

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



Tesi di Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale Ciclo XXIV

COORDINATORE: Prof. Gianni Marone

**Modulazione da parte dei nutrienti dell'espressione dei geni del
metabolismo ossidativo nel muscolo scheletrico di soggetti sani e di
pazienti con Diabete Mellito tipo 2**

Tutor

Prof.ssa A. A. Rivellese

Dottoranda

Dott.ssa Anna Amelia Turco

INDICE

Introduzione	pag 4
1. Insulina e metabolismo energetico	pag4
1.1 L'insulina	pag 4
1.2 Flessibilità metabolica	pag 10
2. Insulino-resistenza	pag 11
3. Mitocondri	pag 17
3.1 La capacità ossidativa dei mitocondri del muscolo scheletrico	pag 17
3.2 Geni che regolano i processi ossidativi mitocondriali	pag 23
3.3 Il Controllo dell'espressione genica	pag31
3.4 Fattori che regolano la funzione mitocondriale	pag 32
4. Insulinoresistenza e disfunzione mitocondriale: quid prius?	pag 33
4.1 Fattori genetici	pag 35
5. Fattori Ambientali e funzione mitocondriale	pag 36
5.1 Attività fisica	pag 36
5.2 Nutrienti	pag 37
5.3 Grassi alimentari	pag39
6. Scopo della ricerca	pag 42
7. Studio 1	pag43
7.1 Disegno sperimentale	pag 43
7.1.1 Soggetti	pag 43
7.1.2 Procedura sperimentale	pag 44
7.1.3 Composizione dei pasti	pag 44
7.1.4 Metodi analitici	pag 46

7.1.5 Aspirato muscolare con ago sottile “Fine needle aspiration (FNA)”	pag 46
7.1.6 Estrazione dell’acido nucleico	pag 47
7.1.7 Tecnica “Multiplex Tandem Real Time PCR”	pag 47
7.2 Analisi Statistica	pag 49
7.3 Risultati	pag 49
7.3.1 Analisi dell'espressione dei livelli di mRNA muscolare	pag 50
7.4 Discussione	pag 54
8. Studio 2	pag 59
8.1 Disegno Sperimentale	pag 59
8.1.2 Soggetti	pag 59
8.1.3 Procedura sperimentale	pag 59
8.1.4 Programma di attività fisica	pag 62
8.1.5 Composizione delle diete	pag 62
8.1.6 Composizione dei pasti test	pag 62
8.1.7 Valutazioni durante pasto test	pag 63
8.1.8 Metodi analitici	pag 64
8.1.9 Aspirato muscolare con ago sottile “Fine needle aspiration (FNA)”	pag 64
8.2 Risultati	pag 64
8.2.1 Analisi dell'espressione dei livelli di mRNA muscolare	pag 68
8.3 Commenti	pag 72
Bibliografia	pag 73

Introduzione

L'insulino-resistenza è una condizione metabolica caratterizzata da una ridotta capacità dell'insulina di regolare efficacemente il metabolismo dei substrati energetici. Essa gioca un ruolo chiave nella patogenesi di molte condizioni patologiche, principalmente obesità e diabete tipo 2. Studi recenti hanno dimostrato che nei soggetti con insulino-resistenza i processi ossidativi del muscolo scheletrico sono alterati. Poiché il muscolo scheletrico è una delle principali sedi di insulino resistenza e i mitocondri sono la principale sede di ossidazione dei substrati, l'attenzione si è concentrata sullo studio della capacità ossidativa mitocondriale nel tentativo di chiarire la relazione tra funzione mitocondriale e sensibilità insulinica. Un importante contributo alla ricerca in questo ambito è stato fornito dallo studio del profilo trascrizionale dei geni che regolano la funzione mitocondriale e da evidenze della letteratura che evidenziano come l'attività mitocondriale e il controllo della sua espressione genica possano essere influenzati da fattori legati allo stile di vita, inclusi i fattori nutrizionali.

1. Insulina e Metabolismo Energetico

1.1 L'insulina

L'insulina è un ormone di natura proteica sintetizzato dal pancreas endocrino nelle cellule β delle *Isole di Langerhans* e costituito da due catene polipeptidiche, unite fra di loro da due ponti disolfuro. La presenza dei ponti disolfuro stabilisce la struttura tridimensionale dell'insulina, da cui dipende l'attività biologica dell'ormone.

Questo ormone è il principale fattore di regolazione del metabolismo e dell'accumulo dei substrati energetici introdotti con gli alimenti. L'insulina, la cui secrezione viene stimolata dall'ingresso del glucosio (e di alcuni aminoacidi) nelle cellule β -pancreatiche, facilita la captazione, l'utilizzazione e

l'immagazzinamento di glucosio, lipidi e aminoacidi. Al contrario, una riduzione dei livelli di insulina circolante determina la mobilizzazione delle riserve energetiche e la riduzione della captazione dei nutrienti (1).

I processi biochimici controllati dall'insulina sono localizzati in diversi distretti subcellulari che comprendono la membrana plasmatica (trasporto intracellulare di aminoacidi), il citoplasma e i mitocondri (metabolismo di glucidi, lipidi e proteine), il nucleo (trascrizione genica e proliferazione).

L'insulina esercita i suoi effetti biologici attraverso il legame ad uno specifico recettore di membrana che viene attivato e innesca a sua volta diversi segnali intracellulari, che mediano le varie azioni biologiche dell'ormone nei diversi tipi cellulari e nei diversi tessuti.

Il recettore dell'insulina è una glico-proteina costituita da due subunità α extracellulari che legano l'ormone e da due subunità β che invece attraversano la membrana e possiedono attività tirosina chinasi. Il legame dell'insulina alla subunità α , ne produce un cambiamento conformazionale con propagazione del segnale alla subunità β , si determina un processo di trans/auto-fosforilazione su alcuni residui di tirosina localizzati sul lato citoplasmatico delle due subunità β (2,3). Gli effetti metabolici dell'ormone sono determinati dalla fosforilazione in tirosina di proteine substrato del recettore (IRS-1), che svolgono una funzione di ancoraggio per la subunità regolatoria dell'enzima fosfatidil inositolo 3k (PI 3K); il legame di PI3K a IRS1 induce l'attivazione della subunità catalitica della PI3k che trasforma il fosfatidil inositolo (PI) in fosfatidil inositolo 3-fosfato (PI-3P). Quest'ultimo induce una cascata di fosforilazioni che coinvolge Akt e fa esprimere il trasportatore del glucosio (GLUT 4) a livello delle cellule bersaglio (4). Questa via è responsabile degli effetti dell'insulina sull'utilizzazione di glucosio, sintesi proteica e sintesi dei lipidi, mentre gli effetti sulla crescita cellulare e l'espressione genica sono regolati dall'attivazione di uno specifico segnale intracellulare che coinvolge il substrato recettoriale IRS2 (piuttosto che IRS1) e le MAP kinasi. Nelle cellule muscolari scheletriche la fosforilazione di MAPk in seguito allo stimolo insulinico è

seguita dalla migrazione di questa proteina nel nucleo, finalizzata alla trascrizione dei geni del GLUT1 e GLUT3 con aumento dei livelli di questi trasportatori del glucosio nella cellula. Il recettore dell'insulina attiva, tramite le proteine adattatrici Grb2/SOS, le Ras e quindi la cascata delle MAP chinasi che infine fosforilano fattori di trascrizione che mediano effetti a lungo termine (es. variazioni concentrazioni enzimi) (figura 1).

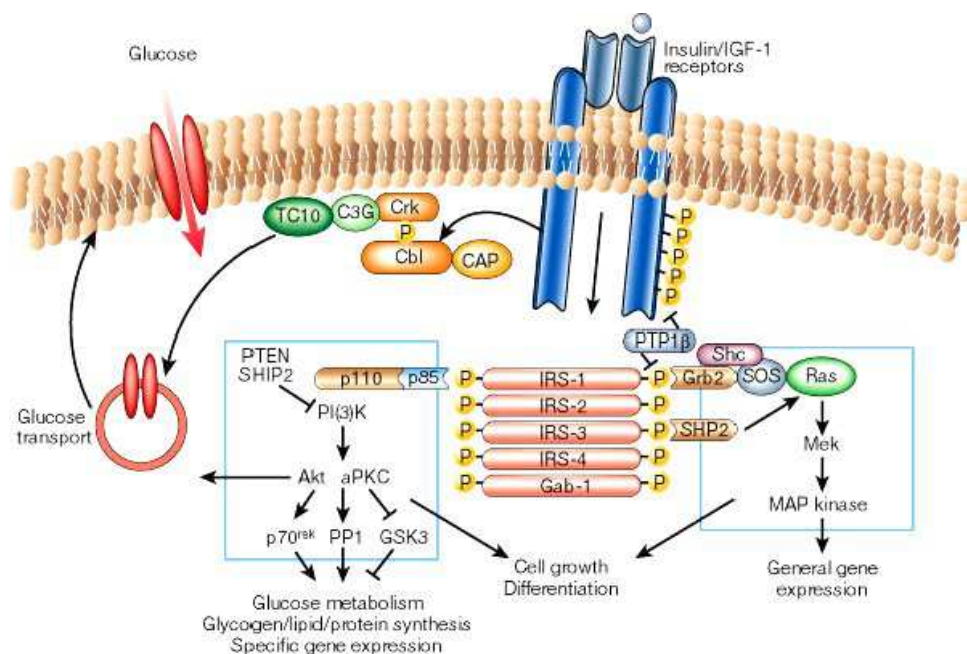


Figura 1 Effetti cellulari dell'insulina

I principali effetti dell'insulina sul metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine, si esplicano principalmente a livello di tre tessuti: il fegato, il tessuto adiposo e il muscolo. In ciascuno di questi tessuti gli effetti anabolici e anti-catabolici dell'insulina si potenziano a vicenda (figura 2.).

A livello delle cellule **epatiche** il trasporto del glucosio non è direttamente insulino-dipendente, in quanto negli epatociti, a differenza di quanto avviene nel muscolo e nel tessuto adiposo, entra in gioco un'altra classe di trasportatori per il glucosio definiti GLUT 2. Il numero di questi trasportatori è sempre costante nella membrana plasmatica. I GLUT2 sono trasportatori a bassa

affinità per cui la velocità del trasporto è direttamente proporzionale alla concentrazione del glucosio nel sangue. Perciò l'azione dell'insulina a livello epatico non interessa il trasportatore, ma riguarda essenzialmente l'attivazione e l'inibizione di un certo numero di enzimi che regolano l'omeostasi glicemica. Nel fegato gli effetti anabolici dell'insulina sono particolarmente evidenti: l'insulina inibisce l'attività degli enzimi coinvolti nella glicogenolisi, quali la fosforilasi, sopprime la neoglucogenesi attraverso l'inibizione degli enzimi chiave di questa via metabolica (glucosio 6-fosfatasi, fruttosio 1,6-bisfosfatasi, fosfoenolpiruvato carbossichinasi e piruvato carbossilasi) (5) e inibisce la formazione dei corpi chetonici, incrementando la trascrizione di enzimi glicolitici quali glucocinasi e piruvato chinasi. Inoltre, a livello epatico, l'insulina blocca la lipolisi mentre promuove la lipogenesi, ovvero la sintesi di acidi grassi, che poi vengono assemblati nelle VLDL (lipoproteine a bassissima densità) rilasciate nel sangue.

Nel **tessuto adiposo** l'insulina stimola la deposizione dei trigliceridi: favorendo la sintesi della lipoprotein lipasi facilita il processo di idrolisi dei trigliceridi circolanti di origine esogena ed endogena promuovendo l'ingresso dei lipidi nel tessuto adiposo (1). Favorisce la penetrazione intracellulare di glucosio con aumentata disponibilità di alfa glicerofosfato per l'esterificazione degli FFA in trigliceridi. A livello del tessuto adiposo l'insulina inibisce la lipolisi per inattivazione della triglicerido-lipasi e per contemporanea attivazione degli enzimi della via liposintetica; in caso di deficiente azione insulinica, come nel digiuno, viene attivata la lipolisi e inibita la via biosintetica degli acidi grassi.

Nel **muscolo scheletrico** il legame dell'insulina al suo recettore tirosin-chinasico promuove in tempi rapidi una maggiore captazione del glucosio circolante e la sua utilizzazione attraverso la via ossidativa (con produzione di H₂O e CO₂) e non ossidativa (con produzione di glicogeno). Il più importante trasportatore del glucosio stimolato dall'insulina è rappresentato dal GLUT 4. Il legame dell'insulina con il suo recettore, tramite la fosforilazione di diversi substrati intracellulari, stimola il trasferimento dei trasportatori del glucosio GLUT 4 dal citoplasma alla membrana cellulare, in

modo da aumentare il trasporto del glucosio. La captazione del glucosio da parte del muscolo riveste un ruolo preminente nel quadro dell'omeostasi glicemica in quanto l'85% del metabolismo glucidico insulino-mediato si verifica nel muscolo scheletrico. L'ormone stimola l'attività degli enzimi chiave della via non ossidativa (glicogeno-sintetasi) e della via ossidativa (gluco-chinasi, fosfofrutto-chinasi, e piruvato-chinasi).

A livello mitocondriale si verifica la maggiore produzione di energia tramite il ciclo di Krebs. La prima tappa per l'utilizzazione intra-mitocondriale del piruvato è quella catalizzata dalla piruvato deidrogenasi che trasforma il piruvato in acetil CoA. L'insulina attiva l'enzima defosforilandolo; in presenza di insulina, l'aumentata attività dell'enzima favorisce la formazione di acetil coA e l'ingresso dei carboidrati nel ciclo di Krebs.

Un'altra importante fonte energetica per l'attività muscolare è rappresentata dal metabolismo lipidico. Gli acidi grassi esterificati arrivano al muscolo dal torrente circolatorio e sono idrolizzati dalla lipoprotein-lipasi a livello della membrana capillare. La loro utilizzazione si verifica nel mitocondrio dopo che essi sono stati attivati ad acil CoA e trasportati all'interno del mitocondrio dal sistema della carnitina acil transferasi.

Per quanto concerne il metabolismo delle proteine, l'insulina tende ad aumentare le riserve proteiche nell'organismo attraverso molteplici meccanismi: 1) aumento della captazione tissutale degli aminoacidi, 2) stimolazione della sintesi proteica, 3) inibizione del catabolismo proteico e, infine, 4) ridotta ossidazione degli aminoacidi.

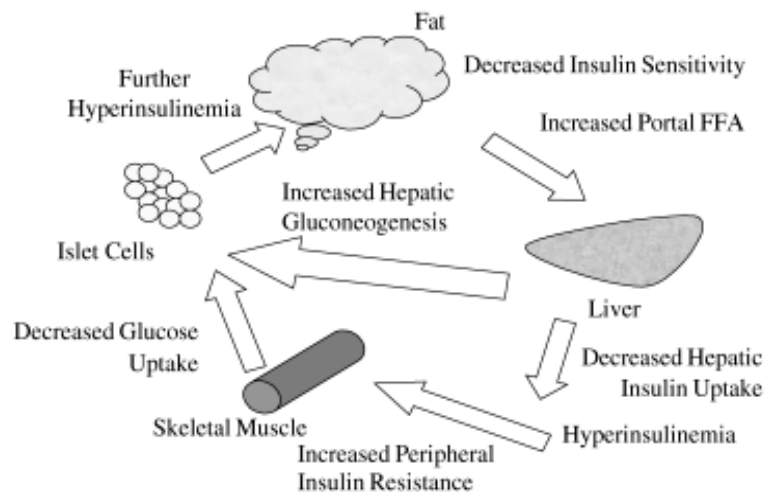


Figura 2 Effetti dell'insulina sugli organi bersaglio

Quando lo stato nutrizionale è in buon equilibrio si avranno aumentate concentrazioni ematiche di glucosio, aminoacidi, acidi grassi ed insulina: tale ormone favorisce il trasporto intracellulare di glucosio ed aminoacidi e la sintesi di macromolecole (glicogeno e proteine). In corso di digiuno, invece, si verifica una ridotta secrezione insulinica con ridotta sensibilità periferica all'ormone. Ciò determina un'aumentata immissione in circolo degli acidi grassi dai siti di deposito con aumento del loro trasporto e della loro ossidazione mitocondriale favorita dalla ridotta concentrazione di malonil coA che si verifica in assenza di substrati glucidici. L'ossidazione degli acidi grassi determina inibizione del flusso glicolitico.

L'insulina ha un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo intermedio, con importanti effetti sul metabolismo lipidico che potrebbero coinvolgere la funzione mitocondriale. La funzione mitocondriale muscolare è infatti emersa in anni recenti come un importante regolatore dall'azione insulinica con particolare riguardo all'utilizzazione del glucosio (6,7). L'evidenza che l'insulina è in grado di influenzare l'espressione genica e la funzione mitocondriale deriva da studi effettuati sia nell'animale che nell'uomo (8-10). Già nel 1999 Huang et al. riportarono che l'infusione acuta di insulina (due ore) induceva un aumento dei livelli di RNA relativi ad enzimi della catena

respiratoria quali l'NADH deidrogenasi e la citocromo c ossidasi (COX) (8). Successivamente Stump et al. hanno dimostrato un aumento della produzione mitocondriale di ATP nel muscolo vasto laterale di volontari sani, sottoposti per 8h ad infusione di insulina. L'aumentata produzione di ATP si associava ad aumento dei livelli di mRNA mitocondriale (NADH deidrogenasi) e nucleare (COX) che codificano per proteine mitocondriali nonché ad un incremento dell'attività enzimatica di COX e della citrato sintetasi (9). Boire et al hanno, tuttavia, dimostrato che tale upregulation non si manifesta su tutte le proteine ma solo su un pool specifico che è quello mitocondriale, suggerendo un effetto stimolante dell'insulina sulla capacità ossidativa mitocondriale (10).

1.2 Flessibilità metabolica

Il muscolo scheletrico svolge un ruolo fondamentale nel determinare la sensibilità insulinica in quanto esso è la principale sede di captazione del glucosio in condizioni di stimolazione insulinica, e l'entità della riduzione di questo processo determina il grado di severità dell'insulino-resistenza nelle più comuni malattie metaboliche come il diabete mellito tipo II e l'obesità.

In condizioni normali, il muscolo scheletrico si adatta a 2 condizioni fisiologiche opposte: ridotto intake di energia durante il digiuno e aumentata spesa energetica durante l'esercizio sostenuto, che dipende dall'ossidazione dei grassi. L'ossidazione dei grassi nel muscolo scheletrico è aumentata in soggetti magri e attivi (11).

Attraverso la misurazione del QR è stato dimostrato che nei soggetti magri, metabolicamente sani, il muscolo in condizioni di digiuno, ossida acidi grassi (QR 0.6-0.7). Negli stessi individui l'infusione insulinica sopprime l'ossidazione dei grassi e incrementa l'ossidazione del glucosio (QR 1). La capacità del muscolo di utilizzare alternativamente carboidrati o lipidi a seconda della disponibilità dei substrati energetici viene definita "flessibilità metabolica" (figura 3). Tale meccanismo è alterato nelle condizioni di insulino-resistenza.

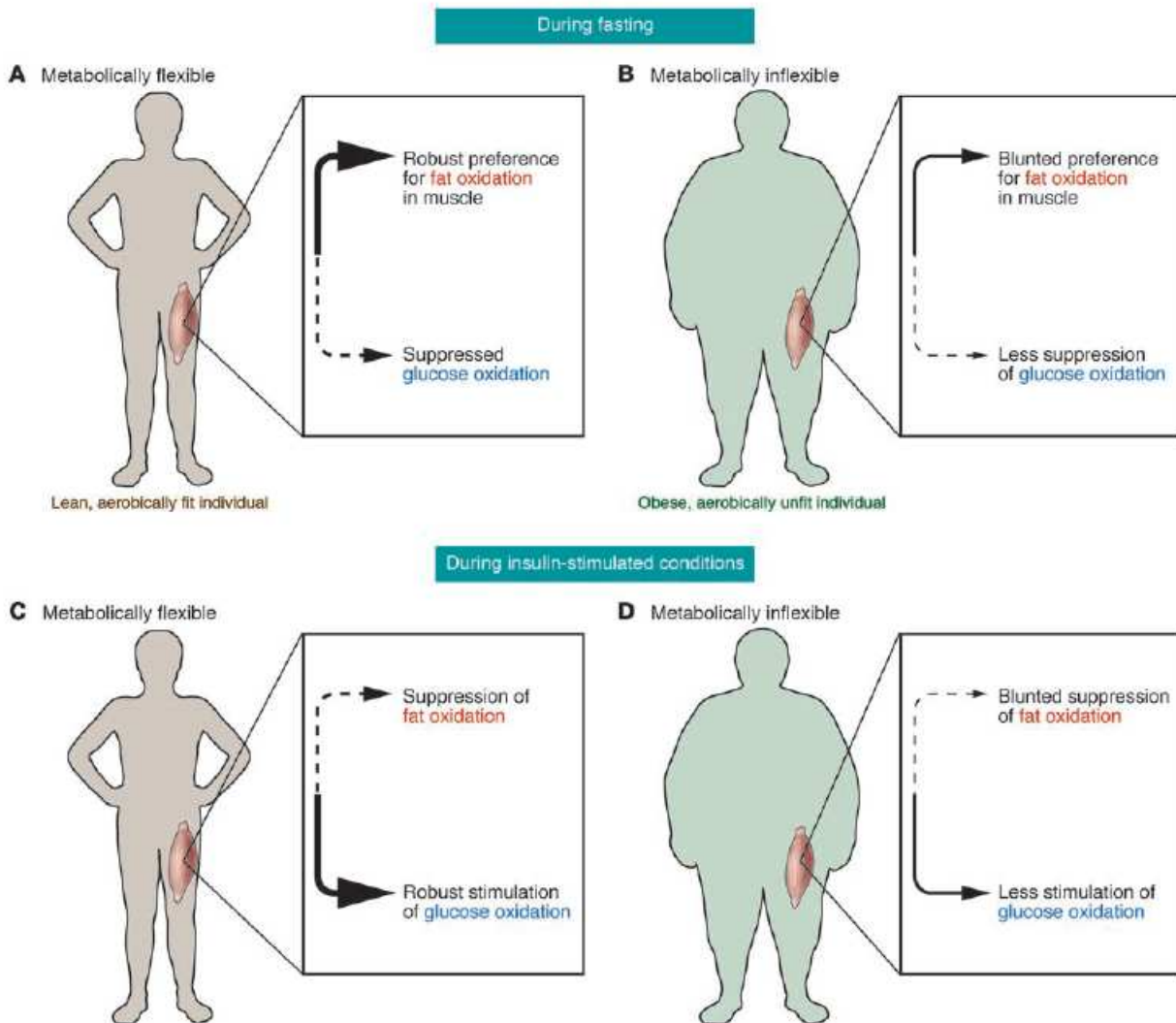


Figura 3 Capacità del muscolo scheletrico di virare dall'ossidazione dei grassi all'ossidazione dei carboidrati nel passaggio dallo stato di digiuno ad una condizione di stimolazione insulinica in individui magri e metabolicamente flessibili (A e C) ed in individui obesi e metabolicamente inflessibili (B e D). Kelley et al, JCEM 2005

2. Insulino-resistenza

L'infusione di insulina in vena alla dose di 0.1UI/Kg in un soggetto di età media normopeso e con normale quantità di tessuto adiposo produce nei minuti successivi una progressiva riduzione della

glicemia. Se la stessa dose di insulina viene somministrata ad un altro soggetto con la stessa glicemia di base ma più anziano, in sovrappeso e con una maggiore quantità di tessuto adiposo la caduta della glicemia è meno pronunciata. Il secondo soggetto si definisce insulino resistente rispetto al primo (figura 4).

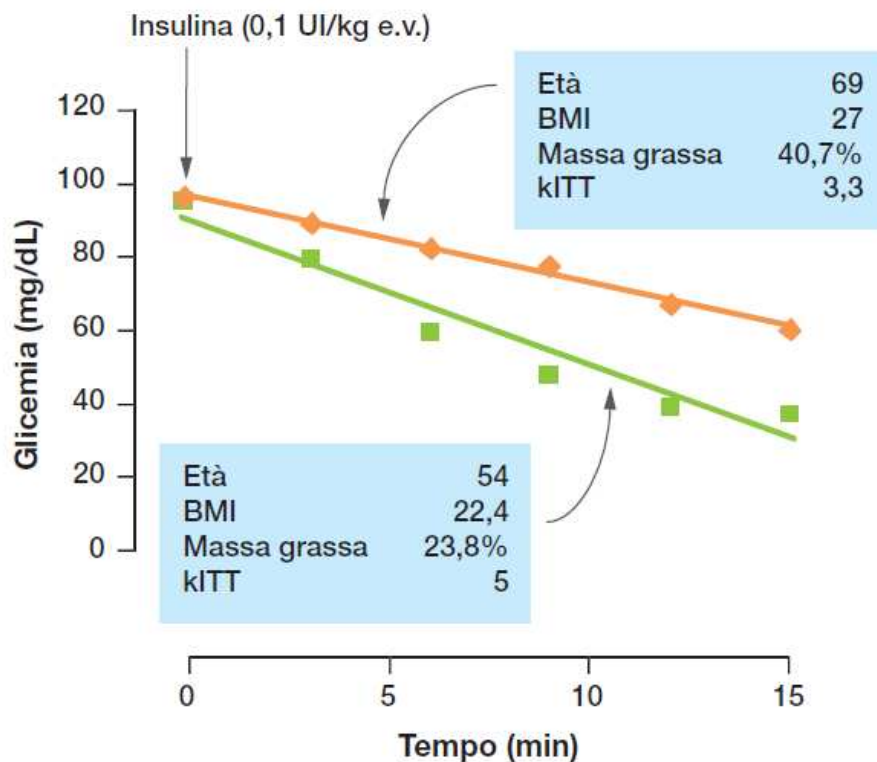


Figura 4 Test di tolleranza insulinica eseguito in 2 soggetti con diverse caratteristiche cliniche

L' insulino-resistenza è definita come una condizione clinico-metabolica caratterizzata da una ridotta capacità delle cellule o dei tessuti a rispondere a livelli fisiologici di insulina. Ciò determina una maggiore produzione di insulina da parte delle beta-cellule pancreatiche al fine di rendere possibile un'azione biologica adeguata (iperinsulinemia compensatoria).

L' insulino-resistenza non è di per sé una condizione clinica definita ma è elemento patogenetico di diversi fattori di rischio cardiovascolare, metabolici e non metabolici, che rientrano nella

costellazione della "sindrome metabolica". Questi fattori comprendono: l'**obesità viscerale**; le **alterazioni glico-metaboliche** che da un'alterata glicemia a digiuno o dopo carico i glucosio conducono ad un franco diabete; **alterazioni lipidiche**, di tipo quantitativo, caratterizzate da aumento di trigliceridi e VLDL, e da ridotti livelli di HDL, e di tipo qualitativo, aumentati livelli di molecole di LDL piccole e dense dotate di un rilevante potere atero-trombotico; **elevati livelli di pressione arteriosa** causati da diversi meccanismi: incrementato riassorbimento tubulare del sodio, attivazione di fattori di crescita, attivazione del SNA e del sistema renina-angiotensina, azione sulle pompe di membrana (ridotta attività della pompa Na/K ATPasi dipendente, aumentata attività della pompa Na/H, ridotta attività della Ca ATPasi); **disfunzione endoteliale; stato pro-coagulante e pro-aggregante; infiammazione e stress ossidativo**. La sindrome plurimetabolica può quindi essere considerata una patologia pre-clinica che apre la strada all'insorgenza della malattia cardiovascolare aterosclerotica, la quale rappresenta oggi la principale causa di morbilità e mortalità nei paesi industrializzati.

La sindrome plurimetabolica è caratterizzata da un insieme di alterazioni metaboliche multiple; le ragioni alla base dell'aggregazione di tali alterazioni, nello stesso individuo, sono ancora largamente sconosciute. È sicuramente possibile che il manifestarsi di una di queste componenti possa facilitare lo sviluppo delle altre. In tutti i casi appare come una realtà multifattoriale in cui pesano sia fattori genetici, inclusi fattori etnici, sia i fattori ambientali, quali una scarsa attività fisica e una dieta ad alto contenuto di lipidi e carboidrati che promuovono, mantengono e/o peggiorano la sua espressione clinica.

I meccanismi responsabili del ridotto effetto biologico dell'insulina non sono stati del tutto identificati, ma possiamo raggrupparli in due possibili tipi di alterazione: 1) difetto del numero e/o funzione del recettore insulinico; 2) difetto nella cascata degli eventi che segue al legame insulina-recettore e perciò definito post-recettoriale.

Il difetto recettoriale consiste in un'alterazione intrinseca, verosimilmente su base genetica, del recettore insulinico (0,1% dei casi), oppure in un'alterazione funzionale del recettore per l'azione inibente di fattori estrinseci (ad es. $TNF\alpha$ ed altre citochine liberate dal tessuto adiposo).

Il difetto post-recettoriale può essere dovuto alla alterazione di una o più delle tappe che riguardano la trasmissione del segnale insulinico, il trasporto intracellulare del glucosio e l'attività degli enzimi-chiave che regolano l'utilizzazione intracellulare del glucosio (glicogeno sintetasi e piruvico deidrogenasi). Nei pazienti con diabete di tipo 2, condizione in cui la resistenza insulinica svolge un importante ruolo patogenetico, sono stati dimostrati alterazioni a carico di tutti gli eventi intracellulari (signaling insulinico, trasporto intracellulare del glucosio, ed attività dell'enzima glicogenosintetasi e piruvico-deidrogenasi (1).

I distretti più importanti nella genesi dell'IR sono il muscolo, il tessuto adiposo e il fegato. A livello muscolare l'insulino-resistenza si traduce in un ridotto trasporto di glucosio all'interno della cellula e ridotto utilizzo. A livello del tessuto adiposo, specialmente a carico del grasso viscerale, l'insulino-resistenza determina una maggiore produzione di acidi grassi liberi (NEFA). Infine a livello epatico l'insulino-resistenza impedisce una adeguata soppressione della produzione di glucosio. La ridotta attività dell'insulina determina un aumento in circolo di glucosio e NEFA che concorrono ulteriormente a peggiorare il quadro dell'insulino-resistenza; i NEFA riducono ulteriormente il trasporto e l'utilizzo di glucosio a livello della cellula muscolare. Circa 40 anni fa Randle e coll dimostrarono che gli acidi grassi liberi causano insulino-resistenza in preparati di muscolo di ratto in vitro e ipotizzarono che questo si manifesta mediante un meccanismo di competizione di substrato (12) (figura 5).

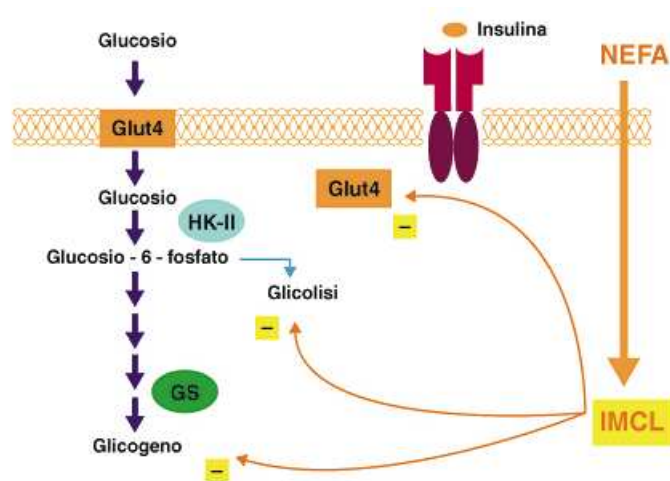


Figura 5 Interazione tra il metabolismo del glucosio e degli acidi grassi

Il muscolo scheletrico di soggetti con insulino-resistenza (diabetici o obesi) mostra una ridotta flessibilità metabolica: in questi soggetti l'ossidazione lipidica in condizioni di digiuno è ridotta (il QR a digiuno è elevato); al contrario, durante lo stimolo insulinico essa non è adeguatamente soppressa, mentre l'ossidazione glicidica non è adeguatamente stimolata. Questo pattern prende il nome di Inflessibilità metabolica (11). La regolazione metabolica è largamente dipendente dai mitocondri che giocano un ruolo importante nell'omeostasi energetica attraverso il metabolismo dei nutrienti e la produzione di ATP e calore (13). È a livello dei mitocondri, infatti, che si manifesta la competizione tra ossidazione glicidica e ossidazione lipidica (11) (figura 6).

Studi nell'uomo hanno dimostrato un effetto stimolante dell'insulina sulla capacità ossidativa mitocondriale nel soggetto normale e, al contrario, una ridotta produzione di ATP mitocondriale in condizione di stimolazione insulinica in soggetti con diabete mellito tipo 2 (9).

La riduzione dei processi ossidativi mitocondriali del muscolo scheletrico comporta l'accumulo di composti lipidici, quali trigliceridi, diacilglicerolo e ceramide che, interferendo a vari livelli con la trasmissione del segnale insulinico, riducono gli effetti metabolici dell'ormone, determinando lo sviluppo di insulino-resistenza (14). In accordo con questa interpretazione, l'aumentata ossidazione muscolare di FFA produce aumentati livelli intracellulari di metaboliti come DAG e

acetyl CoA che determina l'attivazione di PKC, una serin-treoninK che lega il recettore dell'insulina e inibisce la sua attività tirosin kinasi. Questa inibizione blocca la traslocazione del GLUT4 con riduzione del trasporto del glucosio (15,16)

Questi dati sono rafforzati dall'osservazione che il contenuto intramiocellulare di trigliceridi correla inversamente con la sensibilità insulinica e suggerisce che l'accumulo di composti lipidici potrebbe avere un importante ruolo nella genesi dell'insulino-resistenza (17). Inoltre, studi recenti condotti con risonanza magnetica hanno dimostrato che il meccanismo attraverso cui gli acidi grassi inibiscono il metabolismo del glucosio si esplica a livello del trasporto/fosforilazione del glucosio e a livello del fosfatidil-inositolo3-chinasi (PI 3-K), con conseguente riduzione dell'attività ossidativa mitocondriale e quindi una minore produzione di ATP (12).

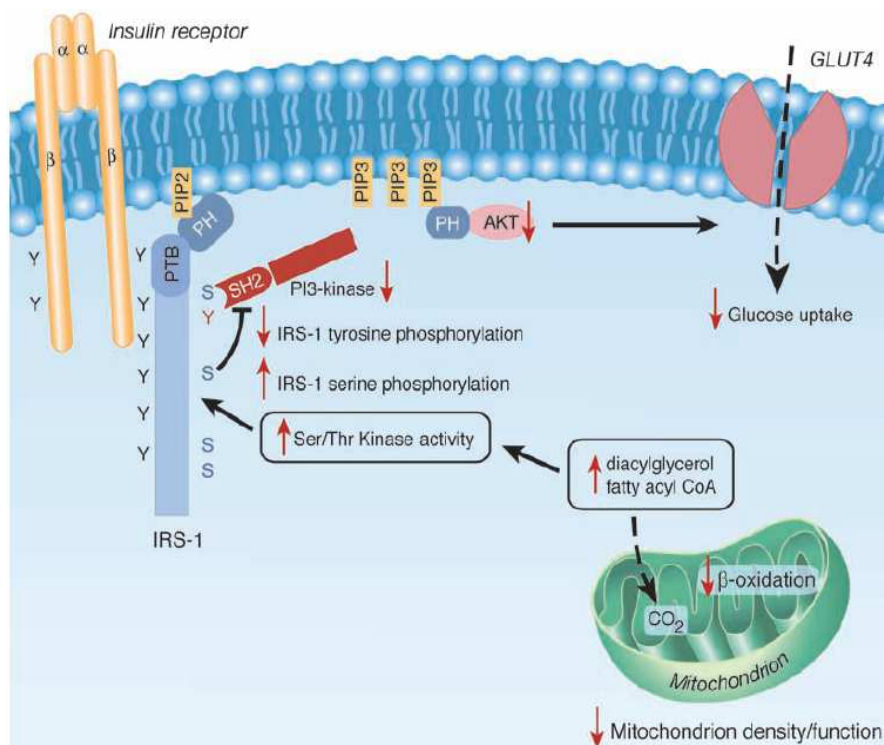


Figura 6 Potenziali meccanismi attraverso cui la disfunzione mitocondriale induce insulino resistenza nel muscolo scheletrico. Shulman et al, Science 2005

Oltre ai *pathway* dipendenti dalle serin/treonin chinasi, ci sono altri fattori che contribuiscono all'insulino-resistenza. Recenti studi supportano l'ipotesi che l'insulino resistenza è associata ad una condizione di cronica infiammazione. Citochine pro-infiammatorie come TNF α e IL6, sono upregolate nell'obesità. TNF α è stato mostrato aumentare l'espressione della isoforma inducibile della ossido nitrico sintasi (iNOS) e downregolare l'isoforma endoteliale (eNOS). Recenti studi hanno dimostrato che l'espressione di eNOS e la biogenesi mitocondriale sono downregolate in topi e ratti con obesità indotta da dieta grassa. Nei diabetici, con risaputa downregulation dei geni che codificano per proteine ossidative mitocondriali i livelli di IL6 (18) e TNF α sono inversamente correlati con i livelli di PGC1 α (19).

3. Mitocondri

Il mitocondrio è la centrale energetica e produce quasi tutto l'ATP della cellula animale. I mitocondri sono gli organelli subcellulari deputati al metabolismo ossidativo dei substrati intermedi glucidici, lipidici e aminoacidici nei tessuti animali. Presentano una forma allungata, e dimensioni variabili, ma in genere la lunghezza è compresa tra 1 e 6 μm mentre il diametro varia tra 0.5 e 1 μm e sono localizzati nella quasi totalità delle cellule eucariotiche in numero variabile da poche centinaia fino ad un migliaio circa per cellula (figura 7). Dal punto di vista ultrastrutturale, i mitocondri sono circondati da due membrane, la membrana esterna e quella interna, che circoscrivono a loro volta due spazi ben differenziati. La membrana esterna, che permette il passaggio di piccole molecole, delimita lo spazio intermembrana, una regione che gioca un ruolo importante nella produzione mitocondriale di ATP (20). La membrana interna, selettivamente permeabile e ripiegata in estroflessioni chiamate creste mitocondriali che ne aumentano la

superficie, invece, circoscrive la matrice mitocondriale che contiene enzimi, ribosomi, granuli e catene di DNA.

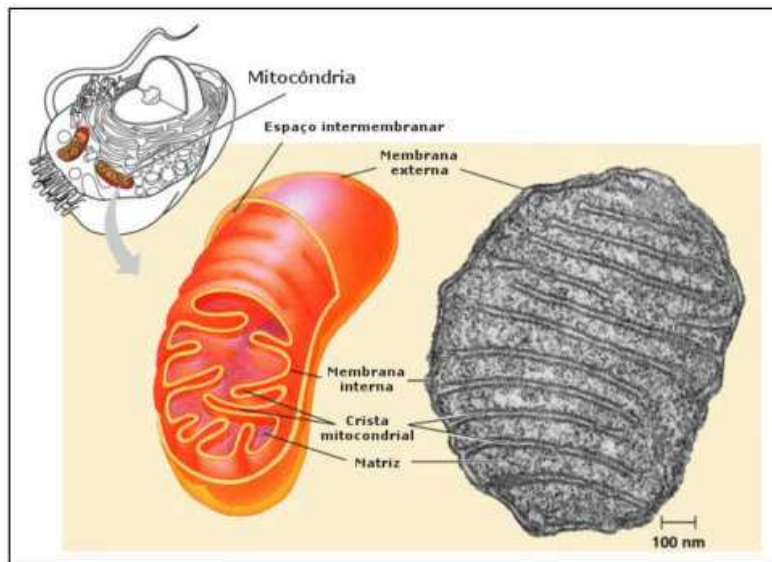


Figura 7 Mitocondrio in microscopia elettronica

La membrana mitocondriale esterna risulta permeabile a tutte le molecole di dimensioni inferiori a 5 kDa, comprese le piccole proteine. Queste molecole possono giungere allo spazio intermembrana, ma la maggior parte di esse non possono attraversare la membrana interna impermeabile. Così mentre lo spazio intermembrana risulta chimicamente equivalente al citosol, la matrice invece contiene una serie altamente selezionata di piccole molecole. La membrana interna è altamente specializzata e contiene un'alta proporzione del fosfolipide "doppio" cardiolipina, il quale contiene quattro acidi grassi e contribuisce a rendere la membrana particolarmente impermeabile agli ioni. Essa contiene una serie di proteine di trasporto che la rendono selettivamente permeabile a quelle piccole molecole che sono metabolizzate, o richieste, dai molti enzimi mitocondriali concentrati nella matrice. Proprio a livello della matrice e della membrana interna si svolgono le fasi salienti del processo di respirazione cellulare e cioè: il ciclo dell'acido citrico (o ciclo di Krebs) e il trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria con successiva fosforilazione ossidativa.

E' soprattutto il piruvato che, originato nel citosol dalla glicolisi, arriva a livello mitocondriale dove viene decarbossilato ed entra nel ciclo di Krebs determinando la produzione di un certo numero di coenzimi ridotti, quali il nicotinammide adenin-dinucleotide (NADH) e il flavin adenin-dinucleotide (FADH₂). Tali coenzimi sono molecole ricche di energia, in quanto contengono una coppia di elettroni ad elevato potenziale di trasferimento; per riossidersi, cedono gli atomi di idrogeno alla catena respiratoria situata sulla membrana mitocondriale interna. Il NADH e il FADH₂ generati dalla glicolisi, dal ciclo di Krebs e dall'ossidazione degli acidi grassi vengono ossidati nella catena di trasporto degli elettroni (ETC) che si occupa di separare i protoni dagli elettroni trasportando quest'ultimi attraverso i complessi lipoproteici che la costituiscono verso l'accettore finale che è l'ossigeno, con formazione di acqua come prodotto finale (figura 8).

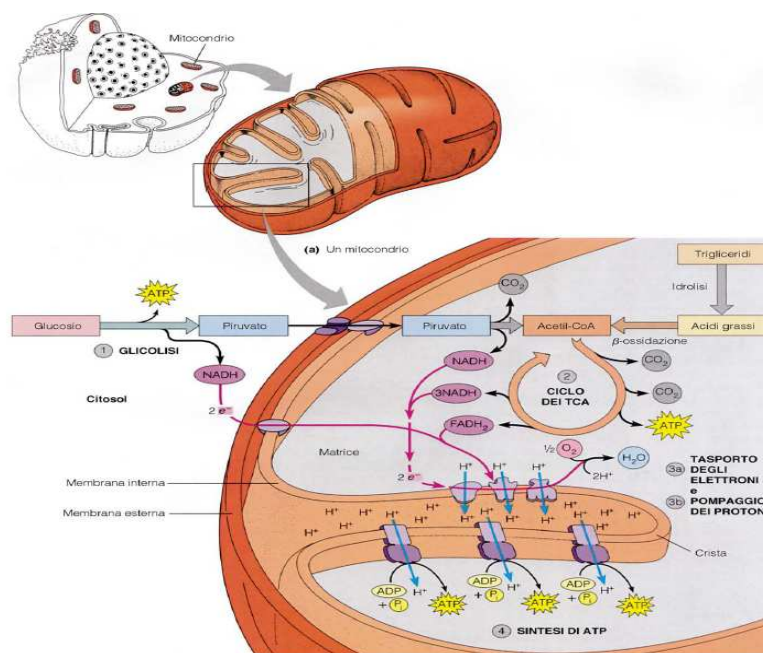


Figura 8 Ossidazione dei substrati energetici

La catena di trasporto degli elettroni è costituita da quattro complessi enzimatici: NADH deidrogenasi (complesso I), succinico deidrogenasi (II), citocromo c reduttasi (III), cit c ossidasi

(IV). Secondo l'ipotesi chemiosmotica, durante il trasporto degli elettroni ad alta energia dagli idrogeni del NADH e del FADH₂ lungo la catena respiratoria fino alla membrana mitocondriale interna, l'energia rilasciata nel passaggio da un trasportatore al successivo è usata per pompare protoni (H⁺) attraverso la membrana interna dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana (figura 9). Ciò crea un gradiente elettrochimico protonico attraverso la membrana mitocondriale interna e il flusso di ritorno di H⁺ lungo questo gradiente viene a sua volta usato per attivare l'enzima legato alla membrana, ATP sintetasi, che catalizza la conversione di ADP + Pi (adenosina difosfato e fosfato inorganico) ad ATP, completando il processo della fosforilazione ossidativa.

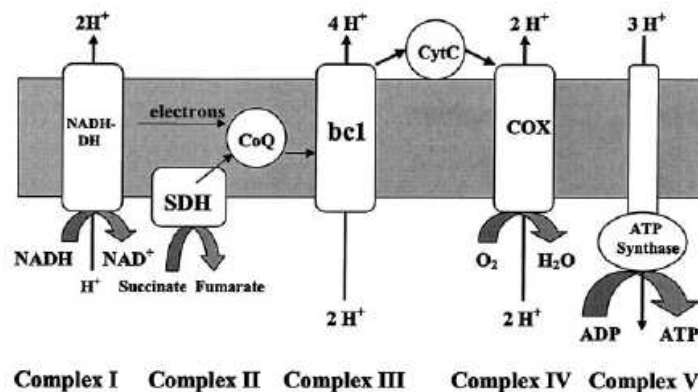


Figura 9 Catena di trasporto degli elettroni. Ritov et al, Diabetes 2006

L'ATP sintetasi è un complesso enzimatico costituito da una parte idrofobica F₀ integrata alla membrana mitocondriale, che contiene il canale protonico, e da una porzione catalitica idrofilica F₁ che sporge nella matrice del mitocondrio. I protoni accumulati nello spazio intermembrana durante il trasporto degli elettroni permeano attraverso F₀ prima e F₁ poi, consentendo all'ATP sintetasi di attivare la sintesi di ATP, mentre gli H⁺ abbandonano la porzione catalitica F₁ e rientrano nella matrice mitocondriale.

La sintesi di ATP e il trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria risultano, dunque, due processi strettamente accoppiati. Tuttavia, l'accoppiamento tra l'ossidazione dei substrati e la sintesi dell'ATP non è pari al 100%. Infatti, una parte dell'energia è persa sotto forma di calore mediante delle reazioni che consentono di dissipare il gradiente protonico senza portare alla sintesi di ATP. Si verifica, quindi, un vero e proprio disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa. Le proteine disaccoppianti, UCPs, giocano un importante ruolo nella riduzione del gradiente protonico. UCP1 è espressa esclusivamente nel tessuto adiposo, UCP2 è ubiquitaria, UCP3 è prevalentemente espressa nel muscolo scheletrico.

Tra i vari disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa ritroviamo gli acidi grassi. Nelle cellule intatte e nei tessuti, essi rappresentano un ottimo substrato respiratorio poiché forniscono elettroni alla catena respiratoria. Questa funzione maschera il loro potenziale effetto disaccoppiante che diventa evidente solo in alcune condizioni fisiologiche (digiuno, diete ad alto contenuto di grassi, esercizio eccessivo) o patologiche (diabete), caratterizzate da un accumulo di acidi grassi (21).

Gli FFA non ossidati entrano, come acidi grassi neutri, nella matrice mitocondriale dove vengono deprotonati diventando FFA anionici in modo da ridurre il gradiente protonico (figura 10). La matrice mitocondriale, dove i substrati vengono ossidati e dove si svolge la fosforilazione ossidativa è anche sito di formazione di ROS. I ROS legano gli FFA anionici e producono perossidi lipidici che interagiscono con DNA e RNA, danneggiandolo. Una strategia per dissipare questo meccanismo è la promozione di una fosforilazione ossidativa inefficiente. Questo processo è in grado di ridurre le riserve di grassi mediante la formazione di calore, e se tali modifiche nell'efficienza sono modeste, la riduzione dei grassi può essere raggiunta senza una significativa riduzione della produzione di ATP. Questo processo cellulare risulta dalla perdita di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna nella matrice ed è chiamato respirazione mitocondriale disaccoppiata. Si ritiene che gli UCP della membrana mitocondriale interna siano i

maggiori facilitatori della respirazione disaccoppiata e possono modulare la fisiopatologia del Diabete mellito. UCP3 è l'isoforma presente nel ms e i suoi livelli sono down-regolati nel DM2 e aumentati in risposta all'esercizio. Il ruolo di UCP3 nel ms non è stato ancora chiarito completamente ma è stato dimostrato che disaccoppia la fosforilazione ossidativa parallelamente ad una preferenziale ossidazione degli acidi grassi, ridotta formazione di ROS nel muscolo scheletrico ed è richiesto nella termogenesi patologica.

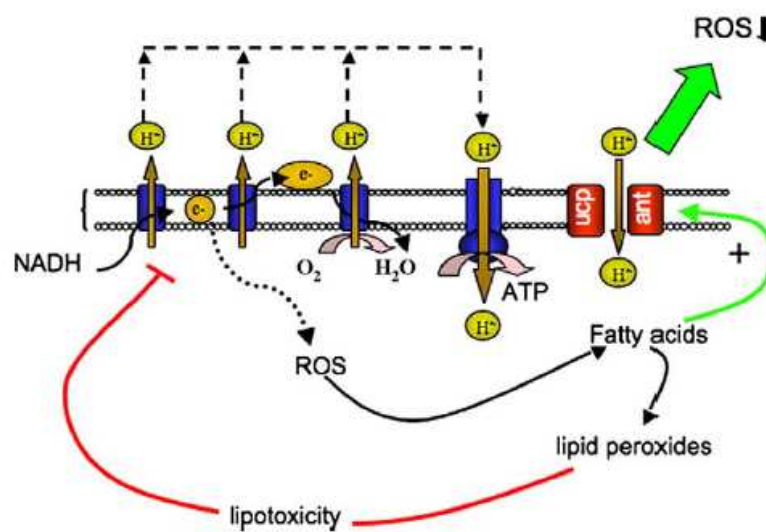


Figura 10 Disaccoppiamento mitocondriale proposto come meccanismo protettivo contro la lipotossicità: i mitocondri producono ROS che interagiscono con i lipidi mitocondriali producendo perossidi, specie altamente reattive che danneggiano le strutture mitocondriali. Gli acidi grassi attivano processi di disaccoppiamento mitocondriale, riducendo il gradiente protonico attraverso la membrana mitocondriale interna. Schrawen et al, Biochimica et Biophysica Acta 2010

3.1 La capacità ossidativa dei mitocondri del muscolo scheletrico

La regolazione metabolica è largamente dipendente dai mitocondri, che giocano un ruolo importante nell'omeostasi energetica attraverso il metabolismo dei nutrienti e la produzione di

ATP e calore. Uno sbilanciamento tra intake energetico e spesa energetica conduce ad una condizione di **disfunzione mitocondriale** caratterizzata da un ridotto rapporto tra produzione di energia (ATP prodotto) e respirazione (13). Fattori genetici e ambientali possono interferire sia con la funzione mitocondriale che con l'insulino sensibilità.

La capacità ossidativa del muscolo scheletrico è determinata principalmente dalla densità dei mitocondri, che a sua volta dipende dalla biogenesi mitocondriale, e dalla capacità ossidativa mitocondriale, indicata dal contenuto degli enzimi ossidativi e dalla loro attività (22). I mitocondri contengono del DNA che codifica per alcune proteine coinvolte nella fosforilazione ossidativa, tuttavia, gran parte delle proteine mitocondriali sono codificate dal DNA nucleare, sintetizzate nel citoplasma e importate poi attraverso la membrana mitocondriale (5). In particolare, i mitocondri hanno un ruolo di primaria importanza nel metabolismo energetico del muscolo scheletrico: in tutta la scorsa decade è cresciuto considerevolmente il numero delle pubblicazioni scientifiche che suggeriscono un coinvolgimento della capacità ossidativa del mitocondrio del muscolo scheletrico nell'eziologia dei disordini metabolici quali obesità, insulinoresistenza e diabete mellito tipo II (23)

3.2 Geni che regolano i processi ossidativi mitocondriali

La regolazione della biogenesi e dell'attività ossidativa viene effettuata da alcuni regolatori trascrizionali quali: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), PPAR gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α), alcuni fattori trascrizionali coinvolti nella respirazione (NRF-1 e NRF-2) (23,24), e la specificity protein1 (Sp1), un fattore trascrizionale ubiquitario che regola l'espressione dei geni ossidativi OXPHOS (figura 11) (23).

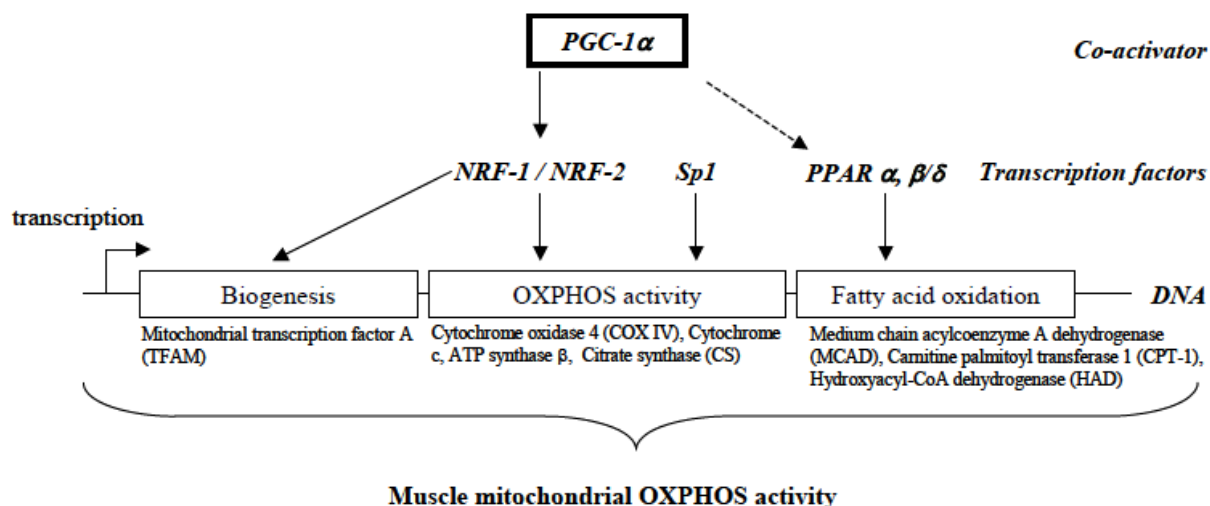


Figura 11 Principali fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione dell' ossidazione e fosforilazione (OXPHOS) mitocondriale del muscolo Chansaume, Int J Mol Sci 2009

PGC 1

E' una famiglia dei geni co-attivatori della trascrizione, collocati nel nucleo della cellula, ed espressi soprattutto nei tessuti ricchi di mitocondri e con un attivo metabolismo ossidativo, quali il tessuto adiposo bruno, il cuore e il muscolo scheletrico, ma anche nel cervello, nel fegato e nel rene (25) Agiscono stimolando la biogenesi mitocondriale e la respirazione cellulare e aumentando l'uptake di substrati energetici e la loro utilizzazione, mediante la co-attivazione diretta di fattori NR e non NR coinvolti nel controllo del metabolismo cellulare. Comprende PGC-1 α , PGC1 β e PCR (co-attivatore legato a PGC-1) (figura 12).

PGC-1 α : è una proteina di 798 aa con sequenza N-terminale costituita da 200 aa acidi che mediano l'interazione con un largo numero di fattori trascrizionali (quali la famiglia dei PPARs, COX 5b) coinvolti in numerose risposte biologiche (figura 13). PGC-1 α controlla il metabolismo cardiaco durante lo sviluppo e in risposta a stress fisiologici: l'espressione è indotta dopo la nascita e aumenta in condizioni di digiuno. Aumenta l'ossidazione degli acidi grassi, mediante interazione con PPAR α e ERR α . Nel muscolo scheletrico l'espressione di PGC-1 α a livelli fisiologici induce attivazione della biogenesi mitocondriale e switch delle fibre muscolari da glicolitiche IIB a

ossidative IIa o I (26-28). L'iper-espressione di PGC1 α (29) aumenta il contenuto mitocondriale e la respirazione (30,31) parallelamente con un aumento dell'uptake del glucosio e della sensibilità insulinica. La soppressione dell'espressione di PGC1 α in topi transgenici si associa a insulino resistenza sistemica associata ad una riduzione dell'espressione del trasportatore del glucosio (GLUT4) (32) e accumulo di IMCL che sembra essere il risultato di un aumentato uptake degli FFA che superano la capacità della FAO (33). Inoltre blocca l'ossidazione del glucosio così da favorire la sintesi di glicogeno e rendendolo disponibile per lo sforzo muscolare. L'iper-espressione di PGC1 α in cellule muscolari, si è dimostrato indurre l'espressione di geni NRF1, NRF2, TFAM e subunità COX (34)

Nel fegato, in condizioni di normale alimentazione i livelli di PGC-1 α sono minimi; il digiuno produce un aumento di PGC-1 α che coattiva CREB, stimolando l'espressione dei geni della gluconeogenesi epatica (35) e PPAR α , stimolando l'espressione dei geni coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi.

Nel tessuto adiposo, PGC-1 α regola la termogenesi, stimolando l'espressione di UCP e mediante interazione con PPAR γ , induce la differenziazione del tessuto adiposo da bianco a bruno.

PGC-1 β : È espresso ad alti livelli nel tessuto adiposo bruno e nel muscolo cardiaco. Il PGC-1 β è implicato nella proliferazione dei mitocondri nel muscolo scheletrico (36) e la sua iper-espressione previene l'IR indotta dalla dieta (37), ma ha scarsa capacità nell'attivazione della gluconeogenesi e della β -ossidazione degli acidi grassi (38); a differenza di PGC-1 α aumenta l'espressione dei geni coinvolti nella lipogenesi e nella secrezione dei trigliceridi.

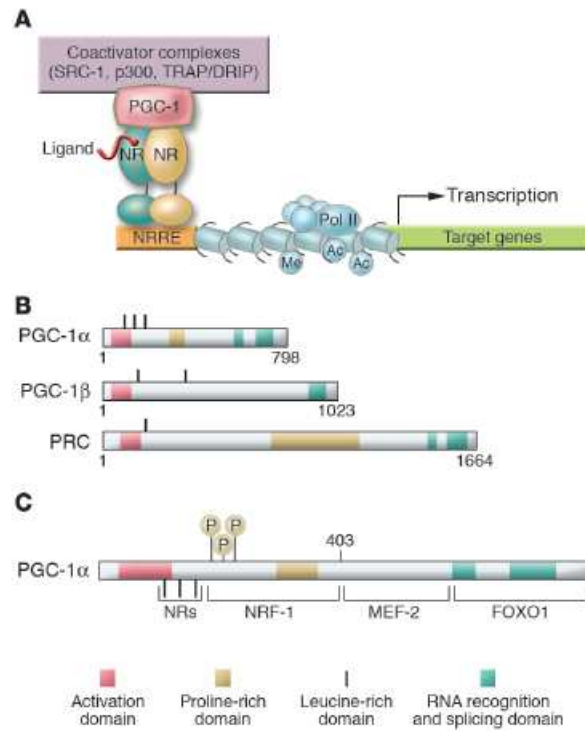


Figura 12 Famiglia dei co-attivatori PGC1. **A** PGC1 interagisce con fattori regolatori nucleari (NR). **B** raffigura la lunghezza relativa e i domini condivisi dei 3 membri della famigli. **C** Domini funzionali di PGC-1 α

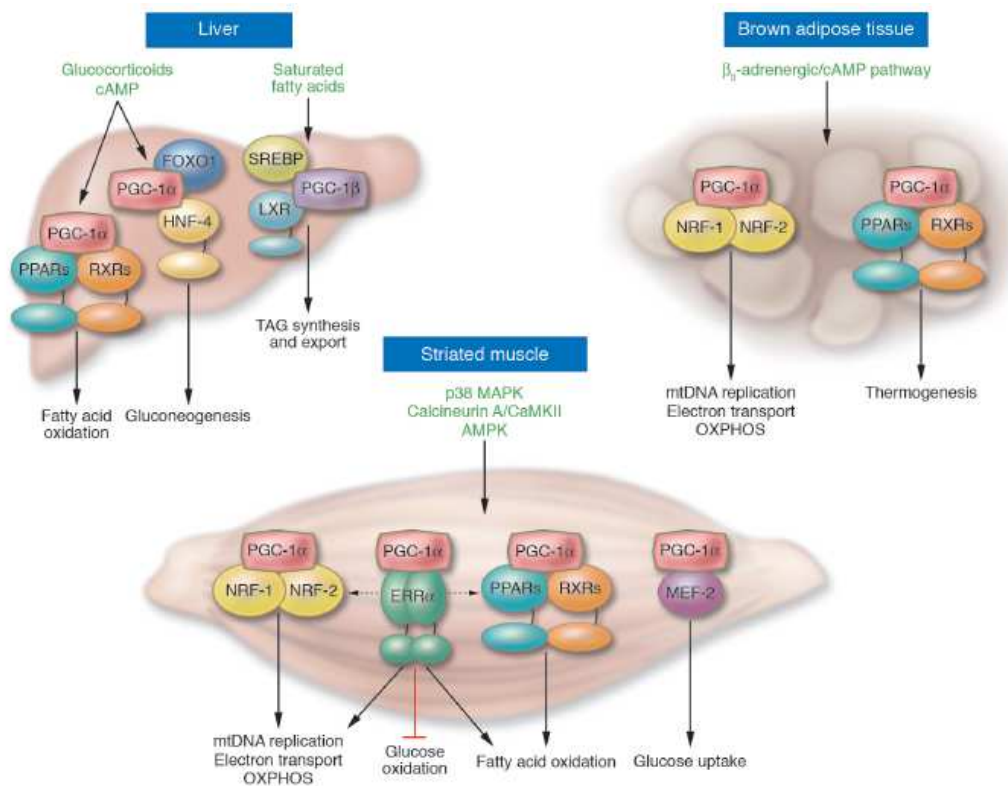


Fig 13 Cascata regolatoria di PGC1

PPARs

I PPARs sono fattori trascrizionali implicati nella regolazione dell'attività ossidativa del mitocondrio e possono indirizzare il metabolismo quando attivati dagli FFA e dai loro derivati (39).

I PPARs dopo aver formato un eterodimero con il retinoid X receptor (RXR) regolano la trascrizione dei geni coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi. Un aumento dell'attività delle isoforme PPAR $\alpha/\delta/\gamma$ nel muscolo scheletrico è dovuto all'azione del PGC1- α (40).

PPAR α : importante fattore di controllo della ossidazione degli acidi grassi, è prevalentemente espresso nel fegato ma anche nel cuore e nel muscolo.

PPAR δ : sebbene abbia un'espressione ubiquitaria, PPAR δ è più abbondante nel muscolo scheletrico (41); PPAR δ è fortemente associato a PGC1 α e si è dimostrato un potente attivatore di geni implicati nel catabolismo degli FFA e nella termogenesi adattativa (39) e promuove lo switch delle fibre muscolari da glicolitiche a ossidative (42,43). Un'iper-espressione muscolare di PPAR β/δ si è dimostrata aumentare l'attività di enzimi ossidativi come citrato sintasi o β -H-acil-CoA deidrogenasi (44)

PPAR γ : è espresso in vari tessuti tra cui il tessuto adiposo dove ha un ruolo adipogenico e lipogenico, modulando la trascrizione di numerosi geni coinvolti nel metabolismo lipidico (45-48). Nel muscolo scheletrico in particolare è stato dimostrato avere livelli di espressione proporzionali a geni lipoossidativi (47).

COX

La citocromo c ossidasi o complesso IV è l'ultimo complesso enzimatico coinvolto nella catena di trasporto degli elettroni, è enzima chiave e rappresenta uno dei principali siti di regolazione della capacità ossidativa mitocondriale. E' un complesso enzimatico, localizzato nella membrana mitocondriale interna (49). La citocromo ossidasi umana è costituita da 13 subunità, le più voluminose delle quali, la I, la II e la III, costituiscono il core catalitico dell'enzima e sono

codificate dal DNA mitocondriale (50). Le altre subunità polipeptidiche alcune delle quali modulano la catalisi, altre l'assemblaggio e la stabilità dell'intero enzima, sono codificate da geni nucleari.

COX5b: è l'enzima terminale della catena di trasporto degli elettroni, trasferisce elettroni dal citocromo c ridotto all'ossigeno e, con questo processo, genera un gradiente elettrochimico attraverso la membrana interna del mitocondrio (51).

COX2: è la seconda subunità decodificata dal mtDNA del complesso IV della catena respiratoria. La sub-unità II contiene un centro redox, CuA, e raccoglie gli elettroni dal ferro-citocromo b. (52)

GLUT4

Componente della famiglia dei glucose-transporters. Il GLUT4 è il principale trasportatore di glucosio nei tessuti insulino-sensibili (muscolo scheletrico e cardiaco). E' racchiuso in vescicole intracellulari che in seguito allo stimolo insulinico si spostano verso la membrana plasmatica con cui si fondono trasportando il glucosio dallo spazio interstiziale all'interno della cellula (5). E' stata dimostrata una down regulation di GLUT4 in cellule muscolari scheletriche di topi sottoposti a dieta grassa (53,54) e tale meccanismo è mediato dall'attivazione di PPAR δ (54).

PFK

Enzima allosterico e inducibile della glicolisi. La fosfofruttochinasi catalizza la fosforilazione ATP-dipendente del fruttosio 6-fosfato a fruttosio 1,6-bis fosfato (5)

LPL

L'enzima LPL è situato sulla superficie luminale dell'endotelio capillare. La lipoprotein-lipasi idrolizza circa il 90% dei trigliceridi dei chilomicroni e delle VLDL. Durante questo processo, gli acidi grassi liberi diffondono nel liquido interstiziale e sono captati dalle cellule dei parenchimi in

cui si ha l'ossidazione o il deposito sotto forma di triacilgliceroli. La lipasi lipoproteica è attivata da numerosi fattori, tra cui l'apoC-II e l'insulina (5)

CPT 1

La lipo-ossidazione avviene nella matrice mitocondriale. Sebbene gli enzimi mitocondriali coinvolti siano ossidasi, un passaggio limitante della beta-ossidazione è il trasporto degli acidi grassi dallo spazio citoplasmatico al mitocondrio stesso. Tale reazione è catalizzata dalla carnitina-palmitoil transferasi-I (CPT-I) che rappresenta quindi un importante bersaglio di studio per la regolazione dei processi ossidativi lipidici. Le due forme isomeriche del CPT 1 (CPT 1A e CPT1B) sono localizzate sulla membrana esterna del mitocondrio (55) La Carnitina palmitoyl-transferasi è un sistema enzimatico che, in associazione con l'acyl-CoA sintetasi e la Carnitina-acylcarnitina translocasi, promuove il trasporto degli acidi grassi a lunga catena dal citosol alla matrice mitocondriale per essere convogliate verso la beta-ossidazione con conseguente produzione di energia (56)

I geni che regolano i processi ossidativi mitocondriali sono riassunti nella tabella 1.

Tabella 1 Geni che regolano i processi ossidativi mitocondriali

GENE	PROTEINA CODIFICATA	FUNZIONE
COX5b	Enzima terminale della catena di trasporto degli elettroni.	Trasferisce elettroni dal citocromo c ridotto all'ossigeno e, genera un gradiente elettrochimico attraverso la membrana interna del mitocondrio
COX2	Seconda subunità decodificata dal mtDNA del complesso IV della catena respiratoria.	La sub-unità II contiene un centro redox, CuA, e raccoglie gli elettroni dal ferro-citocromo b
PGC 1α	E' collocato nel nucleo della cellula, ed è espresso soprattutto nei tessuti ricchi di mitocondri e con un attivo metabolismo ossidativo,	E' un cofattore trascrizionale che interagisce con un largo numero di fattori trascrizionali (quali la famiglia dei PPARs, COX 5b) coinvolti in numerose risposte biologiche
PGC 1β	È espresso ad alti livelli nel tessuto adiposo bruno e nel muscolo cardiaco.	E' un potente attivatore dell'espressione dei geni mitocondriali, inclusi quelli che regolano la β -ossidazione degli acidi grassi, ma ha scarsa capacità nell'attivazione della gluconeogenesi
PPARα PPARγ PPARδ	Fattori trascrizionali implicati nella regolazione dell'attività ossidativa del mitocondrio.	I PPARs dopo aver formato un eterodimero con il retinoid X receptor (RXR) regolano la trascrizione dei geni coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi. Un aumento dell'attività delle isoforme PPAR $\alpha/\delta/\gamma$ nel muscolo scheletrico è dovuto all'azione del PGC1- α
GLUT4	Componente della famiglia dei glucose-transporters.	Il GLUT4 è il principale trasportatore di glucosio nei tessuti insulino-sensibili (muscolo scheletrico e cardiaco).
PFK	Enzima allosterico e inducibile della glicolisi.	La fosfofruttochinasi catalizza la fosforilazione ATP-dipendente del fruttosio 6-fosfato a fruttosio 1,6-bis fosfato
LPL	L'enzima LPL è situato sulla superficie luminale dell'endotelio capillare.	La lipoprotein-lipasi idrolizza circa il 90% dei trigliceridi dei chilomicroni e delle VLDL.
CPT 1	Le due forme isomeriche del CPT 1 (CPT 1A e CPT1B) sono localizzate sulla membrana esterna del mitocondrio	La Carnitina palmitoyl-transferasi è un sistema enzimatico che, in associazione con l'acyl-CoA sintetasi e la Carnitina-acylcarnitina translocasi, promuove il trasporto degli acidi grassi a lunga catena dal citosol alla matrice mitocondriale per essere convogliate verso la beta-ossidazione con conseguente produzione di energia

3.3 Il Controllo dell'espressione genica

L'alterata espressione di geni e di fattori trascrizionali si traduce sia in una minore biosintesi sia in una dis-regolazione dell'attività ossidativa dei mitocondri.

La regolazione dell'espressione genica nelle cellule eucariote è un processo complesso. Esso si realizza a tre livelli distinti :

1. Il controllo della trascrizione
2. La regolazione della maturazione (Processing)
3. La realizzazione della sintesi proteica

I meccanismi di controllo a livello trascrizionale determinano se e per quanto tempo un gene deve essere trascritto. Tale tappa è regolata da fattori generali della trascrizione, ovvero proteine in grado di legarsi a specifiche sequenze presenti in siti esterni alla regione codificante di un gene. La sequenza regolatrice a monte più vicina è la TATA box, che è il componente più importante del promotore di un gene ed il sito di assemblaggio del complesso di pre-inizio. L'attività delle proteine presenti sulla TATA box dipende dall'interazione dei fattori generali della trascrizione con altre proteine legate a siti differenti, tra cui vari elementi regolatori ed elementi enhancer, specifici del processo trascrizionale.

Queste proteine, denominate fattori specifici della trascrizione, si legano al DNA mediante un numero limitato di motivi strutturali, quali lo "zinc-finger", il "leucine zipper", l' "helix-loop-helix" e l' "HMG-box", che consentono alle proteine di interagire con la doppia elica del DNA.

Alcuni fattori di trascrizione possono anche agire regolando la trascrizione con l'aggiunta di gruppi metile in regioni regolative chiave.

Il controllo della maturazione determina la via attraverso la quale il pre-mRNA diventa un RNA messaggero maturo che può essere tradotto in un polipeptide. La regolazione avviene mediante un processo di "splicing" (taglio degli esoni). Esiste inoltre un processo di "splicing alternativo" grazie al quale un singolo gene può codificare per due o più proteine correlate.

Infine, i meccanismi di controllo a livello della traduzione determinano quando, con quale frequenza e per quanto tempo un particolare mRNA deve essere tradotto. La regolazione avviene mediante varie fasi, fra cui la localizzazione nella cellula dell'mRNA e la sua longevità risulta determinata dalla lunghezza della coda di poli(A) composta da circa 200 residui di adenosina (57).

3.4 Fattori che regolano la funzione mitocondriale

Fattori biochimici e ormonali, che includono i ROS, l'ossido nitrico, ipossia e ormoni tiroidei possono modulare la funzione metabolica e molecolare dei mitocondri. (58-61).

Ci sono evidenze che l'NO prodotto da eNOS aumenta la biogenesi mitocondriale, il metabolismo ossidativo e la produzione di ATP in diversi tipi di cellule incluso quelle muscolari (58-61).

Ma anche disponibilità di substrati e l'insulina influisce sulla biogenesi mitocondriale, il cui sistema di controllo, che non è stato ancora completamente chiarito, richiede la partecipazione e la coordinazione dei genomi nucleare e mitocondriale.

Età L'età è un processo di irreversibile declino delle funzioni fisiologiche nel tempo. Con l'età la massa grassa tende gradualmente ad aumentare e la spesa energetica giornaliera e l'attività fisica tendono a ridursi. Una ridotta spesa energetica con l'età riduce la richiesta di ATP e conduce ad una ridotta capacità ossidativa. Diversi studi condotti su animali sono concordi nel dimostrare una ridotta capacità ossidativa mitocondriale legata all'età. I dati nell'uomo sono controversi sebbene diversi studi hanno identificato i vari pathways coinvolti: 1) ridotta attività degli enzimi chiave dell'ossidazione mitocondriale (cyt c ox e Citrato S) 2) ridotta produzione di ATP mitocondriale 3) riduzione della sub β dell'ATP-sintasi 4) ridotta densità mitocondriale 5) alterazioni nella sintesi proteica mitocondriale. Rimane controverso se la riduzione della capacità ossidativa legata all'età sia dovuta all'età di per se o a condizioni legate allo stile di vita.(22)

Stress ossidativo I radicali liberi sono molecole altamente reattive che vengono prodotte a livello cellulare sia durante i normali processi metabolici sia in seguito a stimoli esterni e stress di vario genere. Sono soprattutto le specie reattive dell'ossigeno (ROS) a giocare un ruolo chiave nel danneggiamento cellulare. I mitocondri rappresentano non soltanto i maggiori produttori di radicali liberi, ma sono anche il principale bersaglio dei loro effetti dannosi in quanto più suscettibili sia perché più prossimi alla fonte di radicali liberi sia perché non protetti da istoni. I ROS hanno una breve emivita e possono rapidamente interagire con il DNA, causando mutazioni puntiformi, e con proteine e lipidi incrementando la formazione di prodotti ossidati. Le membrane mitocondriali e il DNA sono particolarmente suscettibili all'azione dei ROS ma i danni possono coinvolgere tutte le strutture cellulari. L'ossidazione proteica può alterare la struttura e la funzione, riducendo l'attività catalitica di enzimi, l'integrità strutturale e interrompendo pathways regolatori. Gli FFA sono particolarmente proni all'ossidazione e alla formazione di perossidi lipidici. Questo determina alterazioni delle componenti della membrana che conduce alla disfunzione e morte cellulare per apoptosi. Sebbene le conseguenze dello stress ossidativo siano chiare, il coinvolgimento della disfunzione mitocondriale nell'aumentare la produzione dei ROS associata a disordini metabolici è ancora dibattuta. Chanseaume et al hanno infatti mostrato che l'attività ossidativa mitocondriale in ratti che ricevono dieta ad alta energia sono associati a riduzione della produzione di anione superossido mitocondriale (62).

4. Insulino-resistenza e Disfunzione mitocondriale: quid prius?

Una riduzione dell'espressione dei geni mitocondriali associata a riduzione di NRF1 e PGC1 α è stata riportata nel muscolo scheletrico di soggetti con insulino-resistenza o con DM2 (18,63-65). Studi più recenti di Kelley e coll. hanno dimostrato su campioni biopsici di muscolo scheletrico di soggetti insulino-resistenti (diabete tipo II o obesità) una riduzione del numero e delle dimensioni

dei mitocondri e dell'attività degli enzimi ossidativi rispetto ad un gruppo di controllo di soggetti sani e normopeso (66).

I dati presenti in letteratura evidenziano, quindi, una stretta relazione tra insulinoresistenza e disfunzione mitocondriale ma non consentono di stabilire un preciso nesso di causalità. E' possibile che l'alterazione mitocondriale costituisca un difetto primitivo, geneticamente determinato che, attraverso l'accumulo intracellulare dei lipidi, porta allo sviluppo dell'insulino-resistenza. E' possibile, d'altra parte, che fattori ambientali sfavorevoli (sedentarietà, iperalimentazione) inducano insulino-resistenza con alterazione della capacità dell'insulina di regolare i processi ossidativi mitocondriali; in questo caso il difetto mitocondriale sarebbe la conseguenza dell'insulino-resistenza (figura 14).

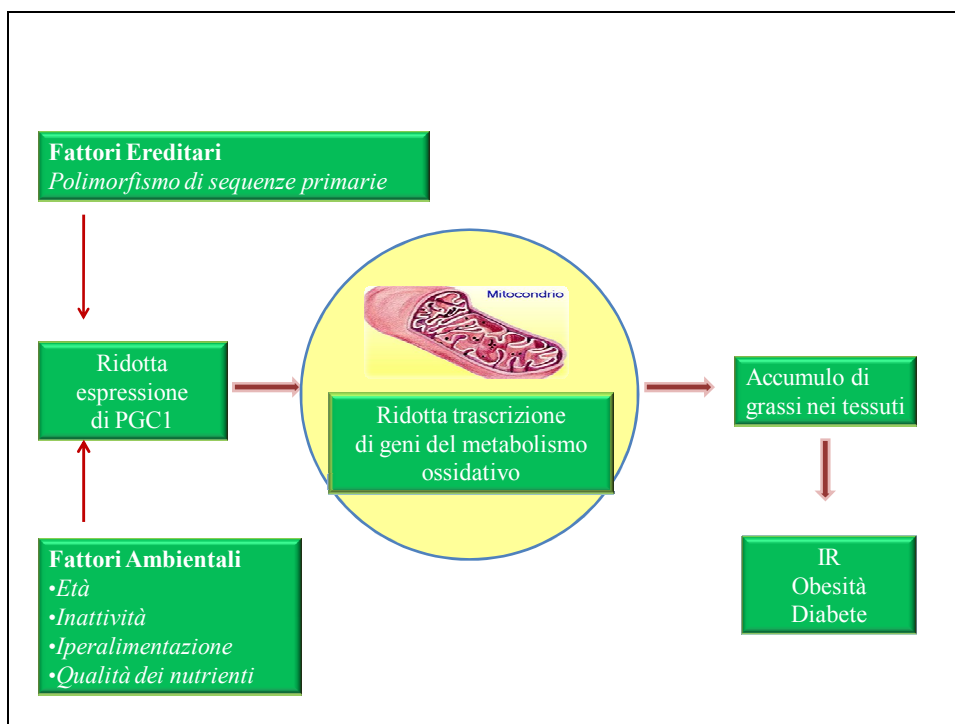


Figura14. Riduzione dell'espressione dei geni del metabolismo ossidativo in soggetti con insulino- resistenza

4.1 Fattori genetici

Recentemente è stata avanzata l'ipotesi che l'insulino-resistenza nel muscolo scheletrico sia legata ad un difetto primario della biogenesi e dell'ossidazione dei mitocondri nel muscolo scheletrico con formazione di intermedi tossici degli acidi grassi che interferiscono con la trasmissione del segnale insulinico (17,24,67-69). In questo costrutto, la disfunzione mitocondriale avrebbe un ruolo primario nella fisiopatologia dell'insulino-resistenza (70). Per verificare l'ipotesi, sono stati studiati i familiari di primo grado di pazienti con diabete tipo 2 allo scopo di valutarne la funzione mitocondriale del muscolo scheletrico rispetto ad un gruppo di controllo senza familiarità per diabete. I soggetti con familiarità positiva per diabete hanno mostrato una significativa riduzione del metabolismo non ossidativo del glucosio e un aumentato contenuto di lipidi intramiocellulari (65). In aggiunta, rispetto ai controlli, questi soggetti presentavano una ridotta sintesi di ATP muscolare in risposta alla stimolazione insulinica, misurata con risonanza magnetica spettroscopica (MRS). Questa misura riflette un'alterata attività basale della fosforilazione ossidativa (65,71). Inoltre, nei soggetti insulinoresistenti con familiarità positiva per diabete è stata documentata una ridotta densità e un ridotto contenuto mitocondriale (72). Studi che hanno impiegato l'analisi del mRNA, hanno studiato il profilo di espressione genica di soggetti normali confrontati con diabetici e parenti di diabetici. Mentre l'espressione di *nfκ1*, regolatore chiave della biogenesi mitocondriale è down regolato solo nei diabetici, l'espressione di *PGC1a* e *b* è down regolata anche nei soggetti non diabetici con storia familiare positiva di diabete.

5. Fattori Ambientali e funzione mitocondriale

5.1 Attività fisica

E' ampiamente documentato che l'attività fisica e, viceversa, uno stile di vita sedentario hanno un forte impatto sulla capacità ossidativa mitocondriale del muscolo scheletrico. Un recente studio di Ling e coll. condotto su gemelli omozigoti ha dimostrato che l'attività dei geni ossidativi mitocondriali (PGC-1 α e PGC-1 β), valutata su campioni di biopsia muscolare, è influenzata oltre che da fattori genetici, anche da fattori legati allo stile di vita, quali il sesso, il peso alla nascita, l'età e la capacità aerobica (73).

L'esercizio fisico migliora l'azione dell'insulina e la tolleranza al glucosio in soggetti insulino-resistenti e in modelli animali di insulino-resistenza (74,75). Vi sono solide evidenze che l'esercizio aerobico stimola la biogenesi mitocondriale mediante un'aumentata espressione di PGC1, NRF e TFAM ripristinando il corretto rapporto tra i vari tipi di fibre muscolari, aumenta il volume dei mitocondri e ne ripristina una corretta disposizione SS; tutto questo si associa da un punto di vista clinico alla riduzione di peso in soggetti obesi (76, 77). L'esercizio di *durata* aumenta le dimensioni e il numero dei mitocondri e l'attività ossidativa contribuendo a migliorare il metabolismo del glucosio (78). Un'aumentata espressione di eNOS indotta dall'attività fisica può stimolare la biogenesi mitocondriale (79,80). Un'attività fisica intenso-moderata (incremento della VO_{2max} del 20%), associato ad una limitata perdita di peso (~10%), migliora l'insulino-sensibilità attraverso un aumento (di circa il 60%) dell'attività degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale (senza modifiche del contenuto DNAm) in soggetti obesi che conducevano uno stile di vita sedentario (81) Questi dati sono confermati da Mustelin e coll che, in un recente studio condotto su gemelli omozigoti discordanti per obesità, hanno dimostrato che indipendentemente da fattori genetici, l'obesità è associata a scarsa fitness, minore sensibilità insulinica e ridotti livelli di trascrizione dei geni coinvolti nella fosforilazione ossidativa (82). Un altro studio condotto da Rimbert e coll. su soggetti selezionati rigorosamente per età e attività fisica, ha esplorato quali effetti l'attività fisica e

l'età potessero avere sul metabolismo ossidativo del muscolo scheletrico: i risultati mostrano che l'attività ossidativa dei mitocondri del muscolo, e la risultante capacità ossidativa dei grassi, era influenzata dal livello di inattività fisica più che dall'età (83). Più recentemente Fatone e coll hanno dimostrato che l'attività fisica strutturata è in grado di migliorare il compenso glicemico e indurre modifiche dell'espressione genica in soggetti con DM2 e SM. In particolare 2 sessioni di attività fisica settimanale sono sufficienti ad incrementare l'espressione di PPAR α (6m) e PPAR γ (6 e 12) e migliorare la fitness CV ma non sufficienti ad indurre un aumento del DNA mit come si evince dai livelli di PGC1, regolatore della biogenesi, che rimane sostanzialmente invariato (84).

5.2 Nutrienti

Anche lo stato nutrizionale (es. l'obesità) e i nutrienti possono contribuire a regolare la capacità ossidativa mitocondriale. È ormai riconosciuto che i nutrienti, attraverso l'interazione con i fattori di trascrizione, sono in grado di regolare l'espressione di geni responsabili di importanti processi biologici. Negli ultimi anni si sono affermate nuove discipline nel campo della nutrizione quali la "nutrigenomica" e la "nutrigenetica" che esaminano, rispettivamente, l'impatto dei nutrienti sul genoma e come le differenze genetiche interindividuali possono influenzare la risposta ad interventi nutrizionali (23). Particolarmente importante nell'ambito della nutrigenomica, è la possibilità di comprendere se e attraverso quali meccanismi i diversi nutrienti possono influenzare i processi metabolici del muscolo scheletrico.

La prevalenza del DM2 è aumentata nelle società occidentali e questo è anche il risultato di un eccessivo introito alimentare (85). Nei tessuti periferici l'iperafflusso dei nutrienti conduce ad una deposizione di grasso ectopico, danno da ROS e disfunzione d'organo, alterazioni definite "glucotossicità", per indicare il danno indotto dall'iperglicemia cronica e lipotossicità per indicare il danno indotto dall'aumento cronico degli acidi grassi (86).

Il pathway cellulare evocato per spiegare la glucotossicità, deriva da un overload di elettroni, con aumento della produzione di superossido mitocondriale (87-88). Il muscolo scheletrico riduce l'uptake di glucosio attraverso una down-regulation dei trasportatori del glucosio.

Mentre il ruolo dell'iperglicemia *per se* nello sviluppo delle alterazioni della funzione mitocondriale non è stato chiarito, il meccanismo attraverso cui l'eccesso di grassi promuove un danno dell'ossidazione mitocondriale è stato ampiamente investigato (89-97).

Il processo è evidente in individui magri e sani sottoposti per breve tempo a dieta ricca di grassi (89). Gli acidi grassi intracellulari provocano perossidi lipidici in presenza di ROS e questo è causa di un danno ossidativo mitocondriale (90,91). L'accumulo di IMCL di per se non è sufficiente a evocare un danno mitocondriale poichè è stato osservato un accumulo di IMCL anche in atleti di resistenza che però presentano una forte capacità ossidativa (92,93) e sono generalmente insulino-sensibili (94). L'ipotesi formulata per spiegare questo paradosso è che l'IR indotta dai grassi si associa ad un'incapacità a catabolizzare questo eccesso di IMCL e ad una predisposizione alla formazione di perossidi lipidici (95). Studi sul profilo di espressione genica mostrano l'induzione dei geni che codificano per l'ossidazione degli acidi grassi negli atleti di resistenza (96) e una upregolazione dei geni che codificano per la deposizione dei grassi nei soggetti sedentari alimentati da dieta grassa (89). Negli atleti è stata inoltre anche dimostrata una fosforilazione ossidativa disaccoppiata nel muscolo scheletrico che spiega l'aumento della beta ossidazione associato ad un ridotto stress ossidativo (92,97).

L'overnutrition include anche un'eccessivo intake proteico con un'eccesso di aminoacidi circolanti.

Un aumento degli aminoacidi circolanti è chiaramente correlato all'IR (98) ma il loro ruolo nella modulazione del metabolismo mitocondriale non è stato esplorato.

Modifiche dell'intake dietetico possono ridurre l'IR del muscolo scheletrico in condizioni di obesità. E' noto che Un intervento dietetico la restrizione calorica migliorare l'IS nell'uomo (100-

102), upregola la biogenesi mitocondriale, aumentare il consumo di O₂ e la produzione di ATP nel muscolo scheletrico attraverso l'espressione di eNOS.

5.3 Grassi alimentari

Recenti studi hanno dimostrato che ratti alimentati con dieta ad alto contenuto in grassi o ad alto contenuto in saccarosio presentano una ridotta espressione dei geni ossidativi mitocondriali (102). Sparks e coll hanno documentato una riduzione del ~90% dell'espressione di PGC-1 α e PGC-1 β nei topi alimentati per tre settimane con una dieta fortemente iperlipidica (45% delle Kcal totali). Gli stessi autori hanno confermato queste osservazioni nell'uomo dimostrando che in soggetti sani sottoposti per tre giorni ad una dieta iperlipidica (50% delle calorie totali) si verificava una significativa riduzione (20-25%) dell'espressione dei geni PGC-1 α e PGC-1 β e di altri geni regolatori dei processi ossidativi) (103).

Gli effetti del consumo di una dieta grassa sul metabolismo energetico mitocondriale del muscolo scheletrico e sulla tolleranza al glucosio è stata indagata nei ratti (104). Dopo 24 ore di alimentazione grassa, la sintesi di ATP, misurata con ³¹P MRS saturation transfer, è risultata marcatamente depressa. Protraendo l'alimentazione grassa si verifica un transitorio ripristino della sintesi di ATP e una cessazione dell'accumulo di IMCL; tuttavia dopo 4 settimane di dieta iperlipidica si manifesta un progressivo deterioramento della sintesi di ATP e un aumento dell'accumulo di IMCL. Il ritorno ad una dieta normale è sufficiente ad annullare dopo 4 settimane i danni mitocondriali e l'accumulo di IMCL e a ripristinare una normale tolleranza al glucosio. Questi dati suggeriscono un buon grado di plasticità del sistema che lo rende reversibile almeno in acuto (104); questa reversibilità è in accordo con gli studi che mostrano evidenti benefici della restrizione calorica associata a esercizio fisico sulla capacità respiratoria (105).

Queste interessanti osservazioni ottenute nell'animale sperimentale sono state confermate nell'uomo. Particolarmente importante è lo studio di Richardson e coll. che dimostra come

l'infusione di un'emulsione lipidica per 48 ore in soggetti sani riduce l'espressione dei geni mitocondriali nel muscolo scheletrico, in particolare del PGC-1, ed aumenta l'espressione dei geni della matrice extracellulare, quali collagene, fibronectina, proteoglicani, trombospondine, che sono caratteristici di una risposta infiammatoria (106). Questi dati supportano il concetto che la dieta grassa, attraverso la downregulation dei geni ossidativi del muscolo scheletrico e l'upregulation dei geni infiammatori, riduce l'insulino sensibilità con conseguente alterazione della disponibilità di glucosio stimolato da insulina nel muscolo scheletrico.

La riduzione dell'attività ossidativa mitocondriale indotta dal sovraccarico lipidico potrebbe contribuire a spiegare il dato ben consolidato in letteratura che l'eccessivo introito di grassi riduce l'azione insulinica portando allo sviluppo di insulinoresistenza. E' importante tuttavia tener presente che i grassi non sono tutti uguali così come diverso è l'impatto che essi possono esercitare su alcune funzioni biologiche (sensibilità insulinica, infiammazione, tono vascolare ecc.). Tale affermazione trova conferma nei dati dello studio KANWU, un importante studio d'intervento multicentrico europeo volto a valutare l'impatto dei diversi tipi di grassi alimentari sulla sensibilità insulinica, sul profilo lipidico, sulla pressione arteriosa. I risultati di questo studio dimostrano che la dieta ricca in grassi saturi (17% delle calorie totali) ha un effetto sfavorevole, mentre il consumo di grassi monoinsaturi (23% delle calorie totali) esercita un effetto favorevole sulla sensibilità insulinica quando il contenuto di lipidi totali è uguale o inferiore al 37% delle calorie totali, percentuale al di sopra della quale si perde l'effetto differenziale legato alla qualità dei grassi (107).

Poiché vi è una stretta relazione tra la funzione mitocondriale e la sensibilità insulinica, è possibile ipotizzare che i grassi alimentari influenzino la sensibilità insulinica attraverso la loro capacità di modulare geni regolatori dei processi ossidativi mitocondriali.

Uno studio condotto su miotubi umani ha evidenziato che l'esposizione ai grassi saturi (palmitato) downregola l'espressione del gene PGC1 β ma non ha alcun effetto sull'espressione di PGC1 α ;

l'espressione di PGC1 α aumenta da 2 a 3 volte dopo grassi insaturi (oleato) mentre PGC1 β resta immutata. Parallelamente, l'attività mitocondriale, misurata attraverso il dosaggio del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilterazolio bromide, è aumentata dagli FA insaturi mentre è alterata dai SAFA (108). Studi in culture di cellule muscolari scheletriche dimostrano che i SAFA rispetto ai MUFA riducono l'espressione di PGC1 α nonché l'espressione e la funzione dei geni mitocondriali(109) mediante meccanismi che coinvolgono MAPK (109,110).

6 Scopo

Il presente programma di ricerca ha l'obiettivo di valutare l'impatto di differenti interventi nutrizionali sull'espressione dei geni mitocondriali e dei geni che regolano la funzione o la replicazione mitocondriale nel muscolo scheletrico nell'uomo.

Il progetto si articola in due fasi: 1) studio in acuto su volontari sani per valutare l'effetto di pasti con diversa composizione in lipidi (grassi saturi, grassi monoinsaturi e pasto mediterraneo) sul profilo trascrizionale ; 2) studio a medio termine in pazienti con diabete mellito tipo 2 per valutare e confrontare gli effetti di diversi interventi nutrizionali (dieta relativamente ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico (Dieta Mediterranea) e di una ricca in acidi grassi monoinsaturi (Dieta ricca in MUFA/ povera in CHO) da sole ed in associazione con un programma di attività fisica sull'espressione genica.

7 Studio 1

Effetti di pasti con differenti grassi alimentari sull'espressione dei geni del metabolismo ossidativo del muscolo scheletrico nell'uomo: studio in acuto

7.1 Disegno sperimentale

7.1.1 SOGGETTI STUDIATI

Hanno partecipato allo studio 10 volontari sani, 7 maschi e 3 femmine, età media 29 ± 3 anni, IMC 25.0 ± 3 kg /m², le cui caratteristiche sono riportate nella Tabella 2) reclutati tra gli studenti dell'Università Federico II di Napoli. Tutti i soggetti presentavano normale tolleranza al glucosio e normale profilo lipidico. Nessuno aveva storia o sintomi di malattia o assumeva farmaci. Nessuno dei partecipanti era impegnato in attività fisica di tipo agonistico.

Tabella 2 Principali caratteristiche antropometriche e metaboliche dei partecipanti allo studio	
Sesso M/F (n)	7/3
Età (anni)	29 ± 3
IMC (kg/m²)	25.0 ± 3
Colesterolo totale (mg/dl)	154 ± 22
Colesterolo-HDL (mg/dl)	51 ± 19
Trigliceridi (mg/dl)	52 ± 16
Glicemia (mg/dl)	83 ± 11

M \pm DS

7.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE

I partecipanti sono stati studiati in tre diverse occasioni, a distanza di almeno 7 giorni. Nei tre giorni precedenti il test, tutti i volontari hanno seguito una dieta standard (2100 Kcal/die – proteine 17% - lipidi 25% - glucidi 57%) e il loro grado di adesione è stato valutato attraverso il 24-h dietary record. Prima dell'esecuzione del pasto test, un'agocannula 20 G è stata inserita in una vena del braccio per il campionamento del sangue e, dopo avere effettuato i prelievi basali, i partecipanti sono stati sottoposti ad ago aspirato muscolare (FNA) secondo le modalità descritte di seguito. Compilate le valutazioni basali, i partecipanti hanno consumato nell'arco di circa venti minuti uno dei tre pasti (Mediterrano, SAFA, MUFA, Tabella 3) in ordine random (). Prima e ai tempi 60', 120' e 180' del pasto sono stati effettuati i prelievi per la determinazione dei livelli di glicemia, trigliceridi e acidi grassi liberi. Al tempo 180' è stato effettuato un secondo ago aspirato del muscolo vasto laterale.

7.1.3 COMPOSIZIONE DEI PASTI

I tre pasti avevano uguale valore calorico (circa 970 Kcal) ma diversa composizione in macronutrienti e qualità dei grassi : un pasto ricco in grassi saturi (SAFA con una quota lipidica pari al 67% cal tot, di cui 36% saturi) e un pasto ricco in grassi monoinsaturi (MUFA, contenente il 63% lipidi, di cui 37% monoinsaturi) sono stati confrontati con un pasto di riferimento, pasto mediterraneo (MED con lipidi totali 29%). Le caratteristiche bromatologiche dei tre pasti sono riportate nella tabella 3. I pasti sono stati preparati presso il Laboratorio di Dietetica del Dipartimento di Clinica Medica dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", congelati, e riscaldati al momento della somministrazione.

	Proteine (g)	Lipidi Totali (g)	Grassi Saturi (g)	Grassi Monoinsaturi (g)	Carboidrati (g)	Kcal
Pasto MED						
Pasta 70g	7,6	0,9	0,1	0,1	55,3	247,1
Fagioli 110 g	25,9	2,2	0,4	0,1	55,8	333,3
Prosciutto 37 g	9,6	8,2	2,7	3,7	-	113,2
Olio di Oliva 20 g	-	19,9	2,8	14,5	-	179,8
Mela 200 g	0,6	0,2	-	-	27,4	106,0
TOTALE	43,8	31,6	6,2	18,5	138,6	979,4
Pasto SAFA						
Pane 110 g	9,3	5,5	2,2	-	51,2	279,1
Uova 120 g	14,8	10,4	3,8	3,1	-	153,6
Formaggio 20 g	5,1	6,4	4	1,8	-	78,4
Burro 60 g	0,4	50	29,2	14,2	0,6	454,8
TOTALE	29,8	72,3	39,3	19,1	51,9	965,9
Pasto MUFA						
Patate 300 g	6,3	3	0,5	0,1	54	255
Uova 60 g	7,4	5,2	1,9	1,5	tr	76,8
Parmigiano 25 g	8,3	7	4,6	2,2	tr	96,7
Latte parzialmente scremato 30g	1	0,4	0,2	0,1	1,5	13,8
Olio di Oliva 50 g	-	49,9	7,2	36,4	-	449,5
Pangrattato 10 g	1,1	0,1	-	-	7,7	35,4
Prosciutto cotto 30 g	6,6	1,3	0,4	0,5	0,3	39,6
TOTALE	30,9	67,1	14	38,1	63,5	966,8

TABELLA 3 . Caratteristiche bromatologiche dei tre pasti

7.1.4 METODI ANALITICI

Le concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale, colesterolo HDL, glicemia, trigliceridi e acidi grassi liberi, sono state determinate con metodi standard. Il colesterolo LDL è stato calcolato con la formula di Friedewald.

7.1.5 ASPIRATO MUSCOLARE CON AGO SOTTILE “FINE NEEDLE ASPIRATION” (FNA)

La determinazione della espressione genica è stata effettuata su RNA estratto da cellule muscolari scheletriche ottenute dal muscolo vasto laterale mediante tecnica non invasiva “Fine Needle Aspiration” (FNA).

La tecnica “Fine Needle Aspiration” (FNA) consiste nell’ottenere piccoli campioni di aspirato muscolare tramite un ago sottile di circa 22 gauge (Becton Dickinson, Madrid) che viene inserito nella parte mediale del muscolo vasto laterale (figura 14). L’aspirazione viene effettuata mantenendo una siringa di circa 60 ml nella sua massima estensione per 2 minuti tramite un supporto fermo. Il materiale prelevato viene immerso in una provetta contenente una soluzione di RLT (Quiagen GmbH, Hilden, Germany) diluita 1:3 in dietil pirocarbonato. Il materiale prelevato era immediatamente congelato a -80°C per le successive determinazioni presso l’Unità Operativa del Dipartimento di Chimica Biologica “G.Fornaini” dell’Università di Urbino “Carlo Bo”. La procedura richiede circa 3 minuti, è indolore e non invasiva. Il prelievo veniva effettuato a digiuno (T 0) e a tre ore dopo il pasto-test (T 180).

7.1.6 ESTRAZIONE DELL' ACIDO NUCLEICO

Al momento della determinazione, il tessuto muscolare è rapidamente scongelato e incubato con 0.2 mg/ml di Proteinasi K a 55 °C per 10 min. Successivamente, il DNA e l' RNA totale sono copurificati usando micro colonne in silicio mediante un Kit RNeasy Micro (Qiagen) secondo istruzioni del costruttore (111).

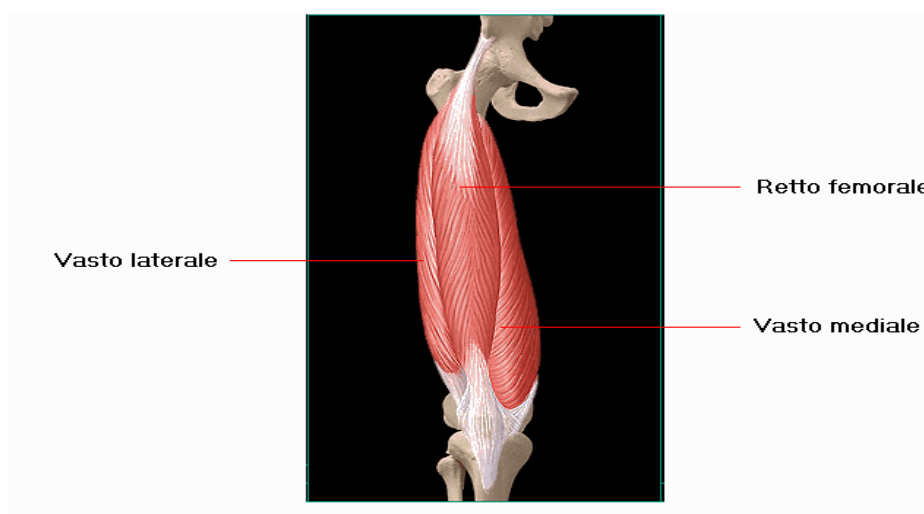


Figura 14 Muscolo della coscia

7.1.7 TECNICA “MULTIPLEXED TANDEM REAL-TIME PCR”

L'RNA totale estratto, viene retrotrascritto in presenza di primers specifici per i geni in esame, e utilizzato per valutare l'espressione genica attraverso la tecnica “Multiplexed Tandem real-time PCR”, che consente di ottenere simultaneamente la quantificazione dell'espressione di diversi geni a partire da frammenti di RNA (111) (tabella 4). I livelli di espressione di GAPDH, actine e B2M sono usati per normalizzare l'espressione genica.

Dall' analisi dei livelli di espressione genica troviamo che i livelli di espressione si modificano significativamente in risposta ai differenti pasti pertanto GAPDH è stato rimosso dai geni usati per

la normalizzazione. Real-time PCR amplifications è stata effettuata usando Light-Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Basilea, Switzerland) in accordo con le istruzioni del produttore.

Genes	Forward (F1) 5'-3'	Forward (F2) 5'-3'	Reverse (R) 5'-3'
18S	accataaacgatgccgacc	tgactcaacacgggaaacct	gtccaccaactaagaacg
GAPDH	aatcaagtggggcgatgc	aatcaagtggggcgatgct	tgtgatgatcttgaggetg
β2m	tgactttgtcacagcccaag	gatcgagacatgtaagcagc	caacatggagacagcactc
PGC-1α	aatatcagcagagaggetg	tgacagtaaatctgcggga	ttcgttgacctgegcaaag
PGC-1β	ctaaaagtcacggccttgtg	ctacataagcacctcacctcg	tgtagcgtatgagttgcacc
COXII	attcctagaaccaggcgac	agatgcaattccccgacgt	catgaaactgtggtttgctcc
COXVb	acaatgtactggccccaaagg	acaatgtactggccccaaagg	ttgtaatgggctccacagc
GLUT-4	tcagagactccaggatcggt	gagctacaatgagacgtggct	aaatcatgccgccccagggaa
NRF-1	gaaactcgagccacgttag	ctttggagaatgtggtgcgt	agactggaattccgtcgatg
NRF-2	atgtctgcagtgtgaaggca	agctaaagcatgtgtgcctg	ctgctctttgccagtaac
ERR-α	tgacagtccaaagggtcctcg	acgagtgtgagatcaccaagc	ccgccgettgtacttetg
PFK	tcatgacctgaagagcacc	cgagttggtatcttcaccggt	gttccgaaagtctctgcaac
LPL	ttcatggtgatccatggctg	atgcatgtgtggactgg	tcagacttctgaatgcca
CPT-1	tcagttgatccagagatgc	agacatctctgccaagctt	tcttgggaattctttggccag
PPARα	ggaagctttggctttacgga	tcggtgacttatcctgtggt	cgaatcgttcgccgaaagaa
PPARγ	caatcaaagtggagcctgca	tgcttgaaggatgcaagg	atgagacatccccactgcaa
PPARδ	aagacagatgaccaacgag	tgtagaggtccatctgcgtt	atgaacaccgtagtgaagc
CLS1	gaaactgggccaatcaaaga	atccttgcctatgccactgct	aaactggagctgccaagaa
TFAM	aggatcttctacgtgcac	tcacaatggataggcacagg	tggcagaagtccatgagct
Tabella 4 Primer usati per Multiplexed Tandem real-time RT-PCR			

7.2 Analisi Statistica

I dati sono espressi come Media \pm DS. Le differenze tra i tre pasti sono state valutate con analisi ANOVA. In caso di differenze, è stata eseguita un'analisi post hoc di Duncan per confronti a coppie. L'analisi multipla discriminante tra gruppo SAFA, MUFA e MED, dei livelli di espressione di mRNA normalizzato, prima e dopo i pasti, è stata effettuata usando SPSS per Windows 8.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). È stato considerato significativo un valore di $p < 0,05$.

7.3 Risultati

I livelli di glucosio, FFA e trigliceridi dopo i tre pasti sono mostrati nella Figura 15. I livelli glicemici si riducono lievemente dopo i pasti senza differenze tra i 3 pasti. Gli FFA si riducono 1 ora dopo i pasti and restano soppressi dopo il pasto MED mentre ritornano ai livelli basali con i pasti SAFA e MUFA. I livelli di FFA sono significativamente più elevati in risposta al pasto grasso rispetto al pasto MED (MED vs MUFA: $p= 0.031$ T60; $p=0.003$ T120; $p<0.0001$ T180; MED vs SAFA $p=0.041$ T120, $p<0.0001$ T180). I valori di trigliceridi plasmatici sono quasi raddoppiati nel periodo postprandiale senza differenze tra i tre pasti.

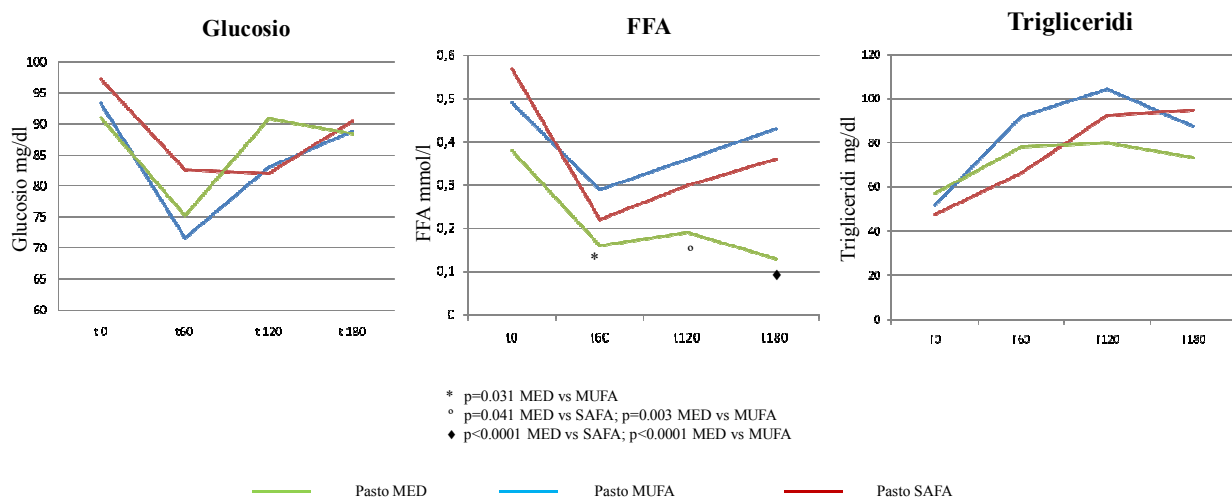


Figura 15 Profilo di glucosio, FFA e trigliceridi dopo i 3 pasti

7.3.1 Analisi dell'espressione dei livelli di mRNA muscolare

Il profilo trascrizionale dei principali geni mitocondriali in risposta ai differenti pasti è mostrato nella Figura 16. Dopo il pasto MED c'è un chiaro trend verso l'aumento dell'espressione dei geni analizzati, eccetto per PGC1 α , che mostra una lieve e non significativa riduzione. Il pasto MUFA è associato con una riduzione statisticamente significativa dell'espressione del fattore di trascrizione PPAR δ ($p < 0.006$) mentre PPAR γ and PPAR α non si modificano. Riguardo l'espressione dei geni che regolano la biogenesi mitocondriale, osserviamo un significativo incremento nei livelli di PGC-1 β che tende a raddoppiare ($p = 0.02$) e una lieve ma non significativa riduzione di PGC1 α . Inoltre, nè l'espressione dei geni COX5b e COX2, che codificano per l'enzima citocromo c ossidasi, nè l'espressione del gene GLUT4, che codifica per il trasportatore del glucosio, si modificano con il

pasto MUFA. Un pattern completamente differente si osserva dopo pasto SAFA. L'espressione sia di PGC1 α che PGC1 β e PPAR α tende a ridursi raggiungendo una differenza statisticamente significativa per PPAR α ($p < 0.001$). Più interessante è l'espressione dei geni COX che risulta marcatamente ridotta ($p < 0.001$ per COX2 and $p = 0.0006$ per COX5b). In aggiunta, il pasto SAFA è associato con una significativa riduzione della trascrizione di PFK ($p < 0.003$), LPL ($p = 0.002$) e GLUT 4 ($p = 0.009$).

Il confronto delle variazioni dell'espressione genica tra i pasti MUFA, SAFA e MED non mostra significative modifiche nei livelli di espressione dei singoli geni. Abbiamo, quindi, valutato se i tre pasti inducessero una diversa co-regulation di geni multipli mediante l'uso dell' analisi multipla discriminante. Questo approccio mostra, con una capacità discriminante dell' 80%, che il profilo trascrizionale dei tre pasti è diverso. Pertanto, l'analisi intra-gruppo evidenzia una significativa down-regulation, a livello dell'mRNA, dei geni ossidativi solo dopo pasto SAFA, mentre l' analisi globale identifica un differente adattamento dell' mRNA in risposta ai tre pasti (Figura 17).

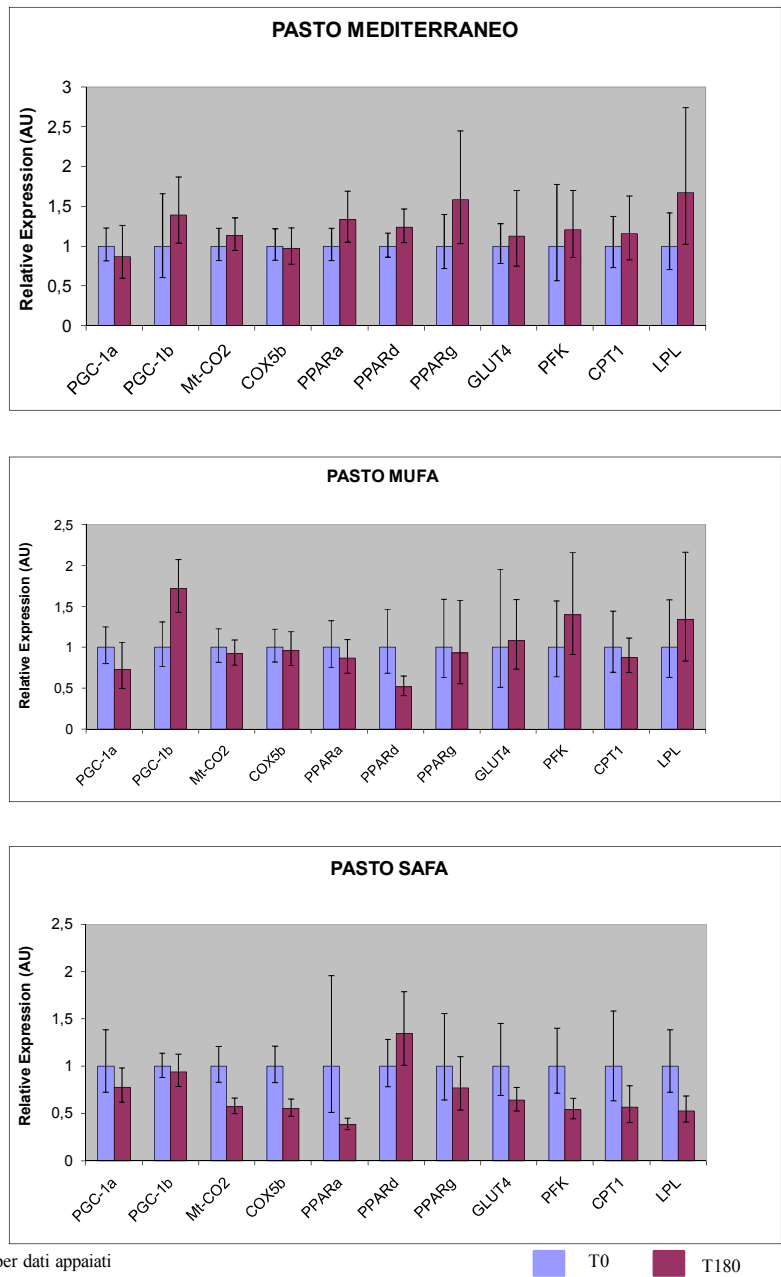


Figura 16 Profilo trascrizionale dei principali geni mitocondriali in risposta ai differenti pasti

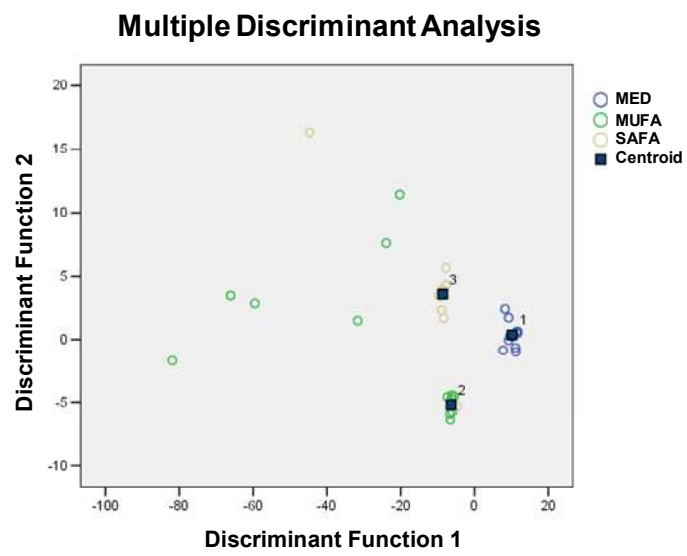


Figura 17 Analisi Multipla discriminante

7.4 Discussione

Il presente studio dimostra che pasti con differente composizione sono capaci di modulare acutamente l'espressione dei geni coinvolti nella biogenesi e nella funzione mitocondriale in soggetti sani. In particolare, l'analisi dell'mRNA con real-time PCR, mostra una tendenza all'aumento dell'espressione dei geni mitocondriali dopo pasto MED suggerendo un'"attivazione" di pathways metabolici in risposta ad un'aumentata disponibilità di substrati. Il pasto MUFA si associa ad un significativo aumento dei livelli di mRNA di PGC-1 β ($p=0.02$) mentre nessuna modifica rilevante si osserva nell'espressione dei geni ossidativi. Al contrario, il pasto SAFA mostra una down-regulation di quasi tutti i geni analizzati con una marcata riduzione dell'mRNA dei geni che regolano l'attività ossidativa mitocondriale. Infatti, l'espressione di COX2 e COX5b che codificano per la citocromo c ossidasi - enzima chiave della catena di trasporto degli elettroni - è ridotta del 70% dopo pasto SAFA.

Sebbene tra i tre pasti non vi siano significative differenze nei livelli di espressione dei singoli geni, l'analisi lineare multipla discriminante dimostra l'induzione di 3 gruppi di geni co-regolati in risposta alla somministrazione dei pasti. Tali adattamenti probabilmente indicano una minima ma multipla regolazione dell'mRNA che non viene apprezzata quando gli mRNA vengono analizzati individualmente. Da questa analisi si evidenzia che il pasto MED induce un programma di espressione dell'mRNA chiaramente distinguibile dai pasti grassi ed, inoltre, che il meccanismo di adattamento dei geni in risposta ai due pasti grassi SAFA e MUFA mostra dei tratti sovrapposti.

Diversi studi hanno mostrato una marcata modifica della funzione mitocondriale sia nell'animale sperimentale (103, 112) che nell'uomo quando sottoposti ad infusione di un'emulsione lipidica o a dieta grassa (103,106, 113). Sparks et al. per primi hanno mostrato che topi alimentati con dieta grassa per 3 settimane presentano una down-regulation dei geni coinvolti nella fosforilazione

ossidativa mitocondriale (103). Gli stessi autori hanno confermato questi risultati in volontari sani dimostrando che il consumo per 3 giorni di una dieta iperlipidica (50% delle kcal totali) riduceva l'espressione di PGC1 α e PGC1 β e dei geni target ossidativi, rispetto ad una dieta di riferimento (103).

Studi successivi hanno ampliato queste osservazioni dimostrando che la dieta grassa induce disfunzione mitocondriale e, parallelamente, una concomitante riduzione della insulino sensibilità (106,113). Hoeks et al. (113) and Richardson et al. (106) hanno mostrato che l'aumento degli acidi grassi plasmatici a livelli fisiologici è in grado di down-regolare i geni mitocondriali, PGC-1 e, contemporaneamente, alterare l'utilizzazione insulino-stimolata del glucosio valutata mediante clamp euglicemico iperinsulinemico. In aggiunta, Richardson et al. hanno osservato un marcato incremento dell'espressione dei geni che codificano per le proteine della matrice extracellulare, come collagene, fibronectina, inibitore tissutale delle metallo proteinasi, dopo prolungata (48-h) infusione lipidica (106); tale pattern è caratteristico della risposta infiammatoria. In linea, con queste osservazioni, studi basati sull'uso della Risonanza Magnetica hanno mostrato in volontari sani che l'infusione acuta di lipidi riduce l'uptake/fosforilazione del glucosio muscolare, la sintesi di glicogeno, l'ossidazione del glucosio, e la sintesi di ATP (13, 15).

Nel complesso, questi dati supportano il concetto che un eccessivo intake di grassi, attraverso la down-regulation dei geni ossidativi del muscolo scheletrico e l'up-regulation dei geni infiammatori, riduce l'insulino sensibilità con conseguente alterazione dell'utilizzazione del glucosio insulino-stimolata nel muscolo scheletrico.

La ridotta capacità ossidativa risulta in un accumulo nel muscolo di metaboliti intermedi degli acidi grassi, quali ceramide, acil Co-A e diacilglicerolo, che sono noti interferire con diverse tappe del segnale insulinico (18) e attivare pathways pro-infiammatori (19). L'accumulo di metaboliti degli acidi grassi nelle vicinanze della matrice mitocondriale, dove si svolgono i processi ossidativi, promuove la produzione di perossidi lipidici che danneggiano le proteine mitocondriali e riducono

ulteriormente i processi ossidativi (114,115). Questo dato è supportato dall'osservazione che la produzione mitocondriale di ROS è aumentata in topi alimentati con dieta ricca in grassi e che gli agenti anti-ossidanti sono di correggere l'alterazione mitocondriale (112).

Nel presente studio abbiamo indagato l'effetto di grassi monoinsaturi vs. grassi saturi sull'espressione muscolare dei geni mitocondriali essendo noto che questi due tipi di grassi alimentari esercitano effetti metabolici differenti (107). E' stato infatti dimostrato che la qualità dei grassi influenza la sensibilità insulinica; studi in vitro su cellule muscolari scheletriche hanno dimostrato che il palmitato induce insulino-resistenza (116, 117), mentre l'oleato migliora l'insulino sensibilità (109,118,119). Inoltre, sia in soggetti sani che nei pazienti con diabete tipo 2 la sostituzione dei grassi saturi con i grassi monoinsaturi induce un aumento della sensibilità insulinica (107,120,121). Sebbene i meccanismi responsabili del diverso effetto dei grassi saturi e insaturi sulla sensibilità insulinica non siano stati ancora identificati, è verosimile che siano implicati molteplici fattori, quali l'accumulo di DAG (122) e ceramide, la ridotta espressione dei geni mitocondriali, il ridotto consumo di ossigeno cellulare (110) e la disfunzione mitocondriale (123). Un recente studio di confronto degli effetti del palmitato e dell'oleato in cellule muscolari scheletriche Rat L6 mostra che il palmitato aumenta significativamente la produzione di ROS con concomitante disfunzione mitocondriale, inibizione del segnale insulinico e riduzione dell'attività di PGC-1 α (124).

Sebbene l'effetto dei grassi sulla funzione mitocondriale e sull'insulino resistenza sia stato ben studiato, molto scarsi e controversi sono i dati riguardanti l'impatto di differenti tipi di grassi sull'espressione genica (108,109). Staiger et al. Hanno osservato che l'esposizione di miotubi umani ad acidi grassi saturi (palmitato) downregula PGC1 β mentre non induce modifiche di PGC1 α laddove gli acidi grassi insaturi (oleato) incrementano PGC1 α ma non modulano PGC1 β (108). Queste modifiche sono accompagnate da cambiamenti dell'attività mitocondriale, che è aumentata dagli acidi grassi insaturi e ridotta dai saturi. Differenti risultati sono stati ottenuti in linee cellulari

di mioblasti, da Coll et al. i quali hanno osservato che il palmitato, ma non l'oleato, riduce l'espressione di PGC1 α mentre non modifica PGC1 β (109). Nessuno di questi studi, tuttavia, ha esaminato l'espressione dei geni ossidativi. Il nostro studio fornisce una nuova informazione, cioè che nelle cellule muscolari umane i grassi saturi riducono l'espressione dei geni mitocondriali, in particolare di quelli coinvolti nei processi ossidativi. La mancanza, nel nostro studio, di una riduzione statisticamente significativa dell'espressione di PGC1, come osservato in altri studi (103,106), può essere spiegata dal fatto che noi valutiamo gli effetti di un singolo pasto, mentre in studi precedenti gli interventi nutrizionali sono stati più prolungati (giorni di dieta grassa o 48-ore di infusione lipidica). Un'altra interessante osservazione del nostro studio è la significativa riduzione dell'espressione del gene GLUT 4 in risposta al pasto SAFA che suggerisce un ridotto uptake muscolare di glucosio. Questo risultato è in linea con precedenti studi che mostrano in soggetti sani una riduzione dell'insulina sensibilità a seguito di una dieta ricca in grassi saturi (107).

L'aumentata espressione di PGC1 β in risposta al pasto MUFA non è di facile interpretazione. Un simile risultato è stato osservato in cellule muscolari murine da Rodriguez et al. Che, valutando il time-course dell'espressione genica dopo esposizione ad una miscela di acido oleico/linoleico, hanno documentato una precoce upregulation di PGC1 β a 4-ore con ritorno al baseline dopo 8-ore, suggerendo che questo transitorio incremento può essere una risposta adattativa al sovraccarico lipidico (125).

Il nostro studio presenta alcuni limiti che meritano di essere discussi. Primo, noi misuriamo l'espressione genica solo 180 min dopo il pasto, e quindi non possiamo escludere che alcune delle modifiche osservate possano essere transitorie; inoltre, le modifiche dell'espressione genica non riflettono necessariamente le modifiche della funzione metabolica associata. Tuttavia, la riduzione coordinata di regolatori trascrizionali, geni coattivatori, geni ossidativi e geni del trasporto del glucosio dopo pasto SAFA indicano concordemente una riduzione dei processi ossidativi. Un altro limite del nostro studio è la mancata valutazione dell'insulina sensibilità che non ci consente di

stabilire un nesso tra la riduzione dell' espressione dei geni ossidativi dopo pasto SAFA ed eventuali modifiche dell' insulino-sensibilità. Tuttavia, sebbene non abbiamo fornito una valutazione diretta di questo parametri, in letteratura vi sono solide evidenze che i grassi saturi alterano la sensibilità insulinica.

In conclusione, il presente studio mostra che l'espressione dei geni mitocondriali nel muscolo scheletrico di volontari sani può essere modulata da modifiche acute dell'intake di nutrienti. La dieta iperlipidica ha un impatto differenziale sul profilo di trascrizione genica in quanto i grassi saturi, ma non i monoinsaturi, downregolano l'espressione dei geni coinvolti nel trasporto e nell'ossidazione del glucosio.

8.0 Studio 2

Effetti di diversi interventi nutrizionali sul profilo trascrizionale dei geni del metabolismo ossidativo nel muscolo scheletrico di pazienti con Diabete mellito tipo 2

8.1 Disegno sperimentale

8.1.1 SOGGETTI

Hanno partecipato allo studio 13 soggetti (11 uomini e 2 donne) con diabete tipo 2, reclutati presso l'Unità di Diabetologia del Dipartimento di Medicina Interna dell'Università Federico II di Napoli. Tutti i pazienti presentavano uno stato di sovrappeso/obesità, erano in buon compenso glicemico (HbA1c <7%) con la terapia dietetica o con metformina, e presentavano un buon profilo lipidico in assenza di terapia ipolipidizzante. Nessuno dei soggetti studiati presentava insufficienza renale (creatininemia >1.7 mg/dl) o epatica (transaminasi più di due volte i valori normali), cardiopatia ischemica nota o silente (test da sforzo positivo) o qualsiasi patologia e/o condizione acuta o cronica pregiudicante lo stato di salute.

8.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE

Prima dell'inizio del trattamento, della durata di otto settimane, tutti i partecipanti hanno seguito un periodo di run-in di circa 3 settimane durante il quale hanno consumato una dieta relativamente ricca in acidi grassi saturi (SAFA: CHO 48%, grassi 33%, saturi 13%, proteine 18% delle calorie totali) senza modificare il proprio livello di attività fisica.

Lo studio è stato eseguito secondo un disegno sperimentale randomizzato a quattro gruppi paralleli (figura 18) con la somministrazione di:

- Gruppo 1: Dieta Mediterranea, ad alto contenuto in fibre e a basso indice glicemico (Dieta Med)
- Gruppo 2: dieta povera in CHO e ricca in acidi grassi monoinsaturi (Dieta MUFA)
- Gruppo 3: Dieta Mediterranea più programma di attività fisica (Dieta Med +AF)
- Gruppo 4: dieta povera in CHO e ricca in acidi grassi monoinsaturi più programma di attività fisica (Dieta MUFA + AF)

Dopo la randomizzazione, i pazienti sono stati istruiti da una dietista sul tipo di dieta da seguire e hanno ricevuto gli schemi settimanali differenziati per il tipo di intervento dietetico. Inoltre, sono stati loro forniti alcuni degli alimenti caratterizzanti le due diete (olio d'oliva per dieta MUFA e bastoncini di crusca per la dieta MED ricca in fibre). Nel corso dello studio i pazienti hanno ricevuto consulenze dietologiche ogni 2 settimane e sono stati contattati telefonicamente ogni settimana dalla dietista per rinforzare l'adesione alla dieta. Ad ogni controllo i pazienti consegnavano il diario alimentare settimanale su cui venivano riportate la quantità e la qualità degli alimenti assunti per la valutazione dell'adesione al trattamento dietetico. I pazienti randomizzati nei bracci dell'attività fisica ricevevano in occasione delle visite ambulatoriali, informazioni riguardo i benefici dell'esercizio fisico e un counseling motivazionale in aggiunta ad un programma di attività fisica strutturato.

Tutti i pazienti, sia quelli assegnati ai gruppi di attività fisica che quelli del solo intervento dietetico, hanno compilato ogni 15 giorni un questionario validato (IPAQ) per la quantizzazione dell'attività fisica svolta al di fuori del programma di esercizio fisico strutturato, se previsto.

All'inizio e alla fine dell'intervento sono state praticate le seguenti valutazioni:

- Misure antropometriche (peso, altezza, circonferenza vita)
- Valutazione del profilo lipidico e dell'insulino resistenza
- Pasto test
- Test da sforzo cardiopolmonare

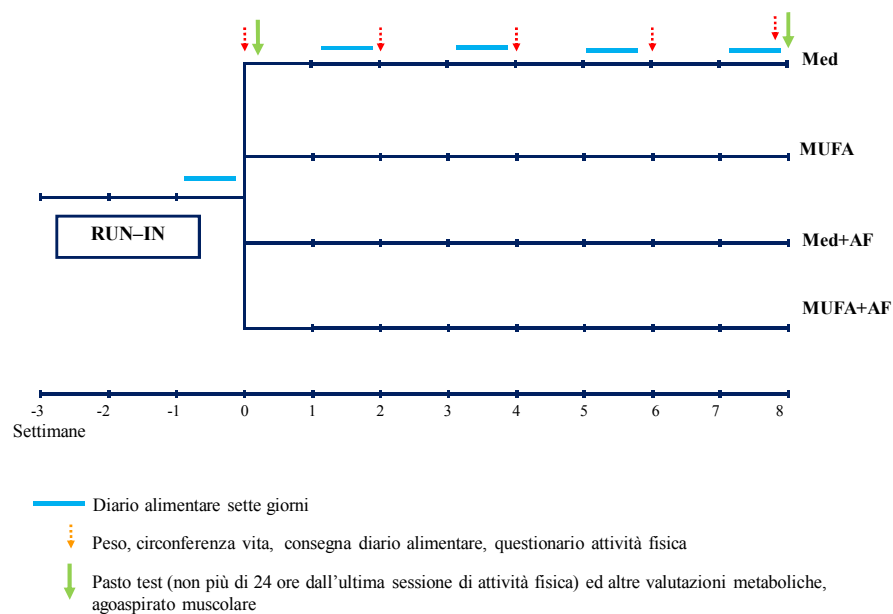


Figura 18 Disegno dello studio

8.1.3 PROGRAMMA DI ATTIVITÀ FISICA

Il programma di attività fisica strutturata è stato svolto presso il centro di Riabilitazione Cardiologica del Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Cardiovascolari dell' Università Federico II di Napoli. I pazienti hanno effettuato con frequenza tri-settimanale esercizio di tipo aerobico (tapis roulant), al 50-70% della VO₂ max (intensità), della durata di 45 minuti escluso riscaldamento e defaticamento .

8.1.4 COMPOSIZIONE DELLE DIETE

Le due diete erano isoenergetiche al fine di mantenere il peso corporeo costante e differivano per composizione in macronutrienti. Esse avevano lo stesso contenuto di proteine e grassi saturi, ma differivano per il contenuto in carboidrati (52% dieta MED e 40% dieta MUFA), in grassi totali (dieta MED 30 vs 42% dieta MUFA), in acidi grassi monoinsaturi (16% dieta MED e 29% dieta MUFA), fibre (28g x1000 calorie dieta MED 10gx1000 calorie dieta MUFA) e indice glicemico (60 dieta MED vs 95 dieta MUFA).

8.1.5 COMPOSIZIONE DEI PASTI TEST

Il pasto test, del contenuto calorico di circa 930Kcal, era costituito al basale da un pasto ricco in SAFA (panino con prosciutto cotto, emmenthal e maionese) e dopo l'intervento, da un pasto ricco in CHO (pasta e fagioli e una mela) per i gruppi di intervento MED e MED+AF o da un pasto ricco in MUFA (risotto con carciofi) per i gruppi MUFA e MUFA+AF. La composizione dei pasti test è riportata nella tabella 5.

	Pasto ricco in SAFA	Pasto ricco in CHO	Pasto ricco in MUFA
Energia totale (kcal/die)	940	923	933
Proteine (%)	20	18	18
Grassi totali (%)	34	30	42
Saturi(%)	14	7	7
Monoinsaturi (%)	9	16	29
Polinsaturi tot (%)	8	4	4
Carboidrati (%)	46	52	40
Fibre (g/1000 Kcal)	7	28	9
Indice glicemico	83	60	95

Tabella 5 Composizione dei pasti test

8.1.6 VALUTAZIONI DURANTE PASTO-TEST

Gli studi con il pasto-test sono stati effettuati al mattino dopo 12 ore di digiuno. Una cannula di polietilene 20G è stata inserita in una vena del braccio il campionamento del sangue. Ai tempi 0, 120, 240, 360 min sono stati effettuati prelievi per la determinazione di trigliceridi, acidi grassi liberi, glicemia. Al tempo 360 tutti i pazienti sono stati sottoposti ad aspirato con ago sottile del muscolo vasto laterale.

8.1.7 METODI ANALITICI

Le concentrazioni plasmatiche di glucosio, trigliceridi, acidi grassi liberi ed insulina sono state determinate con metodi standard. L'HbA1c è stata determinata con metodica HPLC. Il colesterolo LDL è stato calcolato con la formula di Friedewald.

8.1.8 ASPIRATO MUSCOLARE CON AGO SOTTILE “FINE NEEDLE ASPIRATION” (FNA)

La valutazione dell'espressione genica è stata effettuata su RNA estratto da cellule muscolari scheletriche ottenute dal muscolo vasto laterale mediante tecnica non invasiva “Fine Needle Aspiration” (FNA) e analizzata mediante tecnica “Multiplexed Tandem real-time PCR”, come descritto nello Studio 1. E' stata valutata l'espressione dei principali geni chiave del metabolismo ossidativo mitocondriale: PGC1, COX2, COX5b.

8.2 Risultati

Le caratteristiche antropometriche e metaboliche dei partecipanti prima e dopo le 8 settimane di intervento sono mostrate nella tabella 6. Vengono di seguito riportati i risultati relativi a 13 pazienti che sono stati randomizzati come segue:

Gruppo MED: 3 pazienti; Gruppo MUFA: 4 pazienti

Gruppo MED+AF: 2 pazienti; Gruppo MUFA+AF: 4 pazienti

All'ingresso nello studio, i soggetti studiati presentavano un IMC medio di $28.5 \pm 2.7 \text{ Kg/m}^2$, indicativo di uno stato di sovrappeso/obesità di lieve grado con distribuzione del grasso prevalentemente a livello addominale (circonferenza vita $99.5 \pm 5.8 \text{ cm}$). Il peso corporeo al basale era maggiore nei gruppi randomizzati ad intervento nutrizionale (MUFA e MED) + attività fisica rispetto al solo intervento nutrizionale e non subiva modifiche nel corso dello studio. Per quanto riguarda i parametri ematochimici, il compenso glicemico era ottimale al basale (HbA1c media

6.6%) e rimaneva invariato dopo l'intervento (HbA1c media 6.4%) in tutti i gruppi di soggetti. Non si osservava nessuna differenza significativa tra i 4 gruppi di trattamento nel profilo lipidico a digiuno prima e dopo gli interventi. Tutti i pazienti presentavano una marcata insulino-resistenza come evidenziato dall'HOMA index. La capacità aerobica espressa come VO₂ al picco non mostrava differenze tra i gruppi né al basale né alla fine dell'intervento.

Tabella 6 Caratteristiche antropometriche e metaboliche e capacità aerobica prima e dopo le 8 settimane di intervento

	MED		MUFA		MED + AF		MUFA + AF	
	basale	finale	basale	finale	basale	finale	basale	finale
Età (a)	58.0±4.6		59.2±8.6		58.0±7.1		54.7±7.6	
Sesso (M/F)	2/1		3/1		2/0		4/0	
Peso (Kg)	76.7±15.6	77.2±15.8	70.9±4.0	70.8±4.5	92.9±12.6	93.0±12.7	83.4±5.2	83.8±5.1
IMC (Kg/m ²)	29.8±1.9	29.8±1.9	26.1±1.8	26.0±1.9	30.3±4.7	30.3±4.7	29.2±1.9	29.3±1.9
Circonferenza vita (cm)	100.7±8.8	101.2±9.3	94.0±7.2	93.2±7.7	105.0±7.1	104.0±5.6	101.4±7.3	101.5±6.9
HbA1c (%)	6.4±0.3	6.4±0.5	6.8±1.4	6.1±0.9	6.2±0.8	6.3±0.8	6.9±0.8	6.8±0.6
Colesterolo tot (mg/dl)	148.0±31.4	153.7±38.0	185.5±26.4	168.7±23.8	134.5±41.7	149.5±41.7	164.0±39.4	165.2±41.4
Col HDL (mg/dl)	32.0±12.1	31.7±9.1	38.2±7.9	37.0±4.1	32.0±2.8	32.5±2.1	38.0±3.9	39.0±5.6
Trigliceridi (mg/dl)	144.0±115.2	189.3±181.7	136.7±45.9	118.7±40.3	83.5±2.1	113.0±18.4	106.7±32.0	85.5±8.6
Col LDL (mg/dl)	87.7±18.1	89.0±26.4	120.7±19.2	110.5±27.3	92.2±40.6	98.5±37.5	103.5±32.2	110.5±33.0
Glicemia (mg/dl)	141.7±14.0	135.7±44.6	131.0±17.1	135.0±15.7	127.0±1.4	146.0±0.0	147.0±11.7	145.7±27.6
HOMA	4.9±2.7	6.0±0.3	3.4±1.4	3.4±2.6	5.4±1.8	6.6±3.6	4.2±0.8	3.8±0.9
pVO ₂ (ml/Kg/min)	15.9±1.7	14.2±1.8	14.3±2.7	14.9±5.7	14.5±1.1	14.8±2.0	17.7±2.7	17.7±2.4

I 4 gruppi non differivano per livelli di attività fisica giornaliera misurata mediante questionario (7 day activity recall). La tabella 7 riporta i consumi alimentari dei partecipanti calcolati mediante diario alimentare e mostra una buona aderenza alla dieta in tutti e 4 gruppi di intervento.

Tabella 7 Composizione delle diete seguite durante le 8 settimane di intervento nei 4 gruppi di soggetti

	CHO/fibre	MUFA	CHO/fibre+AF	MUFA+AF
Intake Energetico Totale (kcal/die)	1818±764	1944±310	2269±43	2341±466
Proteine (% ET)	21±0.8	17±1.9	20±1.8	19±1.5
Grassi (%ET)	28±1.4	42±1.8	29±0.7	42±3.0
Saturi (%ET)	6.0±0.9	6.8±0.65	5.7±0.3	6.6±0.7
Monoinsaturi (%ET)	16±0.3	27±1.2	17±1.1	28±2.0
Polinsaturi (%ET)	3.8±0.8	4.76±0.4	3.8±0.3	4.6±0.9
Carboidrati (%ET)	51±1.0	41±1.5	51±1.1	39±1.6
Fibre (g/1000 kcal)	26±3.0	9±1.4	26±0.9	8±1
Indice glicemico (%)	60±3	94±5	59±1	92±4
Carico Glicemico	15651±3712	20326±4507	16183±3457	24269±4338

CHO: carboidrati; MUFA: acidi grassi monoinsaturi

La Figura 19 mostra i livelli di glucosio, FFA e trigliceridi dopo i pasti test, sia al basale (pasto relativamente ricco in SAFA) sia dopo l'intervento (pasto MED e pasto MUFA).

La glicemia, sia prima che dopo l'intervento, mostra un graduale aumento dopo pasto test con picco massimo a 120 minuti e ritorno ai valori basale dopo 6 ore senza differenze tra i 3 pasti.

I valori di trigliceridi tendono ad aumentare di circa il 40% in risposta al pasto, sia prima che dopo l'intervento, e restano elevati per tutta la durata dell'osservazione senza differenze significative tra i gruppi. Gli acidi grassi si riducono di circa il 50% 2 ore dopo i pasti e restano soppressi nelle ore successive, sia prima che dopo il trattamento.

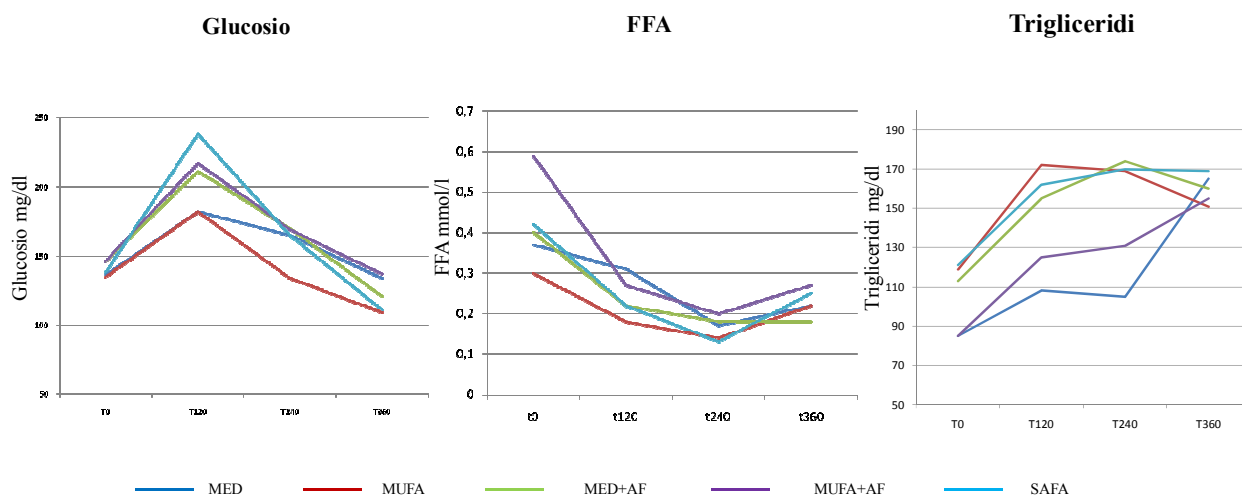


Figura 19 Profilo di glucosio, acidi grassi e trigliceridi dopo pasto test al basale (pasto SAFA) e dopo gli interventi (MUFA, MED, MUFA+AF e MED+AF)

8.2.1 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI LIVELLI DI mRNA MUSCOLARE

Il profilo trascrizionale dei principali geni mitocondriali dopo pasto test nei 4 gruppi di intervento è mostrato nella figura 20.

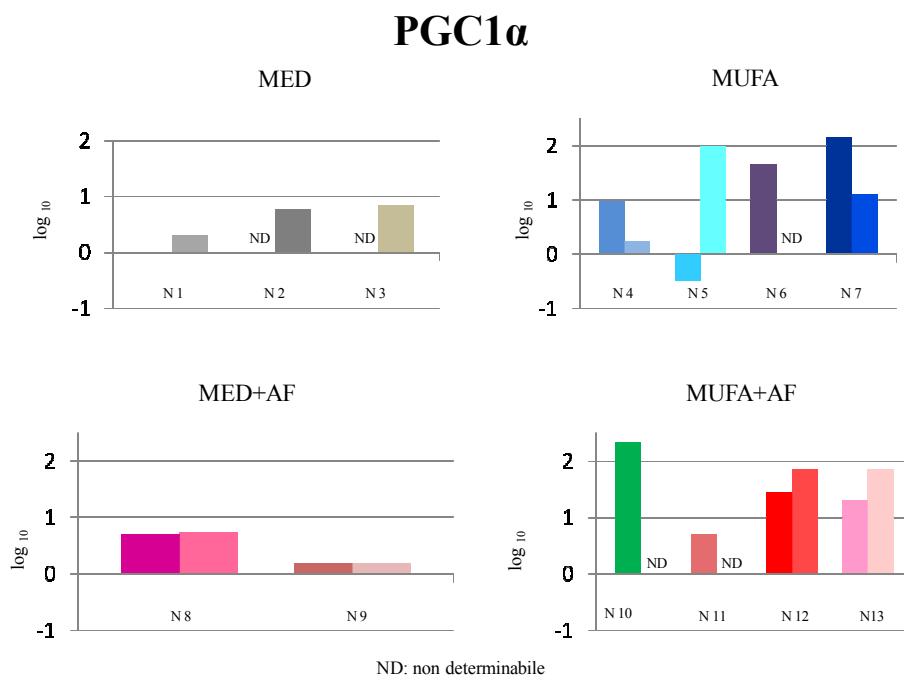
Abbiamo analizzato l'espressione dei geni PGC1, COX2b e COX5 nei singoli soggetti.

Il gene **PGC1 α** , generalmente meno espresso rispetto ai geni COX2b e COX5 non è stato

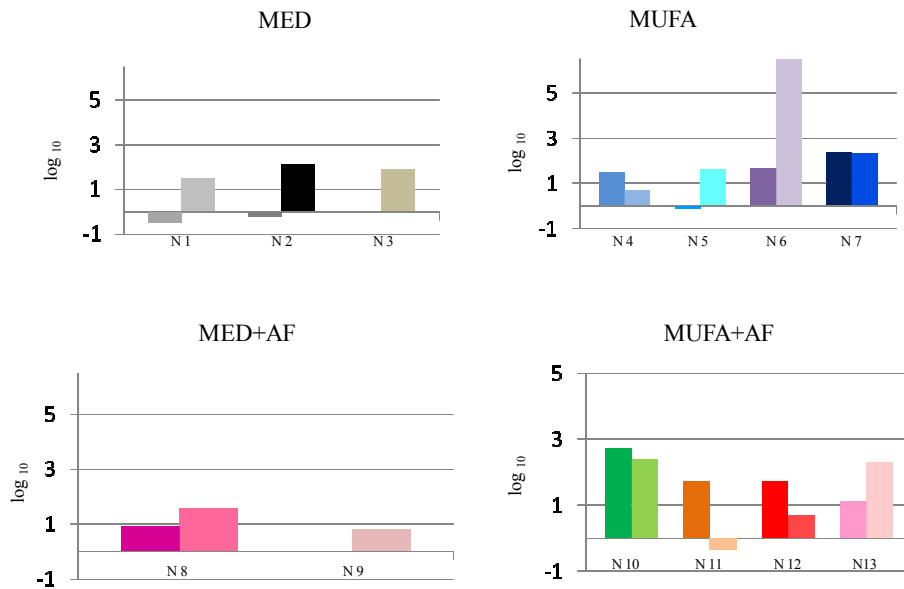
determinabile in alcuni soggetti; nei gruppi che hanno praticato attività fisica l'espressione di PGC1 α tende ad aumentare dopo pasto ricco in MUFA mentre rimane invariato dopo pasto ricco in CHO. Nei soggetti con dieta MED con e senza attività fisica si è osservato un incremento dell'espressione di COX2, dopo pasto ricco in CHO rispetto al pasto ricco in SAFA. Una maggiore variabilità dell'espressione di COX2 si osserva dopo pasto ricco in MUFA sia nel gruppo MUFA che MUFA+AF.

L'espressione di COX5 tende a ridursi dopo 6 ore dal pasto ricco in CHO in tutti i soggetti del gruppo MED sia con che senza attività fisica. Il pasto MUFA tende a ridurre l'espressione di COX 5 nel gruppo MUFA (3 soggetti su 4) mentre tende ad aumentarla nel gruppo MUFA +AF.

Nella figura 21 è mostrata l'espressione genica dopo pasto test, prima (SAFA) e dopo gli interventi (MED, MUFA, MED+AF e MUFA +AF)



COX2b



COX5

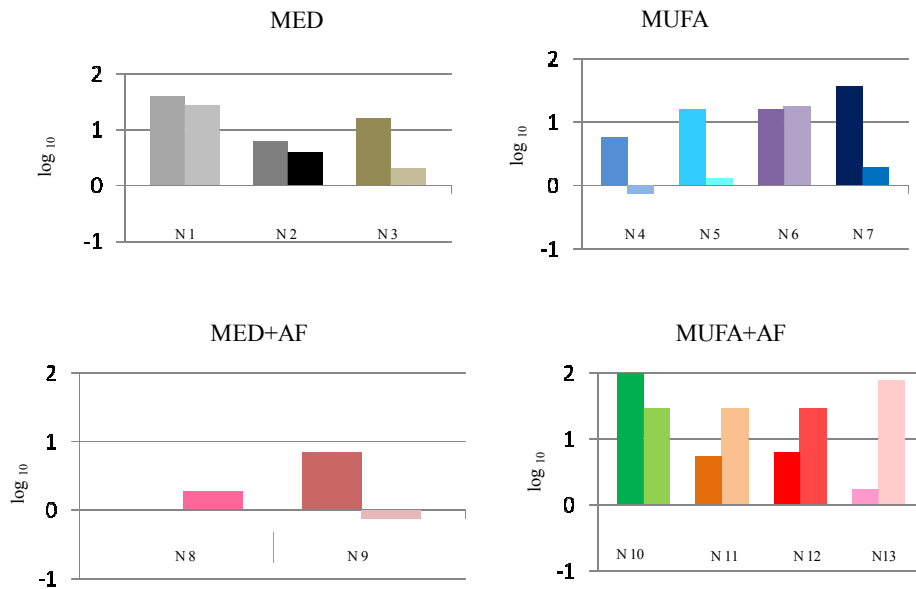


Figura 20 Profilo trascrizionale dei principali geni mitocondriali (PGC1 α , COX2b, COX5) dopo pasto test nei 4 gruppi di intervento (MED, MUFA, MED+AF, MUFA+AF)

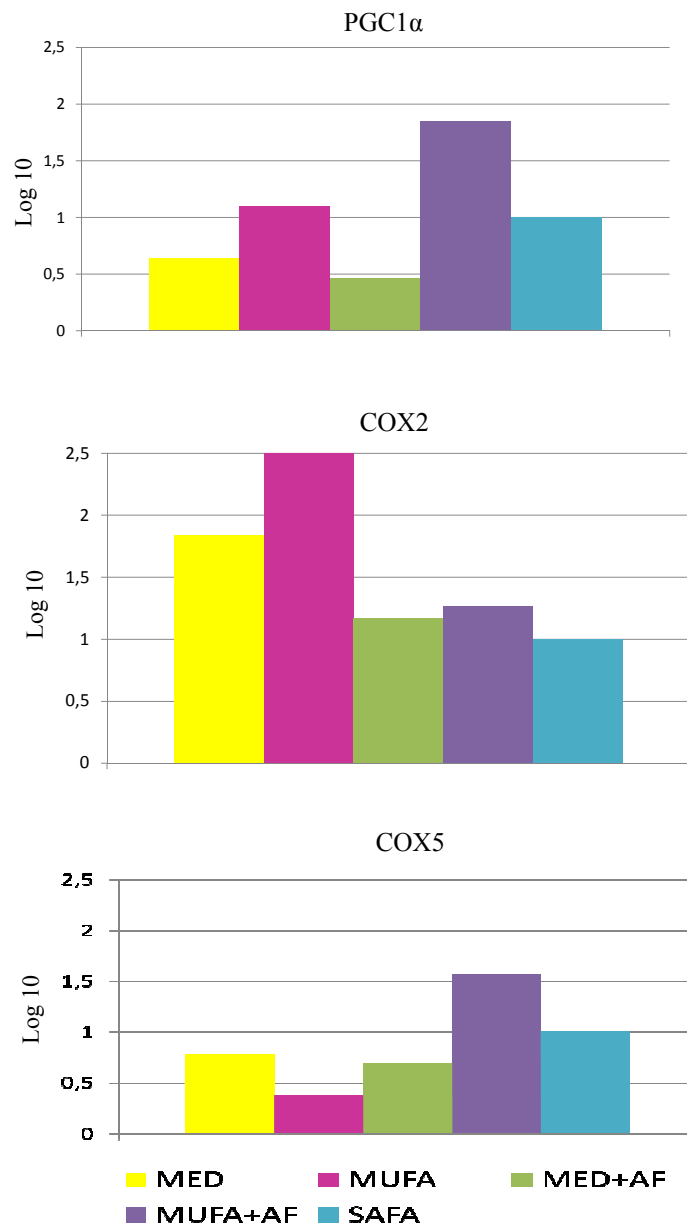


Figura 21 Espressione genica dopo pasto test, prima (SAFA) e dopo gli interventi (MED, MUFA, MED+AF e MUFA +AF)

8.2.2 Commento

Il basso numero di soggetti studiati per i diversi gruppi di intervento non consente di trarre conclusioni certe sull'impatto delle diverse diete sul profilo trascrizionale dei geni ossidativi. Pur tuttavia, dall'analisi emerge che i geni ossidativi, in particolare COX2, risentono della modulazione da parte dei nutrienti in misura maggiore rispetto ai geni della biogenesi, analogamente a quanto osservato nello studio in acuto. L'aumento della casistica consentirà di definire quale tipo di intervento nutrizionale è in grado di modulare favorevolmente l'espressione dei geni ossidativi e il contributo dell'attività fisica nel potenziare l'effetto dei nutrienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Felig P, Baxter D.J., Broadus A., Lawrence A. Frohman, *Metabolismo dei substrati energetici, Endocrinologia e Metabolismo*, Mc Graw Hill, II edizione
2. Saltier AL. Kahn CR Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*;414:799-806, 2001
3. Pessin JE, Saltiel AR Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance *J Clin Invest*; 106:165-169 (2000)
4. Petersen K.F., Shulman G.I. *Am. J. Med.*; 119: S10- S16, 2006
5. Arienti G. , *Le basi molecolari della nutrizione*, Piccin, 2003
6. Anderwald C., Bernroider E., Krssak M., Stingl H., Brehm A., BischofMG., Nowotny P., Roden M., Waldhausl W. Effects of insulin treatment in type 2 diabetic patients on intracellular lipid content in liver and skeletal muscle. *Diabetes* 51 (10): 3025-3032, 2002.
7. Barazzoni R., Bosutti A., Stebel M., Cattin M., Roder E., Visintin L., Cattin L., Biolo G., Zanetti M., Guarnieri G. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288 (1):E228-35, 2005.
8. Huang X., Eriksson K-F., Vaag A., Lehtovirta M., Hansson M., Laurila E., Kanninen T., Olesen B., Kurucz I., Koranyi L., Groop L. Insulinregulated mitochondrial gene expression is associated with glucose flux in human skeletal muscle. *Diabetes* 48 (8): 1508-14, 1999
9. Stump CS., Short KR., Bigelow ML., Schimke JM., Nair KS. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (13): 7996-8001, 2003
10. Boirie Y., Short KR., Ahlman B., Charlton M., Nair KS. Tissue-specific regulation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates by insulin. *Diabetes* 50 (12): 2652-8, 2001.

11. Kelley D.E., Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything, *J. Clin. Invest.*, 115:1699-1702, 2005
12. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA, The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus, *Lancet I*, 785, 1963
13. Brehm A, Krssac M, Schmid AI, Nowotny P, Waldhausl W, Roden M. Increased lipid availability impairs insulin stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. *Diabetes*; 55:136-140 9, 2006
14. Hegarty BD, Furler SM, Ye J, Cooney GJ, Kraegen EW, The role of intramuscular lipid in insulin resistance, *Acta Physiol Scand*, 178:373-383, 2003
15. M. Roden, TB Price, G Perseghin, KF Petersen, DL Rothman, GW Cline, GI Shulman *J Clin Invest* 97:2859,1966
16. Alan Dresner, Didier Laurent, Melissa Marcucci, Margaret E. Griffin, Sylvie Dufour, Gary W. Cline, Lori A. Slezak, Dana K. Andersen, Ripudaman S. Hundal, Douglas L. Rothman, Kitt Falk Petersen, Gerald I. Shulman Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity et al *J Clin Invest* 103:253, 1999
17. Roden M, Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanism for the development of type 2 diabetes, *Int J Obes* 29 (Suppl 2) :S111-S115, 2005
18. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P et al., PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes, *Nat Genet*, 34:267:273, 2003
19. Handschin C, Choi CS, Chin S, Kim S, Kawamori D, Kurpad AJ, Neubauer N, Hu J, Mootha VK, Kim YB, Kulkarni RN, Shulman GI, Spiegelman BM Abnormal glucose homeostasis in skeletal muscle-specific PGC-1 α knockout mice reveals skeletal muscle-pancreatic β cell crosstalk. *J Clin Invest* 117:3463–3474, 2007
20. Silverthorn DU, Johnson BR *Fisiologia un approccio integrato*, Austin USA, pp. 59-60 ,2005

21. Soboll S., Grundel S., Schwabe U., Scholtz R. *Eur J Biochem.* 141: 231-236, 1984
22. Chanséaume E, Morio B , Potential Mechanism of muscle mitochondrial dysfunction in aging and obesity and cellular consequences, *Int.J.Mol.Sci* 10:306-324,2009.
23. Nelson DL, Cox MM, *Introduzione alla Biochimica di Lehninger*, Zanichelli, 2003
24. Lowell BB, Shulman GI, Mitochondrial Dysfunction and type 2 Diabetes, *Science, Special Section*, 307: 384-387, 2005
25. Hill B.C. , The sequence of electron carriers in the reaction of cytochrome c oxidase with oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25: 115-120, 1993
26. Lin, J.; Wu, H.; Tarr, P.T.; Zhang, C.Y.; Wu, Z.; Boss, O.; Michael, L.F.; Puigserver, P.; Isotani, E.; Olson, E.N.; Lowell, B.B.; Bassel-Duby, R.; Spiegelman, B.M. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797-801, 2002
27. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, Brand MD, Cortright RN, O’Rahilly S, Montague C, Vidal-Puig AJ. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem, J* 373:155-165, 2003.
28. Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1_α muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* 282:30014–30021, 2007
29. Pagel-L Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115–124, 1999
30. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor α coactivators 1 α and 1 β (PGC-1 α and PGC-1 β) in muscle cells. *J Biol Chem* 278: 26597–26603, 2003

31. Pagel-Langenickel I, Bao J, Joseph JJ, Schwartz DR, Mantell BS, Xu X, Raghavachari N, Sack MN PGC-1 α integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle. *J Biol Chem* 283:22464–22472, 2008
32. Miura S, Kai Y, Ono M, Ezaki O Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α down-regulates GLUT4 mRNA in skeletal muscles. *J Biol Chem* 278:31385–31390, 2003
33. Choi CS, Befroy DE, Codella R, Kim S, Reznick RM, Hwang YJ, Liu ZX, Lee HY, Distefano A, Samuel VT, Zhang D, Cline GW, Handschin C, Lin J, Petersen KF, Spiegelman BM, Shulman GI Paradoxical effects of increased expression of PGC-1 α on muscle mitochondrial function and insulin-stimulated muscle glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19926–19931, 2008
34. Chabi, B.; Adhihetty, P.J.; Ljubicic, V.; Hood, D.A. How is mitochondrial biogenesis affected in mitochondrial disease? *Med. Sci. Sports Exerc.* 37, 2102-2110. 15, 2005
35. Puigserver P and Spiegelman BM, Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α : transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24: 78-90, 2003
36. Arany Z, Lebrasseur N, Morris C, et al. The transcriptional coactivator PGC-1 β drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. *Cell Metab* 5:35–46, 2007
37. Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, et al. PPAR γ coactivator 1 β /ERR ligand-1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12378–83, 2003
38. Lin J, Tarr P T, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard C B, Spiegelman BM, PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism, *J. Biol. Chem.* 33: 30843-30848, 2003
39. Evans RM, Barish GD, Wang YX PPARs and the complex journey to obesity *Nat Med*; 10:355-61, 2004

40. Puigserver P., Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM, A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839, 1998
41. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 142:4195–4202/173, 2001
42. Evans RM, Barish GD, Wang YX PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 10:355–361, 2004
43. Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, Evans RM PPAR γ regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3444–3449, 2006
44. Luquet, S.; Lopez-Soriano, J.; Holst, D.; Fredenrich, A.; Melki, J.; Rassoulzadegan, M.; Grimaldi, P.A. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J.* 17, 2299-22301.17, 2003
45. Norris AW., Chen L., Fisher SJ., Szanto I., Ristow M., Jozsi AC., Hirshman MF., Rosen ED., Goodyear LJ., Gonzalez FJ., Spiegelman BM., and Kahn CR. Muscle specific PPAR γ deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 112 (4): 608-18, 2003
46. Hevener AL., He W., Barak Y., Le J., Bandyopadhyay G., Olson P., Wilkes J., Evans RM., and Olefsky J. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat. Med.* 9 (12): 1491-7, 2003
47. Lapsys NM., Kriketos AD., Lim-Fraser M., Poynten AM., Lowy A., Furler SM., Chisholm DJ. and Cooney GJ. Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (11): 4293-7, 2000

48. Way JM., Harrington W., Brown KK., Gottschalk WK., Sundseth SS., Mansfield TA., Ramachandran RK., Willson TM. and Kliewer SA. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 142 (3): 1269-77, 2001
49. D'Aurelio M., Pallotti F., Barrientos A., Gajewski CD., Kwong JQ., Bruno C., Beal MF. and Manfredi G. In vivo Regulation of Oxidative Phosphorylation in Cells Harboring a Stop codon Mutation in Mitochondrial DNA-encoded Cytochrome c Oxidase Subunit I. *J. Biol. Chem.*, vol. 276, issue 50, 46925-46932, 2001
50. Goldberg A., Derek E., Wildman DE., Schmidt TR., Hüttemann M., Goodman M., Weiss ML. and Grossmann LI. Adaptive evolution of cytochrome c oxidase subunit VIII in anthropoid primates. *PNAS*, 100 (10) : 5873-5878, 2003.
51. Lomax MI, Hsieh CL, Darras BT, Francke U, Structure of the human cytochrome c oxidase subunit Vb gene and chromosomal mapping of the coding gene and seven pseudogenes, *Genomics*, 10: 1-9,1991
52. Hill B.C. , The sequence of electron carriers in the reaction of cytochrome c oxidase with oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25: 115-120, 1993
53. Nishiumi S, Bessyo H, Kubo M, Aoki Y, Tanaka A, Yoshida K, Ashida H Green and black the suppress hyperglycemia and insulin resistance by retaining the expression of glucose transporter 4 in muscle of high fat diet-fed C57BL/6J mice *J Agric Food Chem*, ;58(24):12916-23, 2010
54. Higashida K, Higuchi M, Terada S Dissociation between PGC1a and GLUT4 expression in skeletal muscle of rats fed a high fat diet. *J Nutr Sci Vitaminol*,; 55(6):486-91,2009
55. Bieber L.L, Carnitine. *Annual Rev. Biochem* . 57:261-283, 1998

56. Murthy M.S.R, Pande S.V., Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. Proc.Nat.Acad.Sci. 84: 378-382,1987
57. Karp G, *Biologia Cellulare e Molecolare*, Ed. Edises, 2003
58. Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* 348:425–432, 2000
59. Lynn EG, Lu Z, Minerbi D, SackMN The regulation, control, and consequences of mitochondrial oxygen utilization and disposition in the heart and skeletal muscle during hypoxia. *Antioxid Redox Signal* 9:1353–1361, 2007
60. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299:896–899, 2003
61. Weitzel JM, Iwen KA, Seitz HJ Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol* 88:121–128, 2003
62. Chansemaume, E.; Malpuech-Brugere, C.; Patrac, V.; Bielicki, G.; Rousset, P.; Couturier, K.; Salles, J.; Renou, J.P.; Boirie, Y.; Morio, B. Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats. *J. Nutr.* 136, 2194-2200, 2006
63. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyzaki Y, Kohane I, Mandarino LJ et al., Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:8466-8471, 2003
64. Puigserver P., Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alfa (PGC-1 alfa): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Rev.* 24 (1): 78-90, 2003.

65. Petersen KF., Dufour S., Befroy D., Garcia R., Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 350 (7): 664-71, 2004.
66. Kelley D.E., He J., Menshikova E.V., Ritov V.B., Dysfunction of Mitochondria in human Skeletal muscle in Type 2 Diabetes, *Diabetes*, 51:2944-2950, 2002
67. Adams 2nd JM, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 53:25–31, 2004
68. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C α and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270–1274 39, 1999
69. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G Lipid induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I β . *Diabetes* 51:2005–2011, 2002
70. Morino K, Petersen KF, Shulman GI Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55(Suppl 2):S9–S15 41, 2006
71. Petersen KF, Dufour S, Shulman GI Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *PLoS Med* 2:e233, 2005
72. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115:3587–3593, 2005

73. Ling C, Poulsen P, Carlsson E, Ridderstrale M, Almgren P, Wojtaszewski J, Beck-Nielsen H, Groop L, Vaag A. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1 α and PGC-1 β gene expression in twins. *J. Clin. Invest.*, 114: 1518-1526, 2004
74. Hughes VA, Fiatarone MA, Fielding RA, Kahn BB, Ferrara CM, Shepherd P, Fisher EC, Wolfe RR, Elahi D, Evans WJ. Exercise increases muscle GLUT-4 levels and insulin action in subjects with impaired glucose tolerance. *Am J Physiol.* 264:E855–E862, 1993
75. Henriksen EJ. Invited review: effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol.* 93:788 –796, 2002
76. Toledo FG, Menshikova EV, Ritov VB, Azuma K, Radikova Z, DeLany J, Kelley DE. Effects of physical activity and weight loss on skeletal muscle mitochondria and relationship with glucose control in type 2 diabetes. *Diabetes* 56:2142–2147, 2007
77. Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Rizza RA, Coenen- Schimke JM, Nair KS. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes* 52:1888 –1896, 2003
78. Constable SH, Favier RJ, McLane JA, Fell RD, Chen M, Holloszy JO. Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training. *Am J Physiol.* 253:C316–C322, 1987
79. Suvorava T, Lauer N, Kojda G. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. *J Am Coll Cardiol.*44: 1320–1327, 2004
80. Le Gouill E, Jimenez M, Binnert C, Pierre-Yves J, Thalmann S, Nicod P, Scherrer U, Vollenweider P. eNOS knock-out mice have defective mitochondrial beta-oxidation *Diabetes.*;56:2690 –2696, 2007
81. Menshikova EV, Ritov VB, Toledo FGS, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE, Effects of weight loss and physical activity on skeletal muscle mitochondrial function in obesity, *Am J Endocrinol Metab*, 288: E818-E825, 2005

82. Mustelin L, Pietilainen KH, Rissanen A, Sovijarvi AR, Piirila P, Naukkarinen J, Peltonen L, Kaprio J, Yki-Jarvinen H Acquired obesity and poor physical fitness impair expression of genes of mitochondrial oxidative phosphorylation in monozygotic twins discordant Am J Physiol Endocrinol Metab 295:E148-154, 2008
83. Rimbart V, Boirie Y, Bedu M, Hocquette JF, Ritz P, Morio B, Muscle fat oxidative capacity is not impaired by age but by physical inactivity: association with insulin sensitivity, FASEB J, 18: 737-739, 2004
84. Fatone C, Guescini M, Balducci S, Battistoni S, Settequattrini A, Pippi R, Stocchi L, Mantuano M, Stocchi V, De Feo P Two weekly sessions of combined aerobic and resistance exercise are sufficient to provide beneficial effects in subjects with Type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome J Endocrinol Invest; 33 (7):489-95, 2010
85. Hossain P, Kavar B, El Nahas M Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. N Engl J Med 356:213–215, 2007
86. Krebs M, Roden M Nutrient-induced insulin resistance in human skeletal muscle. Curr Med Chem 11:901– 908, 2004
87. Brownlee M The pathobiology of diabetic complications:a unifying mechanism. Diabetes 54:1615–1625, 2005
88. Brownlee M Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414:813–820, 2001
89. Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Hesselink MK, Moonen-Kornips E, Schaart G, Mustard KJ, Hardie DG, Saris WH, Nicolay K, Schrauwen P Intramyocellular lipid content and molecular adaptations in response to a 1-week high-fat diet. Obes Res 13:2088–2094, 2005
90. Ghosh S, Kewalramani G, Yuen G, Pulinilkunnil T, An D, Innis SM, Allard MF, Wambolt RB, Qi D, Abrahani A, Rodrigues B Induction of mitochondrial oxidative damage and cardiac

- dysfunction by chronic provision of dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med* 41:1413–1424, 2006
91. Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome oxidase and cardiolipin alterations. *FEBS Lett* 424: 155–158, 1998
 92. Befroy DE, Petersen KF, Dufour S, Mason GF, Rothman DL, Shulman GI Increased substrate oxidation and mitochondrial uncoupling in skeletal muscle of endurance-trained individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16701– 16706, 2008
 93. Wibom R, Hultman E, Johansson M, Matherei K, Constantin-Teodosiu D, Schantz PG Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. *J Appl Physiol* 73:2004– 2010, 1992
 94. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5755–5761 2001
 95. Schrauwen P High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc* 66:33–41(100), 2007
 96. Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MK, Moonen- Kornips E, Schaart G, Kooi ME, Saris WH, Schrauwen P Short-term training is accompanied by a down regulation of ACC2 mRNA in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 27:786–791, 2006
 97. Lu Z, Sack MN ATF-1 is a hypoxia-responsive transcriptional activator of skeletal muscle mitochondrial-uncoupling protein 3. *J Biol Chem* 283:23410–23418, 2008
 98. Meyerspeer M, Nowotny P, Roth E, Waldhausl W, Roden M Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes* 51:599–605, 2002
 99. Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, Wang Y, Raederstorff D, Morrow JD, Leeuwenburgh C, Allison DB, Saupe KW, Cartee GD, Weindruch R, Prolla TA A

- low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS ONE* 3:e2264, 2008
100. Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med* 4:e76, 2007
101. Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO Longterm calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6659–6663, 2004
102. Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G, Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats, *Br. J. Nutr.*, 90:953-960, 2003
103. Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR, A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle, *Diabetes* 54:1926-1933, 2005
104. Laurent D, Didier L, Yerby B, Deacon R, Gao J Diet-induced modulation of mitochondrial activity in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1169– E1177, 2007
105. Toledo FG, Menshikova EV, Azuma K, Radikova Z, Kelley CA, Ritov VB, Kelley DE Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content. *Diabetes* 57:987–994, 2008
106. Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J, De Fronzo RA, Jenkinson CP, Mandarino LJ, Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle, *J Biol Chem*, 280: 10290-10297, 2005

107. Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, et al., Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study, *Diabetologia*, 44: 312-319, 2001
108. Staiger, H.; Staiger, K.; Haas, C.; Weisser, M.; Machicao, F.; Haring, H.U. Fatty acid-induced differential regulation of the genes encoding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha and -1beta in human skeletal muscle cells that have been differentiated in vitro. *Diabetologia* 48: 2115-2118, 2005
109. Coll, T.; Jove, M.; Rodriguez-Calvo, R.; Eyre, E.; Palomer, X.; Sanchez, R.M.; Merlos, M.; Laguna, J.C. Vazquez-Carrera, M. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* 55: 2779-2787, 2006
110. Crunkhorn, S.; Dearie, F.; Mantzoros, C.; Gami, H.; da Silva, W.S.; Espinoza, D.; Faucette, R.; Barry, K.; Bianco, A.C.; Patti, M.E. Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: Potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 282:15439-15450, 2007
111. Fine needle aspiration coupled with real-time PCR: a painless methodology to study adaptive functional changes in skeletal muscle. Guescini M, Fatone C, Stocchi L, Guidi C, Potenza L, Ditroilo M, Ranchelli A, Di Loreto C, Sisti D, De Feo P, Stocchi V. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* Jun;17(5):383-93. Epub 2007 May 7, 2007
112. Charlotte Bonnard, Annie Durand, Simone Peyrol, Emilie Chanseume, Marie-Agnes Chauvin, Béatrice Morio, Hubert Vidal, and Jennifer Rieusset Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice *J. Clin. Invest.* 118:789–800, 2008

113. Hoeks J, Hesselink MK, Russell AP, Mensink M, Saris WH, Mensink RP, Schrauwen P
Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 and insulin resistance: acute
effect of fatty acids *Diabetologia* 49:2419-2426, 2006
114. Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A,
Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzi L: Intramyocellular triglyceride content is a
determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ^1H - ^{13}C nuclear magnetic resonance
spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48:1600-1606, 1999
115. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M,
Shulman GI: Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in
humans: a ^1H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42:113-116, 1999
116. Chavez JA, Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and
ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem
Biophys*, 419:101-109, 2003.
117. Chavez JA, Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and
ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem
Biophys*, 419:101-109, 2003.
118. Sabin MA, Stewart CE, Crowne EC, Turner SJ, Hunt LP, Welsh GI, Grohmann MJ, Holly JM,
Shield JP. Fatty acid-induced defects in insulin signalling, in myotubes derived from children, are related
to ceramide production from palmitate rather than the accumulation of intramyocellular lipid. *J Cell
Physiol*, 211: 244-252, 2007
119. Gao D, Griffiths HR, Bailey CJ. Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6
myotubes. *Br J Nutr*, 102: 1557-1563, 2009
120. Ryan M, McInerney D, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Diabetes and the
Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport
and endothelium-dependent vasoreactivity. *QJM*, 93:85-91, 2000.
121. Schrauwen P, Hesselink MK. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2

diabetes. *Diabetes*, 53:1412-1417, 2004.

122. Powell DJ, Turban S, Gray A, Hajduch E, Hundal HS. Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C ζ activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J*, 382:619-629, 2004
123. Rachek LI, Musiyenko SI, LeDoux SP, Wilson GL. Palmitate induced mitochondrial deoxyribonucleic acid damage and apoptosis in L6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 148: 293-299, 2007.
124. Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299(6):E1096-105, 2010.
125. Rodriguez AM, Sanchez J, Tobaruela A, Priego T, Picp C, Palou A Time course effects of increased fatty acid supply on the expression of genes involved in lipid/glucose metabolism in muscle cells *Cell Physiol Biochem*; 25:337-346, 2010