisce alla minore efficienza energetica corporea che si riscontra nei ratti F rispetto ai ratti L. Tale diminuzione dell'efficienza mitocondriale nei ratti F indica che in tali ratti i mitocondri epatici devono ossidare una maggiore quantità di substrati per produrre la stessa quantità di ATP dei mitocondri isolati dai ratti L. Quindi la maggiore conduttanza protonica è un modo per disperdere il gradiente protonico, utile per produrre ATP, sottoforma di calore e per bruciare una maggiore quantità di grassi per produrre la stessa quantità di ATP. Quindi una maggiore quantità di acidi grassi che arrivano al fegato dei ratti F sono diretti verso l'ossidazione, anziché verso il deposito come avviene invece nei ratti L. L'ossidazione degli acidi grassi di per sé può condurre ad una significativa produzione mitocondriale di ROS, dovuta probabilmente all'incremento della quantità di equivalenti ridotti e del trasferimento di elettroni entro la catena respiratoria. Nella NASH, l'aumento dell'ossidazione lipidica da parte dei mitocondri nel fegato steatotico porta ad una maggior produzione di donatori di elettroni (NADH e FADH<sub>2</sub>) nella catena di trasporto di elettroni e di conseguenza, il gradiente di voltaggio attraverso la membrana

mitocondriale aumenta fino a raggiungere un valore limite. A questo punto, il trasferimento degli elettroni all'interno del complesso III viene bloccato, provocando il ritorno degli elettroni al coenzima Q, il quale cede uno per volta gli elettroni all'ossigeno molecolare, generando superossido. Questo, tramite l'enzima *superossido dismutasi* viene trasformato in perossido di idrogeno che, in condizioni fisiologiche, è convertito in acqua attraverso la *catalasi* e la *glutadione perossidasi*. Tenendo presente che lo stress ossidativo svolge un importante ruolo nella patogenesi della steatosi, ho ritenuto interessante valutare, come indice di stress ossidativo, l'attività dell'aconitasi, enzima del ciclo di Krebs che contiene nel suo sito attivo un cluster [4Fe-4S] che ossidato dallo ione superossido, viene inattivato. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i ratti L mostrano in aggiunta alla steatosi epatica, un incremento dello stress ossidativo mitocondriale, come evidenziato dall'inibizione dell'attività dell'enzima aconitasi (intesa come rapporto aconitasi basale/aconitasi totale), rispetto ai ratti N, mentre i ratti F hanno mostrato un rapporto più alto rispetto ai ratti L. Quindi la presenza di acidi grassi omega-3 invece degli acidi grassi saturi nella dieta iperlipidica, porta ad un minore stress ossidativo in accordo al minor grado di steatosi a livello epatico. L'aumento della conduttanza protonica basale ed indotta nei mitocondri dei ratti F, può avere un'ulteriore importante implicazione nello sviluppo di un minor grado di steatosi rispetto ai ratti L. Infatti, un leggero disaccoppiamento mitocondriale può portare ad una riduzione della produzione dei ROS<sup>41</sup>. E' noto che i mitocondri sono la principale fonte di produzione di ROS e che questi (sempre presenti, anche in situazioni fisiologiche) aumentano quando il gradiente protonico, ai lati della membrana mitocondriale, si eleva raggiungendo una certa soglia. La produzione di ROS quindi correla con il potenziale di membrana e anche piccole variazioni nel potenziale di membrana possono avere ampi effetti sulle velocità di produzione dei ROS. L'abbassamento del potenziale di membrana mitocondriale (e quindi del gradiente protonico ai lati della membrana) nei ratti F non permetterebbe il raggiungimento della soglia del potenziale di membrana necessaria per aumentare la produzione di ROS. Invece nei mitocondri dei ratti L la produzione di ROS avverrebbe in maniera più massiva a causa dell'aumento del potenziale di membrana (riscontrato nella conduttanza protonica indotta) che porterebbe a superare tale valore soglia. Il lieve disaccoppiamento trovato nei mitocondri dei ratti F, quindi, potrebbe contribuire a ridurre la produzione dei ROS attraverso la diminuzione del potenziale di membrana. La riduzione della produzione dei ROS, insieme ad una più veloce ed inefficiente ossidazione degli acidi grassi, potrebbe spiegare il minor grado di steatosi che si osserva nei ratti alimentati con dieta iperlipidica ricca in olio di pesce rispetto ai ratti alimentati con la dieta ricca in lardo. I risultati di queste analisi dimostrano che diete iperlipidiche contenenti dosi elevate di olio di pesce (acidi grassi omega-3) portano ad un minore sviluppo dell'obesità ed ad un minore sviluppo della steatosi epatica rispetto a diete iperlipidiche contenenti dosi elevate di lardo (acidi grassi saturi). I ratti

alimentati con diete iperlipidiche ricche in olio di pesce, mostrano una maggiore funzionalità mitocondriale (aumento dell'ossidazione lipidica e diminuzione dell'efficienza mitocondriale) ed un minore stress ossidativo, rispetto ai ratti alimentati con diete ricche in lardo. Una migliore funzionalità mitocondriale può essere un meccanismo attraverso il quale gli acidi grassi omega-3 porterebbero ad un minore sviluppo della steatosi. Tenendo in considerazione che l'obesità indotta da diete iperlipidiche aumenta considerevolmente la probabilità d'insorgenza dell'insulino-resistenza, nel mio lavoro sperimentale ho ritenuto interessante indagare anche in tal senso. L'insulino-resistenza è una condizione che prelude al diabete e che si innesca quando, per motivi diversi, la cellula resiste all'azione dell'insulina. Quindi sono andato a valutare se il diverso contenuto in acidi grassi della dieta iperlipidica può influenzare in maniera differente la tolleranza al glucosio. Ho quindi valutato l'indice HOMA (indice di resistenza all'insulina) e la tolleranza al carico orale di glucosio. I risultati ottenuti indicano che l'indice HOMA aumenta nei ratti L rispetto ai ratti N, mentre nei ratti F è simile a quello dei controlli. Questo è il risultato di un aumento sia dei livelli basali di glucosio che di insulina nei ratti L, mentre nei ratti F sono più bassi i livelli di insulina necessari a mantenere i livelli di glucosio simili a quelli dei ratti L, indicando una minore resistenza all'insulina nei ratti F rispetto agli L. Questo dato è confermato anche dal test di tolleranza al glucosio mediante curva da carico. I risultati ottenuti indicano che, in seguito ad un carico orale di glucosio, i valori di glicemia riferiti ai ratti L nell'arco dei successivi 180 minuti restano elevati così come i livelli di insulina, a dimostrazione del fatto che i ratti alimentati con dieta iperlipidica, non solo hanno una maggiore secrezione di insulina, ma tale aumento non riesce comunque a riportare le concentrazioni di glucosio alla normalità nell'arco dei 180 minuti e per questo anche le aree sotto la curva (AUC) risultano più ampie rispetto ai ratti N. L'insulina non riesce ad agire ed a favorire l'ingresso di glucosio nelle cellule, pertanto i suoi livelli nel sangue si mantengono elevati. Da ciò si deduce che la tolleranza al glucosio nei ratti L è diminuita. Nei ratti F, invece, anche se l'andamento della glicemia in risposta al carico di glucosio è simile a quello riscontrato nei ratti L, come si evince dai valori simili di AUC, l'andamento dei livelli di insulina è simile a quello dei ratti N, questo determina una maggiore tolleranza al glucosio rispetto ai ratti L ed un valore di AUC inferiore. Dal momento che lo stato di insulino-resistenza è associato con una diminuita attivazione della fosfatidilinositolo 3'-chinasi (PI3K) e del suo substrato a valle, la PKB/Akt, ho determinato lo stato di fosforilazione di quest'ultima proteina nel muscolo scheletrico, essendo l'organo maggiormente coinvolto nell'insulino-resistenza. Questa proteina chinasi serina/treonina è un mediatore cruciale dell'azione dell'insulina. La sua attivazione contribuisce a regolare l'uptake di glucosio, il metabolismo del glicogeno, l'espressione genica, la sopravvivenza delle cellule e, quindi, la loro proliferazione e protezione dall'apoptosi. La diminuita tolleranza al glucosio che caratterizza i ratti L è evidenziata anche da

una ridotta fosforilazione dell'Akt. L'insulina non riesce ad agire e, quindi, ad avviare la via di trasduzione del segnale. Effetto di questa mancata attivazione è l'impossibilità della PI3K a favorire la fosforilazione della PKB. Nei ratti F, invece, la maggiore fosforilazione dell'Akt, favorita dal trattamento con una dieta ricca in acidi grassi omega-3, evidenzia un'aumentata sensibilità all'insulina e, quindi, un'aumentata tolleranza al glucosio. Dato che l'insulino-resistenza, a livello del muscolo, è correlata anche a danno mitocondriale e stress ossidativo, ho indagato in tal senso andando a valutare beta ossidazione e attività della CPT, efficienza energetica e attività dell'enzima aconitasi. Per quanto riguarda i mitocondri muscolari ho isolato entrambe le popolazioni IMF ed SS, ma ho illustrato solo i dati ottenuti sui mitocondri SS perché per gli IMF non ho riscontrato nessuna variazione significativa tra i tre gruppi di ratti. Questo probabilmente è dovuto al fatto che gli IMF per la loro localizzazione sono deputati a formare ATP essenzialmente per la contrazione muscolare, mentre gli SS probabilmente sono deputati a formare ATP per le funzioni metaboliche cellulari e quindi sono quelli che possono essere maggiormente influenzati dal variare delle condizioni nutrizionali. I risultati ottenuti mostrano che la respirazione nei mitocondri SS dei ratti F è maggiore rispetto ai ratti L e quindi gli omega 3 preservano la funzionalità mitocondriale. Inoltre sia nei ratti L che nei ratti F si ha un aumento della velocità di ossidazione degli acidi grassi rispetto ai ratti N, probabilmente per fronteggiare il maggiore flusso di acidi grassi provenienti dalla dieta. Nei ratti L però l'efficienza energetica è maggiore (la conduttanza protonica indotta è minore) rispetto ai ratti N e F, questo indica che i ratti L consumano meno substrati per produrre la stessa quantità di ATP rispetto ai ratti N e F. Quindi al maggior afflusso di substrati grassi i ratti L rispondono consumando di meno e quindi rendendoli più disponibili al deposito rispetto ai ratti F. I risultati indicano, quindi, che una dieta iperlipidica ricca in lardo determina una maggiore efficienza, nell'utilizzo dei substrati, nei mitocondri muscolari SS dei ratti L rispetto agli N, e quindi una minore ossidazione di grassi per trarre energia e un conseguente maggiore deposito come trigliceridi nel tessuto adiposo. Questa situazione comporta una maggiore obesità e instaura le condizioni per una resistenza all'insulina e minore tolleranza al glucosio, con possibile rischio di sindrome metabolica. Nei ratti alimentati con dieta iperlipidica ricca in acidi grassi omega 3, si determina una minore efficienza mitocondriale rispetto ai ratti L. Quindi la maggiore conduttanza protonica osservata nei ratti F rispetto agli L è un modo per disperdere il gradiente protonico utile per produrre ATP sottoforma di calore e per bruciare una maggiore quantità di grassi per produrre la stessa quantità di ATP. Le variazioni dell'efficienza energetica mitocondriale a livello muscolare possono anche contribuire alle variazioni riscontrate nell'efficienza energetica corporea, poiché i mitocondri sono la centrale energetica della cellula. L'efficienza energetica dei mitocondri SS, come quella corporea, aumenta nei ratti L rispetto agli N e diminuisce nei ratti F rispetto agli L. Quindi i mitocondri SS variando



la propria efficienza energetica contribuiscono alla variazione dell'efficienza energetica corporea. Tenendo presente che lo stress ossidativo svolge un importante ruolo nella patogenesi dell'insulino-resistenza, ho ritenuto interessante valutare, anche in questa patologia, come indice di stress ossidativo l'attività dell'aconitasi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i ratti L mostrano un incremento dello stress ossidativo mitocondriale, come evidenziato dall'inibizione dell'attività dell'enzima aconitasi, rispetto ai ratti N, mentre i ratti F hanno mostrato un rapporto più alto rispetto agli L. Una minore resistenza all'insulina nei ratti F rispetto ai ratti L è anche confermata dai risultati ottenuti con la metodica istologica PAS, che ha permesso di determinare la presenza di glicogeno nel muscolo. Le sezioni di muscolo trattate con metodica PAS, evidenziano che nel muscolo la sensibilità all'insulina cambia nei tre gruppi di ratti, infatti nei ratti L la presenza di glicogeno è nettamente inferiore al deposito di glicogeno evidenziato nei ratti N, mentre nei ratti F si ha la presenza di depositi simili ai ratti N, indicando che la qualità dei grassi omega 3 è fondamentale per avere una minore resistenza all'insulina. Inoltre dato che l'obesità, la steatosi epatica e l'insulino-resistenza sono caratterizzate da un certo grado di infiammazione e ER stress, come mostrato dall'analisi dei livelli ematici del fattore infiammatorio TNF-alfa, ho misurato preliminarmente a livello epatico, markers specifici predittivi di questo stato patologico. Studi scientifici, hanno dimostrato che l'infiammazione e l'ER stress del tessuto adiposo sono il preludio dello sviluppo di tali processi anche negli altri distretti non adiposici (fegato e muscolo), e loro correlazione con steatosi epatica e insulino-resistenza<sup>114</sup>. Su questa base ho valutato l'effetto delle diete iperlipidiche sull'insorgenza dell'infiammazione e dell'ER stress, andando a determinare, mediante western blot, l'espressione di fattori chiave quali MCP-1, TGF- $\beta$ , BIP e eIF-2 $\alpha$  a livello epatico. Le analisi hanno mostrato che nel fegato dei ratti a dieta con lardo c'è un più alto contenuto in MCP-1 e TGF- $\beta$ , rispetto agli altri due gruppi di ratti, indicando un più alto grado d'infiammazione e di steatosi, nonché una maggiore predisposizione all'evolversi di queste patologie in stadi più avanzati quali fibrosi e cirrosi. Nei ratti a dieta con omega 3, invece, i livelli di questi fattori sono più bassi, indicando una maggiore protezione degli acidi grassi polinsaturi omega 3 da processi infiammatori. Inoltre una minore espressione di BIP e una maggiore presenza di eIF2- $\alpha$  fosforilato nel fegato dei ratti F sono indice di un minor ER stress rispetto ai ratti L. Questi risultati sono in accordo con i dati riportati in letteratura che indicano gli effetti benefici degli acidi grassi omega-3.<sup>150</sup> Inoltre, essi aprono ulteriori prospettive nel campo della ricerca sugli effetti dell'olio di pesce dimostrando che, anche quando viene somministrato in dose massiva, come nel nostro disegno sperimentale, attraverso diete iperlipidiche, porta ad un minore sviluppo dell'obesità e ad una ridotta insorgenza, rispetto a diete iperlipidiche contenenti elevate dosi di lardo (acidi grassi saturi), di alcune patologie ad esse correlate (iperlipidemie, steatosi epatica, insulino-resistenza ed ER stress).

## BIBLIOGRAFIA CITATA

(in grassetto la bibliografia consultata)

- <sup>1</sup> Nair K. *J. Clin. Endocrin. Metab.* (1987) **64**: 896-900.
- <sup>2</sup> **Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC. *J. Med.* (1988) **318**: 467-472.**
- <sup>3</sup> Pi-Sunyer F. X, Segal KR. et al. Eds. *Energy Metabolism: Tissue Determinants and Cellular Corollaries. New York: Raver Press* (1992) 187-210.
- <sup>4</sup> **Flat SP. In: Bjornterpond P, Brodoff BN. Eds. *Obesity Philadelphia: Lippincot JB. Company* (1992) **100-116.****
- <sup>5</sup> Samaras TT, Storms LH, Elrich H. *Ageing. Res. Rev.* (2002) **1** (4): 673-691.
- <sup>6</sup> **Petersen KF, Shulman GI. *Am. J. Med.* (2006) **119**: 10S-16S.**
- <sup>7</sup> Dobryniewski J, Szajda SD, Waszkiewicz N, Zwierz K. *Przegl Lek.* (2007) **64** (2): 91-9.
- <sup>8</sup> Adam O, et al. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* (2008) **79**: 177-81.
- <sup>9</sup> Simopoulos AP, et al. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* (2000) **63** (3): 119-121.
- <sup>10</sup> Ramakrishnan U, Imhoff - Kunsch B, et al. *Am J Clin Nutr.* (2009) **89** (3): 958S-962S.
- <sup>11</sup> **Valentine RC, Valentie DL. *Prog Lipid Res* (2004) **43**:383-402.**
- <sup>12</sup> **Bang HO, Deyeberg J, Horne N. *Acta Med Scand* (1976) **200**:69-73.**
- <sup>13</sup> Youdim KA, Martin A, Joseph JA. *Int J Develop Neurosci* (2000) **18**: 383-399.
- <sup>14</sup> **Koletzko B, Lien E., Agostoni C., et al. *Journal of perinatal medicine.* (2008) **36**: 1-14.**
- <sup>15</sup> Aksoy Y, Aksoy H, et al. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* (2006) **75**: 75-79.
- <sup>16</sup> Smuts CM, Huang M, et al. *Obstet Gynecol.* (2003) **101** (3): 469-479.
- <sup>17</sup> Olsen S F, Secher N J. *BMJ* (2002) **324**: 447.
- <sup>18</sup> Kim HH, Cho S, et al. *J. Lipid Res.* (2006) **47**: 921-930.
- <sup>19</sup> **Uauy R, Mena P, Rojas C. *Proc Nutr Soc* (2000) **59**: 3-15.**
- <sup>20</sup> Vogel RA. *Clin Cardiol.* (1999) **22** (6suppl): II34–II39.
- <sup>21</sup> **Calder PC. *Clin Sci* (2004) **107**(1): 1-11.**
- <sup>22</sup> Harris WS, Windsor SL, Dujovne CA. *J Am Coll Nutr* (1991) **10**: 220-227.
- <sup>23</sup> **Nenster MS, Rustan AC, et al. *Arterioscler Thromb* (1992) **12** (3): 369-379.**

- <sup>24</sup> Price PT, Nelson CM, Clarke SD. *Curr Opin Lipidol* (2000) **11** (1): 3-7.
- <sup>25</sup> **Roach PD, Kambouris AM, et al. *Febs Lett* (1987) **222** (1): 159 -162.**
- <sup>26</sup> **Alexander CM, Landsman PB, et al. *Diabetes* (2003) **52** (5): 1210-1214.**
- <sup>27</sup> Mozaffarian D, Rimm EB. *Jama* (2006) **296**: 1885-1899.
- <sup>28</sup> Innis S, Palaty J, Vaghri Z, Lockitch G. *The Journal of Pediatrics*, (2006) **148**: 759-763.
- <sup>29</sup> **Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. *Gastroenterology* (2002) **122**: 1649-1657.**
- <sup>30</sup> Neuschwander-Tetri BA, Caldwell S. *Hepatology* (2003) **37**: 1202-1219.
- <sup>31</sup> **Marchesini G. *Diabetes* (2001) **50**: 1844-1850.**
- <sup>32</sup> Franzese A, Vajro P, Argenziano A, et al. *Dig Dis Sci* (1997) **42**: 1428-1432.
- <sup>33</sup> **Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, and Giacca A. *Endocr. Rev* (2002) **23**: 201-229.**
- <sup>34</sup> Browning JD, Horton JD. *J. CLin. Invest.* (2004) **114**: 147-152.
- <sup>35</sup> Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. *Cell* (1994) **79**: 1147-1156.
- <sup>36</sup> Chao L. *J. CLin, Invest.*(2000) **106**: 1221-1228.
- <sup>37</sup> Koopman WJ, Nijtmans LG, et al. *Antioxid Redox Signal.* (2010) **12** (12): 1431-70. Review.
- <sup>38</sup> Tamitsuka E, Kita K, Esumi H. *Phys Biol. Sci* 2009 **85** (7): 258-65.
- <sup>39</sup> Carbajo R J, Kellas FA, et al. *Mol. Biol.* (2005) **351**: 824-838.
- <sup>40</sup> **Brand MD. *Biochim. Biophys. Acta.* (1990) **1018**: 128-133.**
- <sup>41</sup> **Brand MD, Chien LF, et al. *Biochim. Biophys. Acta* (1994) **1187**: 132-139**
- <sup>42</sup> Rolfe DF, Brand MD. *Am. J. Physiol.* (1996) **271**: C1380-C1389.
- <sup>43</sup> Soboll S, Grundel S, Schwabe U, Scholtz R. *Eur J Biochem* (1984) **141**: 231-236.
- <sup>44</sup> Wojtczak L. *J. Bioenerg. Biomembr.* (1976) **8**: 293-311.
- <sup>45</sup> Wojtczak L, Schönfeld P. *Biochim. Biophys. Acta* (1993) **1183**: 41-57.
- <sup>46</sup> Hulsmann WC, Elliot WB, Slater EC. *Biochim. Biophys. Acta* (1960) **39**: 267-276
- <sup>47</sup> Zborowski J, Wojtczak L. *Biochim. Biophys. Acta* (1963) **70**: 596-598.
- <sup>48</sup> Wrigglesworth JM, Sharpe MA, Cooper C.E. *Biochem. Soc. Trans.* (1993) **21**: 781-784.
- <sup>49</sup> Dedukhova VI, Mokhova EN, et al. *FEBS Lett.* (1991) **295**: 51-54.
- <sup>50</sup> Schönfeld P. *FEBS Lett.* (1990) **264**: 246-248.

- <sup>51</sup> Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2002) **293**: 1145-1152
- <sup>52</sup> Fleury C, Nevrrora M, et al *Nat. Genet.* (1997) **15**: 269-272.
- <sup>53</sup> Boss O, Samec S, Paolini Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. *FEBS Lett.* (1997) **408**: 39-42.
- <sup>54</sup> Mao W, Yu XX, Zhong W, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan J. *FEBS Lett.* (1999) **443**: 326-330
- <sup>55</sup> Yu XX, Mao W, Zhong W, Schow P, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan J. *FASEB J.* (2000) **14**: 1611-1618.
- <sup>56</sup> Zborowski J, Wojtczak L. *Biochim Biophys. Acta* (1963) **70**: 596-598
- <sup>57</sup> Wrigglesworth JM, Sharpe MA, Cooper CE. *Biochem Soc Trans* (1993) **21**: 781-784
- <sup>58</sup> Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, et al. *Pflügers Arch (Eur J. of Physiology)* (2002) **445**: 431-436
- <sup>59</sup> Dedukhova VI, Mokova EN, Skulachev VP, Starkov AA, et al. *FEBS Letters* (1991) **295**: 51-54
- <sup>60</sup> Freake HC, Oppenheimer JH. *Annu Rev Nutr* (1995) **15** : 263-291
- <sup>61</sup> **Vasquez- Vivar J, et al. *J Biol Chem.* (2000) 275: 14064-14069.**
- <sup>62</sup> Longo VD, Viola KL, Finch CE. *J Neurochem* (2000) **75**: 1977-1985.
- <sup>63</sup> Wallace DC. *Science* (1992) **256**: 628-632.
- <sup>64</sup> Quant PA, Robin D, Robin P, Ferre P, et al. *Eur J Biochem* (1991) **195**: 149-154.
- <sup>65</sup> Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. *Biochim Biophys Acta* (2009)**1804**(2): 245-62.
- <sup>66</sup> **Kulinskii VI, Kolesnichenko LS. *Biomed Khim* (2009) 55 (3): 255-77.**
- <sup>67</sup> Battin EE, Brumaghim JL. *Cell Biochem Biophys* (2009) **55** (1): 1-23.
- <sup>68</sup> **Pessayre D, Fromenty B. *Hepatology* (2005) 42: 928-940.**
- <sup>69</sup> **Perez-Carreras M., Del Hoyo P., et al. *Hepatology* (2003) 38: 999-1007.**
- <sup>70</sup> **Begrliche K, Igoidjil A, Pessayre D, Fromenty B. *Mitochondrion* (2006) 6: 1-28.**
- <sup>71</sup> Berson A, De Beco V, Letteron P, et al. *Gastroenterology* (1998) **114**: 764-774.
- <sup>72</sup> Eaton S. *Prog Lipid. Res* (2002) **41**: 197-239.
- <sup>73</sup> Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. *Mol. Pharmacol.* (1995) **48**: 825-834.
- <sup>74</sup> Yang S., et al. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **378**: 259-268.

- <sup>75</sup> Seki S., et al. *J. Hepatol.* (1999) **37**: 56-62 .
- <sup>76</sup> Schulz H. *Biochim. Biophys. Acta* (1991) **1081**: 109-120.
- <sup>77</sup> Kersten S, et al. *J. Clin. Invest.* (1999) **103**: 1489-1498
- <sup>78</sup> Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. *FEBS Lett.* (1997) **416**: 15-18.
- <sup>79</sup> Esterbauer H, Schaur RJ, and Zollner H. *Free Radic. Biol. Med.* (1991) **11**: 81-128.
- <sup>80</sup> Pan M, et al. *J. Clin. Invest.* (2004) **113**: 1277-1287.
- <sup>81</sup> **Videla LA. et al. *Clin. Sci.* (2004) **106**: 261-268.**
- <sup>82</sup> [www.minerva.unito.it/storia/insulina/insulina\\_struttura.htm](http://www.minerva.unito.it/storia/insulina/insulina_struttura.htm)
- <sup>83</sup> **Marino-Buslje C, Martin-Martinez M, et al. *Biochem. Soc. Trans.* (1999) **27** (4): 715-726.**
- <sup>84</sup> Kavanaugh WM, Williams LT. *Science* (1994) **266**: 1862-1865.
- <sup>85</sup> Cantley LC. *Science* (2002) **296**: 1655-1657
- <sup>86</sup> Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. *Curr. Biol.* (1997) **7**: 261-269.
- <sup>87</sup> **Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, et al. *Science* (1997) **277**: 567-570.**
- <sup>88</sup> Vanhaesebroeck B, Alessi DR. *Biochem. J.* (2000) **346**: 561-576.
- <sup>89</sup> Sasaki K, Sato M, Umezawa Y. *J. Biol. Chem.* (2003) **278**: 30945-51.
- <sup>90</sup> **Walker KS, Deak M, Paterson A, et al. *Biochem. J.* (1998) **331**: 299-308.**
- <sup>91</sup> Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovic M, Hemmings BA. *Nature* (1995) **378**: 785-789.
- <sup>92</sup> Holman GD, Kasuga M. *Diabetes* (1997) **40**: 991-1003.
- <sup>93</sup> Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. *Diabetes* (1998) **47**: 1006-1013.
- <sup>94</sup> **Ueki K, Yamamoto-honda R, et al. *J. Biol. Chem.* (1998) **273**: 5315-5322.**
- <sup>95</sup> **Nascimento EBM, Fodor M, et al. *Diabetes* (2006) **55**: 3221-3228.**
- <sup>96</sup> Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. *Genes Dev* (1999) **13**: 2905-2927.
- <sup>97</sup> Schwertferger KL, Richert MM, Anderson SM. *Mol Endocrinol.* (2001) **15**( 6): 867-881.
- <sup>98</sup> Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. *Science* (1998) **282**: 1318-1321.
- <sup>99</sup> Ohba N, Kiryu-Seo S, Maeda M, et al. *Neurosci. Lett.* (2004) **359**: 159-162.
- <sup>100</sup> **Petersen KF, Shulman GI. *Am. J. Med.* (2006) **119**: 10S-16S.**
- <sup>101</sup> Chase HP, Voss MA, Butler-Simon N, et al. *J Pediatrics* (1987) **111**: 807-812.

- <sup>102</sup> Robert JJ, Deschamps I, Chevenne D, et al. *Diabetes* (1973) **22**: 718-723.
- <sup>103</sup> Bjomtorp P. *Diabetes Care* (1991) **14**: 1132-1143.
- <sup>104</sup> O'Railly S, Moller DE. *Clin Endocrinol* (1992) **36**: 121-132.
- <sup>105</sup> Stern MP. *Diabetes* (1995) **44**: 369-374.
- <sup>106</sup> **Reaven GM. In "Diabetes" (1988) 37: 1595-1607.**
- <sup>107</sup> **Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, et al. *J. Biol. Chem.* (1994) 269: 3568-3573.**
- <sup>108</sup> Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, et al. *J. Clin. Invest.* (1999) **103**: 253-259.
- <sup>109</sup> **Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, et al. *Diabetes* (1999) 48: 1270-1274.**
- <sup>110</sup> Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, et. al. *J. Clin. Invest.* (2004) **114**: 823-827.
- <sup>111</sup> Previs SF, Withers DJ, et al. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**: 38990-38994.
- <sup>112</sup> **Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 32345-32353.**
- <sup>113</sup> Neschen S, Morino K, Hammond LE, et al. *Metab.* (2005) **2**: 55-65.
- <sup>114</sup> **Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (2009) 19: 146-152**
- <sup>115</sup> Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, et al. *J Clin. Invest* (2003) **112**: 1796-808.
- <sup>116</sup> Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. *J Clin Invest* (2003) **112**: 1821-30.
- <sup>117</sup> Skurk T, Heder C, Kräfft I, et al. *Endocrinology* (2005) **146**: 1005-11
- <sup>118</sup> **Mollica MP., Lionetti L., Putti R., Cavaliere G., Gaita M., Barletta A. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, in press.**
- <sup>119</sup> Araki E, Oyadomari S, Mori M. *Experimental Biology and Medicine* (2003) **228**:1213-1217.
- <sup>120</sup> Kaneto H, Xu G, Song KH, Suzuma K, et al. *J Biol Chem* (2001) **276** (33): 31099-104.
- <sup>121</sup> **Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, et al. *J Mol Med* (2005) 83:429-439.**
- <sup>122</sup> Harding HP, Zeng H, Zhang Y, et al. *Mol Cell* (2001) **7**(6): 1153-1163.
- <sup>123</sup> Delépine M, Nicolino M, Barrett T, et al. *Nature Genet* (2000) **25**: 406-409.
- <sup>124</sup> Shi Y, Taylor SI, Tan SL, Sonenberg N. *Endocr Rev* (2003) **24**: 91-101.
- <sup>125</sup> Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, et al. *Mol Cell* (2001) **7**: 1165-1176.
- <sup>126</sup> Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, et al. *J Biol Chem* (2005) **280**: 847-851.

- <sup>127</sup> Karaskov E, Scott C, et al. *Endocrinology* (2006) **147**: 3398-407
- <sup>128</sup> **Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. *J Biol. Chem* (1990) **265**: 16880-5**
- <sup>129</sup> Hajduch E, Balendran A, Batty IH, Litherland GJ, et al. *Diabetologia* (2001) **44**: 173-83
- <sup>130</sup> Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. *J. Clin. Invest.* (2006) **116**: 1793-801
- <sup>131</sup> Pietsch J, Batra A, Stroh T, Fedke I, Glauben R, et al. *Ann N Y Acad Sci* (2006) **1072**: 407-9
- <sup>132</sup> **Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, et al. *J. Biol. Chem.* (2003) **278**: 10297-303.**
- <sup>133</sup> Mantens SK, Vaughan DP, Andringa KK, et al. *Biochem. J.* (2009) **417**: 183–193
- <sup>134</sup> **Folch J, Lees M. *Biol Chem* (1957) **226**: 497-509.**
- <sup>135</sup> Summermatter S, Mainieri D, Russel A.P, et al. *The FASEB Journal* (2008) **22** (3): 774-85.
- <sup>136</sup> Golbahar J, Aminzadeh MA, Kassab SE, Omrani GR. *Diabetes res clin pract.* (2007) **76**: 1-5.
- <sup>137</sup> Laemmli UK. *Nature* (1970) **227**(5259) : 680-5.
- <sup>138</sup> **Liverini G, Iossa S, Barletta A. *Comp. Biochem. Physiol. B.* (1991) **98**: 583-585.**
- <sup>139</sup> **Srere PA. *Meth Enzymol* (1969) **13**: 3-5**
- <sup>140</sup> **Estabrook RW. *Methods Enzymol.* (1967) **10**: 41-47.**
- <sup>141</sup> Nedergaard J. *Eur. J. Biochem.* (1983) **133**: 85-191
- <sup>142</sup> Richieri GV, Anel A, Kleinfeld AM. *Biochemistry* (1993) **32**: 7574-7580.
- <sup>143</sup> Alexson SE, Nedergaard J. *J Biol Chem* (1988) **263** (27): 13564-13571.
- <sup>144</sup> **Gardner PR. *Methods Enzymol.* (2002) **349**: 9-23.**
- <sup>145</sup> Fridovich I. *Annu. Rev. Biochem.* (1995) **64**: 97-112.
- <sup>146</sup> Drapier IC, Hibbs JB Jr. *Methods Enzymol.* (1996) **269**: 26-36.
- <sup>147</sup> Bang HO, Deyeborg J, Horne N. *Acta Med Scand* (1976) **200**: 69-73.
- <sup>148</sup> Brady LJ, Brady PS, Romsos DR and Hoppel CL. *Biochem. J.* (1985) **231**: 439-444.
- <sup>149</sup> **Louet JF, Chatelain F, Decaux JF, Park EA, et al. *Biochem. J.* (2001) **354**: 189-197.**
- <sup>150</sup> Harris WS, Windsor SL, Dujovne CA. *J Am Coll Nutr* (1991) **10**: 220-227.

Un sincero ringraziamento a chi,  
in questo lungo percorso, mi ha sostenuto,  
sia moralmente che scientificamente, contribuendo  
alla mia crescita personale e lavorativa.