

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE MORFOLOGICHE, FISIOLOGICHE E DELLO SPORT
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE PER LA SALUTE
DOTTORATO IN SCIENZE DELLO SPORT XXVII° CICLO



***STUDIO DELL'EFFETTO PREVENTIVO DELLA METFORMINA
SUI DANNI ASSOCIATI ALLA SEDENTARIETA'
IN MODELLI MURINI***

Dottoressa PAMELA SENESI

MATRICOLA R09753

TUTOR: PROF. LIVIO LUZI

COORDINATORE DEL DOTTORATO: PROF. LIVIO LUZI

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

INDICE

ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Inattività fisica e patologie associate	8
1.2 Metformina	12
1.2.1 Metformina: azione ipoglicemizzante	13
1.2.2 Metformina e AMPK	15
1.2.3 Altri mediatori molecolari dell'azione della Metformina	18
1.2.4 Ruolo della Metformina nel metabolismo lipidico	19
1.2.5 Metformina: nuovi impieghi farmacologici	20
1.2.6 Metformina e sindrome dell'ovaio policistico	20
1.2.7 Metformina e cancro	21
1.2.8 Metformina come farmaco anti-aging	22
1.3 Il muscolo scheletrico	23
1.3.1 La fibra muscolare	23
1.3.2 La miogenesi	26
1.3.3 I fattori di regolazione miogenici	27
1.3.4 Modificazioni della massa muscolare: Atrofia/Ipertrofia	29
1.3.5 Degradazione e sintesi proteica	29
1.3.6 Le cellule satelliti	32
1.3.7 Fattori di crescita coinvolti nella regolazione della massa muscolare	34

2. SCOPO DEL LAVORO	37
3. MATERIALI E METODI	39
3.1 Materiali	40
3.2 Modello Animale	41
3.2.1 Trattamento con METF in vivo	41
3.2.2 Valutazione della performance fisica	42
3.2.3 Prelievo dei tessuti	44
3.3 Modello cellulare	45
3.3.1 Condizioni di coltura C2C12	45
3.3.2 Induzione del processo di differenziamento C2C12	46
3.3.3 Trattamento con METF in vitro	47
3.3.4 Test di crescita e vitalità cellulare	48
3.3.5 Preparazione dei lisati cellulari da tessuti e da colture cellulari	49
3.3.6 Quantificazione della concentrazione proteica	49
3.3.7 Western blot: Preparazione dei campioni e corsa elettroforetica	50
3.3.8 Western blot: Immunoblotting	51
3.3.9 Immunofluorescenza su sezioni di tessuto e su colture cellulari	52
3.4 Analisi statistica	53
4. RISULTATI	54
4.1 Metformina e Sedentarietà: Studio in Vivo	55
4.1.1 Analisi delle variazioni di peso e glicemia	55
4.1.2 Valutazione della performance fisica	56
4.1.3 Analisi dell'azione di METF a livello muscolare	57
4.1.4 Analisi dell'azione di METF a livello epatico	58
4.2 Metformina e sedentarietà: studio in vitro	60
4.2.1 Studio degli effetti della METF sulla crescita delle cellule	60

4.2.2 Studio dell'azione della METF su MyoD durante la fase proliferativa.	61
4.2.3 Studio degli effetti della METF sulla morfologia dei mioblasti	62
4.2.4 Studio dell'azione di METF nella formazione di neo miotubi	65
4.2.5 Studio dell'azione di METF sui pathway cellulari coinvolti nel differenziamento	68
4.2.6 Studio dell'azione di METF sui miotubi neoformati	69
5. DISCUSSIONE	74
6. BIBLIOGRAFIA	80
Ringraziamenti	102

ABSTRACT

METFORMIN TREATMENT PREVENTS SEDENTARINESS INDUCED DAMAGES IN MICE

Metformin (METF), historical antihyperglycemic drug, is a likely candidate for lifespan extension, treatment and prevention of sedentariness damages, insulin resistance and obesity. Skeletal muscle is a highly adaptable tissue, capable to increase its mass in response to exercise and to regenerate new fibrils after damage. Aims of this work were to investigate METF ability to prevent sedentariness injury and enhance skeletal muscle function.

Sedentary 12-weeks old C57BL/6 mice were treated with METF (250 mg/kg per day, in drinking water) for 60 days. METF role on skeletal muscle differentiation was studied *in vitro* using murine C2C12 myoblasts.

Muscular performance evaluation revealed that METF enhanced mice physical performance. Tissues analysis indicated that in liver METF increased AMPK and CAMKII signaling, while inactivated ERKs, principal kinases involved in hepatic stress conditions. In skeletal muscle, METF activated AKT, key kinase in skeletal muscle maintenance.

In *in vitro* studies, Immunofluorescence and Western blot analysis showed that METF did not modify the C2C12 proliferation capacity, while positively influenced the differentiation process and myotube maturation.

Together, our novel results suggest that METF may have a positive action not only on the promotion of healthy aging but also on the prevention of sedentariness damages.

1. INTRODUZIONE

1.1 INATTIVITÀ FISICA E PATOLOGIE ASSOCIATE

L'epidemia di obesità e diabete di tipo 2 (T2DM) ha determinato una crisi globale per la salute pubblica che minaccia le economie di tutte le nazioni, in particolare quelle in via di sviluppo [1]. Alimentate dalla rapida urbanizzazione e da stili di vita errati, le caratteristiche peculiari di queste due patologie hanno subito dei significativi cambiamenti: da malattie dell'Occidente a malattie diffuse a livello globale; da "malattie del benessere" a malattie che colpiscono anche i paesi più poveri, ma soprattutto da malattie dell'adulto-anziano a malattie che colpiscono sempre più soggetti giovani. Infatti negli ultimi anni si è osservato un incremento esponenziale del numero di giovani che, divenendo obesi, mostrano una sintomatologia analoga a quella del diabete mellito di tipo 2 [2].

L'inattività fisica è un fattore chiave nello sviluppo dell'obesità e del diabete [3-7]. Essa non solo rappresenta una delle principali concause dell'eziopatogenesi dell'obesità e del diabete, bensì costituisce la quarta causa di morte nel mondo: l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha calcolato che circa 3,2 milioni di decessi ogni anno sono attribuibili ad uno stile di vita sedentario [8-11]. Come si osserva in Fig. 1, la mancanza di esercizio fisico è associato all'insorgenza di numerose e gravi patologie.

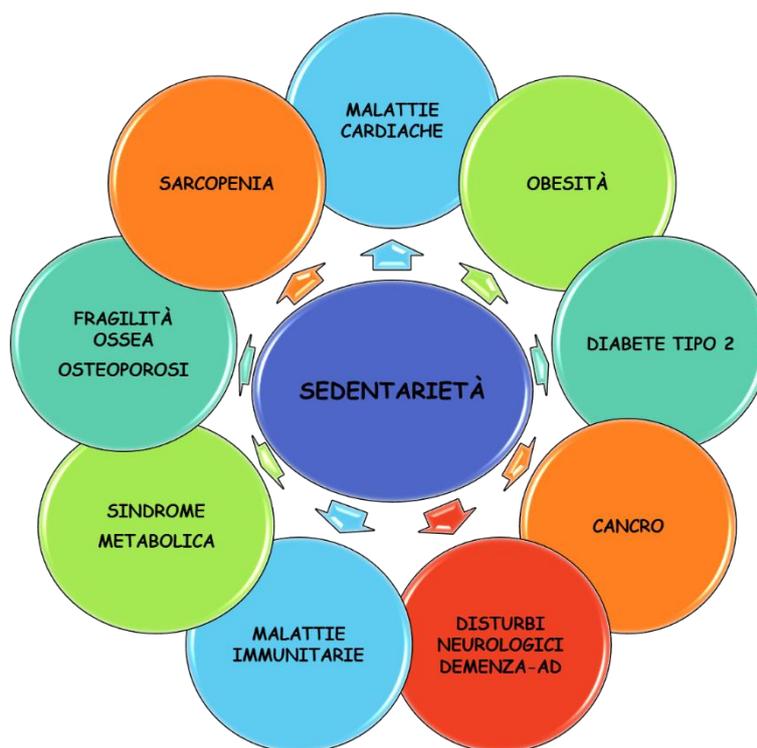


Figura 1 Principali patologie associate all'inattività fisica

In particolare, la sedentarietà aumenta il rischio di sviluppare malattie coronariche [12, 13]. Già agli inizi degli anni 50, Morris et al. avevano osservato come gli autisti degli autobus londinesi che praticavano sport mostravano un ridotto rischio coronarico rispetto ai colleghi sedentari [14]. Negli ultimi decenni, numerosi studi hanno dimostrato come l'attività fisica non solo previene l'insorgenza delle patologie cardiache, ma costituisce anche un elemento fondamentale dei protocolli terapeutici [15-18].

Il decremento della attività fisica è stato associato, inoltre, ad un maggiore incidenza di cancro [19,20]. Gli adulti che incrementano l'attività fisica in intensità, in durata e in frequenza, possono ridurre il rischio di sviluppare tumore al colon del 30-40

per cento rispetto alle persone sedentarie. Inoltre gli effetti protettivi sono maggiori nelle persone che svolgono attività fisica intensa [21-22]. Allo stesso modo, il rischio di sviluppare un tumore al seno si riduce se si svolge regolarmente attività fisica: le donne fisicamente attive hanno un rischio di sviluppo del cancro al seno ridotto rispetto a quelle inattive [23,24]. Anche se gli effetti dell'esercizio fisico non sono sufficienti a riparare i danni del fumo, il movimento regolare è in grado di ridurre di circa il 20 per cento anche il rischio di cancro al polmone [25].

Uno stile di vita sedentario è stato associato anche ad un maggior rischio di sviluppare patologie neurologiche, mentre l'esercizio fisico è correlato alla prevenzione delle demenze e, in particolare, della malattia di Alzheimer (AD) [26-28]. Recentemente, Lazarov et al. [29] hanno dimostrato come un semplice aumento di attività fisica sia in grado di ridurre i depositi cerebrali della proteina amiloide: dopo cinque mesi topi AD mantenuti in gabbie "arricchite" con attrezzi ginnici mostravano una riduzione dei livelli di proteina amiloide.

Ma l'attività fisica svolge un ruolo fondamentale anche nelle patologie a carico dell'apparato locomotore: varie ricerche hanno evidenziato un significativo aumento del rischio di osteoporosi e fratture nei soggetti sedentari [30, 31].

L'esercizio è in grado di rallentare la perdita significativa di funzione e/o massa muscolare [32]. La sarcopenia è definibile come una sindrome caratterizzata da una progressiva e non specifica perdita e/o riduzione di massa muscolare e di forza di

contrazione con un conseguente aumento del rischio di eventi avversi come disabilità fisica e peggioramento della qualità di vita [33-35].

I principali meccanismi imputabili all'insorgenza e progressione del fenomeno sarcopenico sono di natura endocrina, neuro-degenerativa, nutrizionale, età-correlati e conseguenti al disuso muscolare. Questi meccanismi coinvolgono, fra tutti, la sintesi proteica, la proteolisi, l'integrità neuro-muscolare, la deplezione del pool delle cellule staminali muscolari. Come risultato, la forza muscolare diminuisce di circa il 50 per cento da 30 a 80 anni [36]. Un recente lavoro condotto su modelli murini ha dimostrato gli effetti protettivi di un moderato programma di esercizio sui processi di invecchiamento a carico delle cellule muscolari cardiache, scheletriche ed intestinali [37].

Questa breve overview permette di comprendere come sia assolutamente necessario contrastare stili di vita sedentari e individuare molecole capaci di mimare e/o amplificare i benefici dell'esercizio.

1.2 METFORMINA

La Metformina (METF) rappresenta il farmaco di elezione nel trattamento del T2DM [38-40].

La METF è stata descritta per la prima volta nella letteratura scientifica nel 1922 da Emil Werner e James Bell, i quali la presentarono come un prodotto derivante dalla N-N'-dimetilguanidina (Fig. 2). Soltanto nel 1929, tuttavia, fu reso noto il suo effetto antiperglicemizzante, grazie agli studi di Slotta e Tschesche sui conigli. In quegli anni, tuttavia, la ricerca riguardante la cura del diabete e dei suoi sintomi si era focalizzata principalmente sulla diretta somministrazione di insulina, pertanto gli studi di ricerca riguardanti la METF furono accantonati per oltre un decennio.

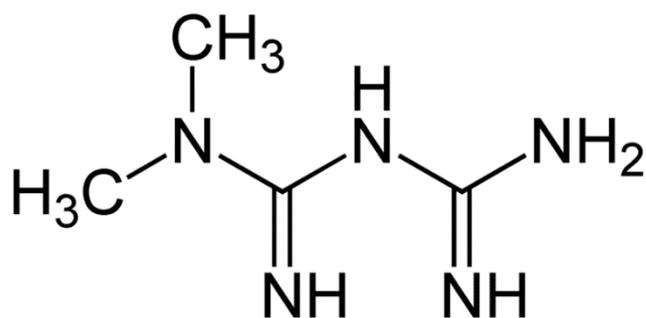


Figura 2 Formula chimica della Metformina

Nel 1950, un medico filippino, Eusebio Y. Garcia, utilizzò la METF, da egli chiamata "Fluamina", come farmaco antinfluenzale, ma evidenziò un'attività diversa da quella auspicata, ovvero rilevò come nei pazienti trattati vi fosse una spiccata riduzione dei valori glicemici senza alcuna tossicità.

Nel contempo, in Francia, nell'ospedale De La Pitié, il dietologo francese Jean Sterne studiava le proprietà antiperglicemiche della Galegina, un alcaloide isolato dalla pianta *Galega Officinalis* con struttura chimica simile a quella della METF. Solo qualche anno dopo, lavorando nel laboratorio Aron di Parigi, egli venne a conoscenza degli effetti ipoglicemizzanti riportati dagli studi di Garcia e decise di concentrare tutta la sua ricerca al fine di comprendere tutti i possibili effetti primari della METF.

Sterne pubblicò i risultati del suo studio nel 1957, descrivendo gli effetti farmacologici e i possibili meccanismi di azione del farmaco. Egli, inoltre, coniò il termine "Glucophage", che assume il significato letterale di "inglobatore di glucosio". Dopo quasi 60 anni da quella pubblicazione, la METF è commercializzata in 90 paesi, ma non sono stati ancora chiariti completamente i suoi meccanismi d'azione e, soprattutto, tutti i target del farmaco.

1.2.1 Metformina: azione ipoglicemizzante

Sebbene il meccanismo d'azione non sia ancora del tutto elucidato, la METF svolge la sua azione ipoglicemizzante soprattutto negli stati di insulino-resistenza (Fig. 3), ripristinando la sensibilità dei tessuti all'azione dell'insulina senza influenzarne direttamente la secrezione. A livello del muscolo scheletrico promuove l'uptake di glucosio mentre sopprime la produzione endogena di glucosio da parte del fegato, regolando negativamente il processo di gluconeogenesi [39-42].

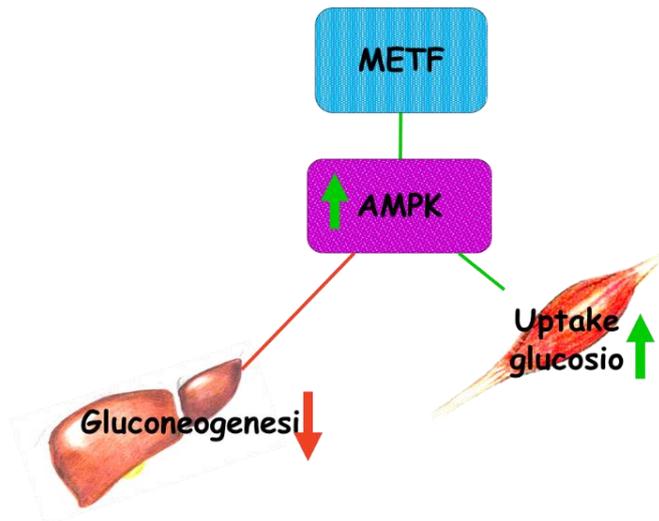


Figura 3 Meccanismo d'azione ipoglicemizzante della Metformina

L'azione della METF è stata attribuita, da ormai 15 anni, alla sua capacità di inibire la funzionalità mitocondriale. Diversi lavori [43, 44] hanno provato come la METF sia in grado di inibire il complesso I della catena respiratoria mitocondriale e, conseguentemente, la gluconeogenesi aumentando il rapporto AMP/ATP. Durante lo scorso decennio, questa azione inibente della METF è stata confermata da vari lavori condotti su linee murine ed umane di epatociti [45, 46].

Inoltre, l'azione della METF sul complesso I della catena respiratoria è stata osservata anche nelle cellule muscolari, endoteliali, nelle β -cellule ed in altri numerosi tipi cellulari [47-49].

L'aumento del rapporto AMP/ATP attiva l'enzima AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) [50].

1.2.2 Metformina e AMPK

AMPK è una proteina della famiglia delle serina-treonina chinasi, considerata il principale sensore energetico cellulare. La sua attivazione è favorita da condizioni che comportano deplezione energetica [50-53].

AMPK è un complesso trimetrico composto da una porzione catalitica, la subunità α ed una parte regolatoria, formata da due subunità, β e λ . Questa proteina è altamente conservata in tutti gli organismi: dal più semplice come il lievito al più complesso come l'uomo, suggerendo il suo fondamentale ruolo nella regolazione energetica cellulare e, soprattutto, come la formazione del complesso di tre subunità distinte sia un requisito essenziale per il funzionamento della chinasi stessa. Nell'uomo, le subunità che costituiscono AMPK sono codificate da sette geni ($\alpha 1$, $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$; $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$) in grado di formare almeno 12 $\alpha \beta \lambda$ eterotrimeri, giustificando così la molteplicità dei ruoli funzionali di questa proteina [54].

AMPK è attivata allostericamente da 5'-AMP. Tuttavia, il complesso resta inattivo a meno che non venga fosforilato su un residuo di treonina, in posizione 172 (Thr-172), nel segmento di attivazione della subunità catalitica. Poiché l'attivazione di AMPK è inibita da alte concentrazioni di ATP, il sistema risponde non semplicemente ad un aumento dell'AMP ma anche all'aumento del rapporto AMP/ATP all'interno della cellula.

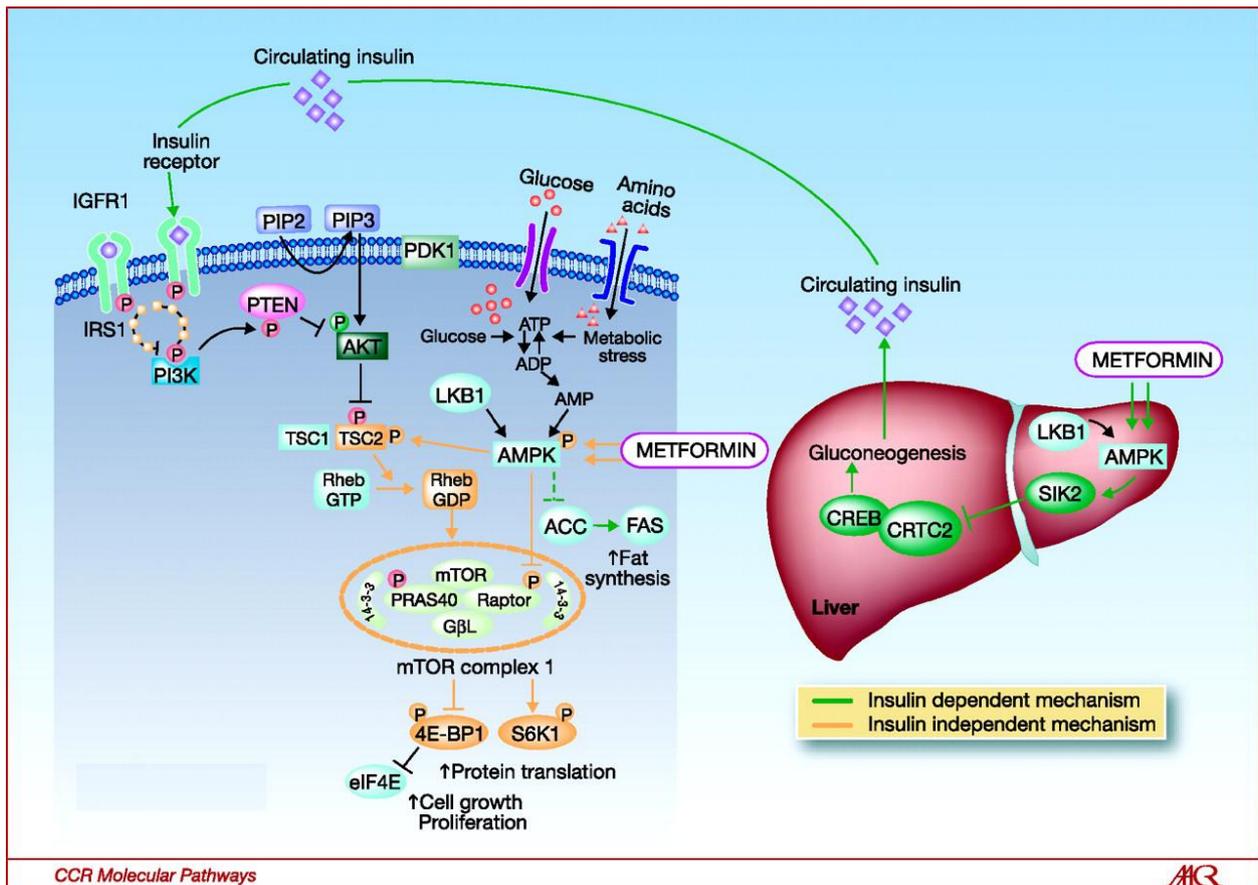


Figura 4 Ruolo dell'AMPK nel mediare l'azione di METF

Il ruolo dell'AMPK nel mediare l'azione della METF (Fig. 4) è stato inizialmente supportato dall'osservazione che in epatociti primari, preventivamente trattati con un inibitore della chinasi, la risposta alla METF è notevolmente diminuita [50].

Successivamente, si è visto che l'ablazione della chinasi a monte di AMPK, LKB1, annulla gli effetti ipoglicemizzanti della METF in un modello di topi obesi [55]; contemporaneamente è stato dimostrato come la via del segnale LKB1/AMPK controlla la fosforilazione del fattore trascrizionale TORC2, regolatore chiave dell'espressione dei geni coinvolti nei processi di gluconeogenesi. L'azione della METF su AMPK

promuove, inoltre, il reclutamento di altri fattori di trascrizione legati alla gluconeogenesi, tra cui i fattori di trascrizione CREB e SIRT1 [56, 57].

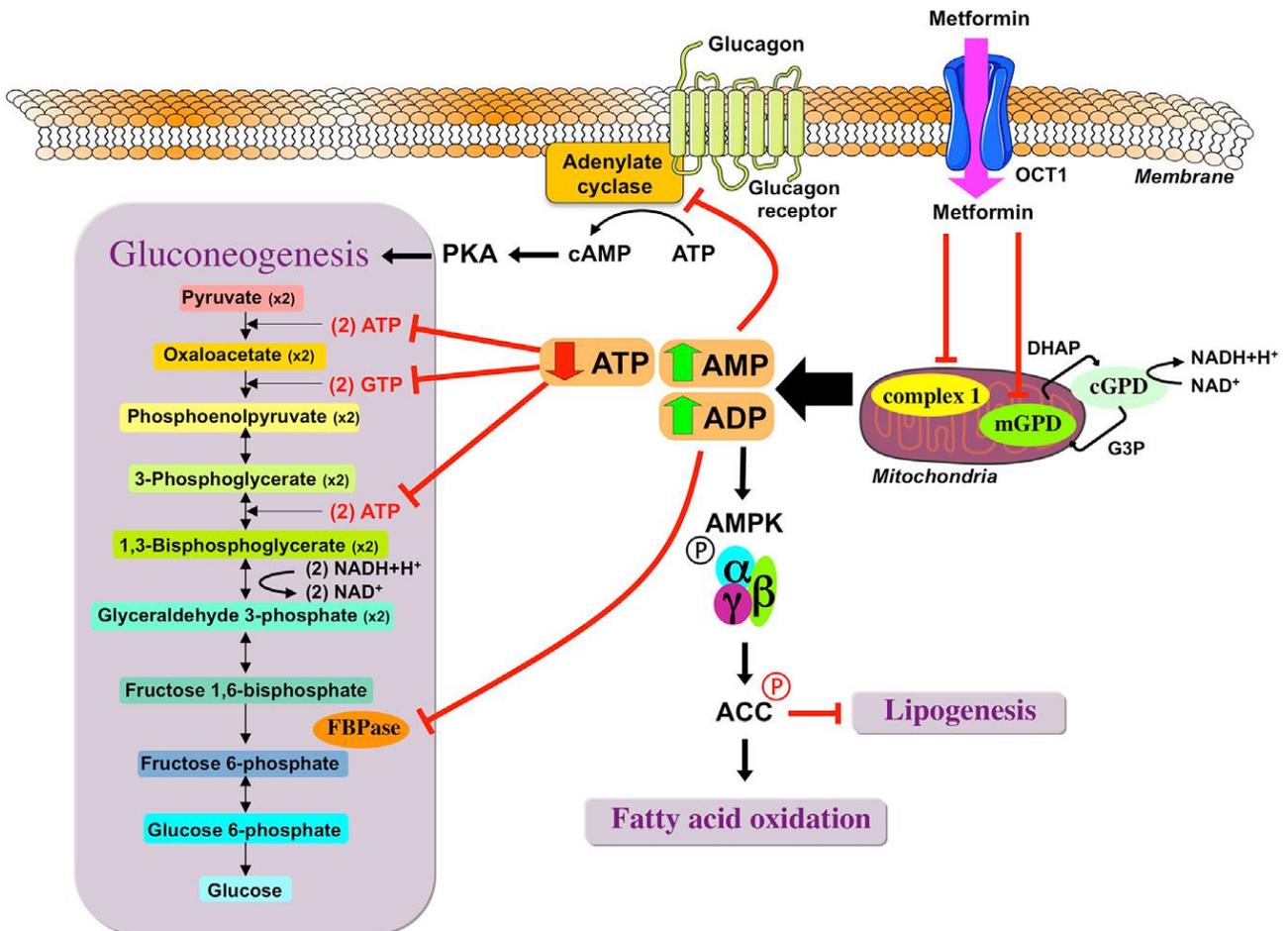


Figura 5 Meccanismi molecolari regolati da METF e coinvolti nell'inibizione della gluconeogenesi epatica. Tratto da Cell Metabolism Review

1.2.3 Altri mediatori molecolari dell'azione della Metformina

Negli ultimi anni, nuovi studi hanno suggerito ulteriori target molecolari, mediatori dell'azione della METF. Infatti, un recente lavoro condotto in topi doppi KO per le subunità catalitiche AMPK α 1/2 e per la chinasi LKB1 ha dimostrato come queste due proteine non siano necessarie alla METF per inibire la produzione epatica di glucosio [58], indicando che la sola variazione del rapporto AMP/ATP possa mediare gli effetti della METF sulla gluconeogenesi, senza attivazione dell'AMPK [59].

Infatti, l'AMP risulta essere un potente inibitore della fruttosio-1,6-bisfosfatasi e, di conseguenza, l'aumento della sua concentrazione contribuisce all'arresto della gluconeogenesi.

Inoltre, AMP inibisce l'adenilato ciclasi riducendo così la formazione di AMP ciclico (cAMP) in risposta al glucagone [60].

Infine, proprio nell'ultimo anno, è stato proposto che la riduzione della gluconeogenesi epatica da parte di METF potrebbe derivare da una inibizione diretta della glicerofosfato deidrogenasi mitocondriale (mGPD), individuando un altro putativo bersaglio mitocondriale del farmaco [61].

1.2.4 Ruolo della Metformina nel metabolismo lipidico

La METF non solo riduce la produzione di glucosio ma promuove il metabolismo lipidico. Molteplici evidenze dimostrano che la METF riduce i danni associati alla steatosi epatica, migliorando il metabolismo lipidico [62, 63].

AMPK stimola l'uptake degli acidi grassi, inibisce la sintesi degli stessi e del colesterolo mediante fosforilazione diretta degli enzimi acetyl-CoA carbossilasi, coenzima A riduttasi e lipasi ormono-sensibile (Fig. 5). In aggiunta a ciò, AMPK reprime l'espressione e l'attività di fattori di trascrizione come SREBP1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c). Da ultimo, l'attivazione di AMPK riduce la concentrazione di malonyl-CoA nel citoplasma e facilita l'accumulo e l'ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri [51-53].

1.2.5 Metformina: nuovi impieghi farmacologici

Negli ultimi anni, parallelamente agli studi che hanno in parte chiarito i meccanismi ipoglicemizzanti della METF, sono emerse sempre maggiori evidenze che indicano come questo farmaco possa essere utilizzato non solo nella terapia antidiabetica ma anche nella cura di numerose altre patologie [41, 42].

1.2.6 Metformina e sindrome dell'ovaio policistico

La sindrome dell'ovaio policistico (Polycystic Ovarian Syndrome-PCOS) è uno dei disturbi endocrinologici più comuni nelle donne in età fertile, con una prevalenza stimata tra il 4 ed il 12 per cento e rappresenta la causa più frequente di infertilità legata ad anovularietà cronica [64]. La PCOS è frequentemente associata ad una condizione di insulino resistenza e, dal 1994, la METF è stata proposta per il trattamento di questa patologia dimostrandosi un farmaco efficace nella cura dell'infertilità causata dalla PCOS [65].

1.2.7 Metformina e cancro

AMPK è in grado di regolare il ciclo cellulare: usando fibroblasti embrionali coltivati in assenza di glucosio si è osservato come AMPK sia in grado di arrestare le cellule in fase G1/S, fosforilando p53 [66]. Inoltre, AMPK sembra essere coinvolta nella down-regolazione della Ciclina D1 [67].

Parallelamente, AMPK influenza le proteine correlate al segnale di mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), molecola chiave nella sintesi proteica e nella

crescita cellulare. Il segnale di mTOR risulta alterato in numerosi tumori. AMPK fosforila TSC2, attivandolo, ed assieme alla proteina TSC1 agisce inibendo il complesso di mTORC1 [68]. In cellule tumorali, AMPK fosforila direttamente anche Raptor, un'altra proteina associata a mTORC1, comportando una down-regolazione di mTOR e una riduzione della fase S del ciclo cellulare[69]. In generale, AMPK agisce inibendo l'attività di mTOR, comportando una riduzione della sintesi proteica e della proliferazione cellulare.

Sulla base delle queste specifiche peculiarità di AMPK, si è studiato il possibile uso della METF nella terapia anti tumorale [41, 70]. La METF risulta inibire la crescita, in vitro, di numerose cellule tumorali attraverso l'attivazione diretta di AMPK [67, 71].

Dati epidemiologici ottenuti analizzando i pazienti affetti da T2DM hanno evidenziato che soggetti trattati con METF hanno un'incidenza minore di sviluppare cancro rispetto ai pazienti trattati con altri farmaci ipoglicemizzanti. Le osservazioni raccolte da numerose meta-analisi hanno confermato che la METF riduce l'incidenza di cancro di circa il 30-50 per cento [72, 73].

1.2.8 Metformina come farmaco anti-aging

Negli ultimi anni, sempre maggiori dati sperimentali indicano come la METF possa svolgere un ruolo fondamentale nel contrastare l'insorgenza di patologie legate all'età, favorendo l'aspettativa di vita (lifespan) [41, 73].

Inizialmente si è pensato alla METF come farmaco anti-aging vista la sua capacità di attivare AMPK e quindi di mimare uno stato di restrizione calorica (CR) [74, 75]. Studi in numerose specie (lieviti, elminti, mammiferi) hanno mostrato come la restrizione calorica (CR) sia in grado di ridurre l'incidenza e rallentare l'insorgenza di patologie legate all'età (malattie cardiovascolari e neurodegenerative), migliorare la resistenza allo stress e decelerare il declino funzionale [76].

Con un recente lavoro, Martin-Montalvo et al. hanno corroborato questa ipotesi: in topi anziani C57/BL6 la somministrazione di METF non solo incrementa l'aspettativa di vita ma migliora anche la performance fisica [77]. Gli autori hanno sottolineato con forza come, pur senza modificare l'apporto calorico, gli animali trattati con METF mostravano anche metabolicamente i benefici della restrizione calorica: una migliore sensibilità insulinica, un minor contenuto di lipoproteine a bassa densità e di colesterolo. Inoltre, gli stessi autori hanno osservato a livello molecolare la concomitante attivazione di AMPK e la riduzione dello stress ossidativo e dello stato di infiammazione cronica. Il ruolo della METF nella modulazione della risposta allo stress ossidativo, che contraddistingue le alterazioni cellulari associate all'aging, è stata valutata anche usando come modello sperimentale il nematode *C.elegans* [78].

1.3 IL MUSCOLO SCHELETRICO

1.3.1 La fibra muscolare

Il tessuto muscolare scheletrico costituisce la muscolatura scheletrica di tutto l'organismo; essa è un sincizio formato dalla fusione, durante lo sviluppo muscolare, di elementi mononucleati detti mioblasti, che fondendosi formano la fibra muscolare o miofibr.

La fibra muscolare scheletrica ha forma vagamente cilindrica (Fig. 6), in essa si rilevano numerosi nuclei (anche centinaia) posti a ridosso del sarcolemma (si denomina così la membrana cellulare delle cellule muscolari).

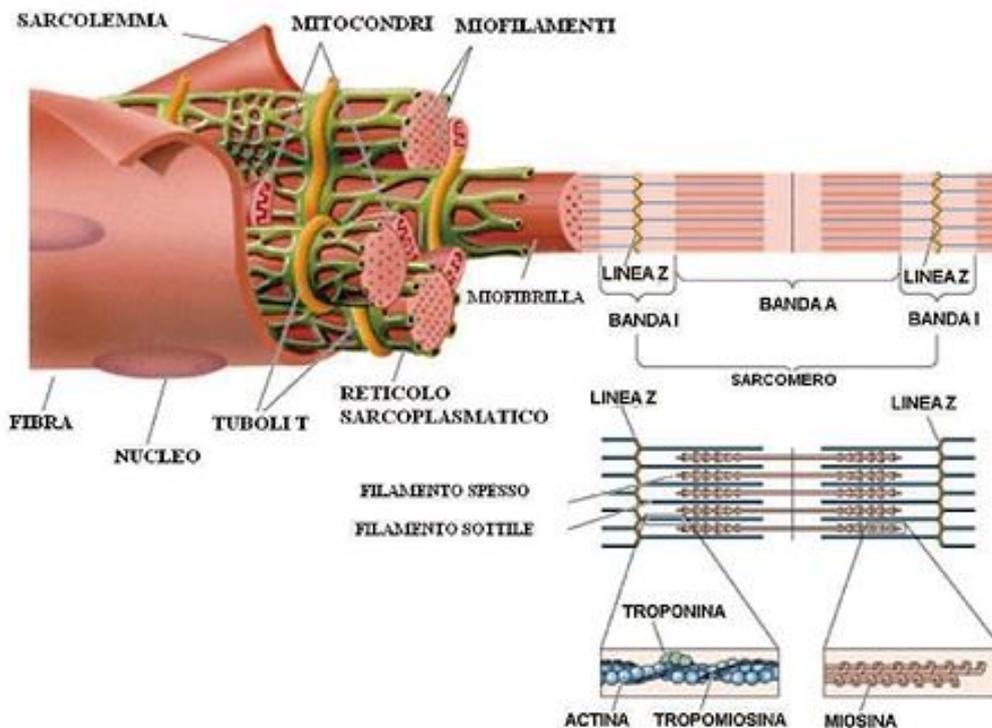


Figura 6 Struttura della fibra muscolare

La maggior parte del citoplasma della miofibra è occupata dalle miofibrille, lunghe strutture cilindriche con un diametro compreso tra 1 e 3 μm , disposte lungo l'asse maggiore della fibra, responsabili del fenomeno contrattile [79-81].

Ciascuna miofibrilla, ad un esame al microscopio a luce polarizzata, presenta una striatura trasversale dovuta all'alternanza di bande chiare e scure. Le bande scure sono birifrangenti o anisotrope, da qui il nome di bande A, mentre le bande chiare che appaiono isotrope sono dette bande I. Ciascuna banda I è divisa in due parti uguali da una linea più scura trasversale detta disco Z. Al centro della banda A è presente una zona più chiara detta banda H attraversata centralmente da una linea trasversale, la linea M. Il tratto compreso tra due dischi Z prende il nome di sarcomero e rappresenta l'unità strutturale e funzionale del tessuto muscolare scheletrico.

Le miofibrille sono costituite a loro volta da miofilamenti disposti longitudinalmente e compenetranti tra loro: i miofilamenti spessi di miosina e i miofilamenti sottili costituiti principalmente da actina. La striatura trasversale della fibro-cellula striata è quindi dovuta alla particolare disposizione reciproca dei miofilamenti [82].

Dal punto di vista funzionale, esistono due tipi di fibre muscolari: lente e veloci [83]. Le prime sono anche dette fibre rosse perché i muscoli in cui prevalgono si presentano di colore rosso scuro, a causa dell'abbondanza di mioglobina in questo tipo di fibre e dell'elevato livello di capillarizzazione. Si presentano inoltre ricche di mitocondri. Hanno la caratteristica di avere una maggior quantità di actina e di altre

proteine, che costituiscono le linee Z, e un'"impalcatura" sarcomerica più abbondante. Le fibre veloci sono invece dette bianche perché i muscoli in cui preponderano si presentano più chiari rispetto a quelli prevalentemente "rossi". Presentano quindi scarsa mioglobina e capillarizzazione, oltre ad un minor numero di mitocondri, mentre presentano abbondanti granuli di glicogeno. Le fibre bianche hanno diametro e dimensioni maggiori delle rosse, come anche le loro giunzioni neuromuscolari. Dal punto di vista enzimatico possiamo distinguere, in base all'attività ATPasica. Le fibre di tipo1 sono caratterizzate da bassa attività ATPasica. Si contraggono lentamente e poco intensamente e tollerano maggiormente la fatica (sono dunque in grado di mantenere la contrazione per un periodo piuttosto lungo). Presentano grandi quantità di enzimi mitocondriali e producono ATP prevalentemente tramite la glicolisi aerobica e la fosforilazione ossidativa a essa associata. Le fibre di tipo2 sono caratterizzate da elevata attività ATPasica. Si contraggono rapidamente e intensamente ma tollerano poco la fatica. Presentano grandi quantità di enzimi glicolitici e producono prevalentemente ATP tramite la glicolisi anaerobica.

1.3.2 La miogenesi

La miogenesi nei mammiferi è un fenomeno complesso, che avviene a partire dalle prime settimane di sviluppo embrionale.

Cellule mesenchimali totipotenti danno origine a una popolazione di cellule fusiformi mononucleate, chiamate mioblasti, che sono i precursori delle cellule muscolari contrattili. I mioblasti progressivamente fondono a formare sincizi, i miotubi [84, 85], che in seguito acquisiscono le caratteristiche morfofunzionali delle cellule muscolari mature [86, 87]. La transizione da mioblasto precursore a fibra multinucleata è finemente regolata dall'espressione di geni specifici del differenziamento terminale, notevoli cambiamenti nella sintesi e nell'accumulo di proteine caratteristiche ed evidenti cambiamenti morfologici.

Lo stadio finale della miogenesi è la maturazione della fibra muscolare: nei miotubi contenenti centinaia di nuclei compaiono striature trasversali dovute all'assemblaggio delle miofibrille ed alla formazione dei sarcomeri. In vitro dopo pochi giorni in coltura, in condizioni di differenziamento, i miotubi diventano eccitabili e capaci di contrarsi spontaneamente. Inoltre, tale tipo di differenziamento è irreversibile, infatti i miotubi differenzianti non possono essere indotti a rientrare nel ciclo cellulare e proliferare anche se esposti ad alte concentrazioni di fattori di crescita. Infatti, la proliferazione ed il differenziamento sono due processi cellulari strettamente collegati, mutualmente esclusivi, posti sotto il controllo di specifiche categorie di geni regolatori [88, 89].

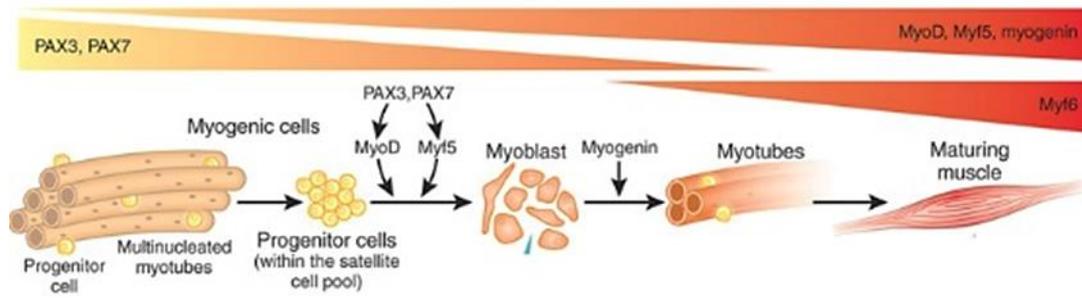


Figura 7 Schema esemplificativo del processo differenziativo. Ruolo dei MRFs.
Immagine adattata da Nature

1.3.3. I fattori di regolazione miogenici

Le proteine MRFs (Myogenic Regulatory Factors) sono espresse esclusivamente in cellule della linea miogenica [90-92].

La famiglia di MRFs include quattro membri: MyoD (il capostipite della famiglia), miogenina, Myf5 e Myf6, identificati sulla base della loro capacità di convertire fibroblasti embrionali ed altre cellule non muscolari in mioblasti scheletrici [93-96].

I quattro MRFs vengono attivati in modo spazio-tempo regolato durante il differenziamento miogenico [91-92].

MyoD sembra attivare il programma trascrizionale di geni muscolo-specifici, e arresta in modo permanente il ciclo cellulare mediante l'inibizione di alcuni fattori di trascrizione [97, 98]. Inoltre MyoD, insieme a Myf5, attiva la trascrizione di miogenina che regola il differenziamento miogenico finale [99].

L'espressione della miogenina è indispensabile per il differenziamento terminale delle cellule e dell'attivazione del fattore di trascrizione MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) [100].

I fattori MEF2 sono espressi in molti tessuti, alcune isoforme vengono indotte durante il differenziamento dei mioblasti, o in seguito all'espressione ectopica di MyoD o miogenina. I fattori MEF2 contengono un dominio MADS-box e un dominio MEF2 che cooperano nel mediare la dimerizzazione, il legame al DNA e l'interazione con co-fattori specifici [101, 102].

Myf6 sembra avere un ruolo nella specificazione del fenotipo delle fibre muscolari nella vita postnatale, e in particolare nel mantenere il fenotipo lento/ossidativo [103, 104].

I MRFs inducono l'espressione di altri geni specifici del muscolo, quali le catene pesanti della miosina (MyHC), l' α -actina, la tropomiosina, la troponina-C e la troponina-I.

1.3.4 Modificazioni della massa muscolare: Atrofia/Ipertrofia

Anche la massa muscolare può subire delle modificazioni in seguito a variazioni dell'attività contrattile o a patologie. Per esempio, prolungati periodi di inattività dovuta a immobilizzazione, disuso e denervazione provocano una progressiva atrofia, caratterizzata dalla perdita di massa muscolare [105-106]. L'atrofia si manifesta con perdita di peso che a sua volta può essere attribuito o a riduzione dell'area trasversa delle fibre o a diminuzione del numero delle fibre stesse. Al contrario, l'aumento di attività produce ipertrofia. Entrambi i fenomeni si possono ricondurre ad uno sbilanciamento tra sintesi e degradazione proteica [107-110].

1.3.5 Degradazione e sintesi proteica

La sintesi proteica è regolata a molti livelli e comprende diversi meccanismi intracellulari. AKT svolge un ruolo fondamentale nel processo di sintesi proteica, configurandosi come il nodo principale per tale processo (Fig. 8) [108, 109]. A conferma, è stato dimostrato che AKT è in grado di produrre ipertrofia nei muscoli di topi, che esprimono selettivamente nel muscolo scheletrico una forma attiva [110]. Una dei più potenti fattori trofici del muscolo, IGF-I (Insulin Growth Factor-I), è in grado di determinare ipertrofia delle fibre muscolari stimolando la sintesi proteica tramite l'attivazione dell'asse PI3K/AKT [106-108].

IGF-I è in grado di attivare PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) che a sua volta favorisce la fosforilazione e quindi l'attivazione di AKT. Una volta attiva, AKT fosforila

una serie di substrati, tra cui proteine che mediano la sintesi proteica, la trascrizione genica, la proliferazione cellulare e la sopravvivenza [111].

Uno dei bersagli di AKT è la chinasi mTOR chinasi che, quando fosforilata, stimola la sintesi proteica tramite due vie: l'attivazione della chinasi p70S6K e l'inibizione di 4E-BP1 (anche chiamato PHAS-1), rispettivamente un regolatore positivo e uno negativo del processo di sintesi [106-108,112].

AKT determina la fosforilazione anche di GSK3- β (Glycogen Synthase Kinase 3- β) causandone l'inattivazione e quindi rimuovendo il blocco per il fattore d'inizio eIF2B [108, 113-114].

Se da una parte AKT stimola la sintesi proteica, agendo su mTOR e GSK3- β , dall'altra è in grado di inibire la degradazione proteica (Fig. 8). L'attivazione della via PI3K/AKT provoca, infatti, la fosforilazione delle proteine FOXO, una famiglia di fattori di trascrizione, i cui vari membri (FOXO1, FOXO3, FOXO4) risultano implicati nella regolazione di geni bersaglio coinvolti nel metabolismo, nel ciclo e nell'apoptosi cellulare [114]. La forma defosforilata di FOXO nel nucleo risulta associata all'arresto della crescita e all'apoptosi. AKT fosforilando FOXO ne provoca l'uscita dal nucleo e quindi l'inibizione delle funzioni trascrizionali [115]. L'attività di FOXO1 risulta maggiore in muscoli atrofici e la sovra-espressione di FOXO1 determina una perdita di massa muscolare associata ad una maggior espressione di Atrogin1 e MuRF1, come pure la sovra-espressione di FOXO3 risulta associata ad atrofia e sovraespressione di Atrogin1

[116]. Quindi AKT è in grado di inibire la degradazione proteica in quanto, bloccando l'attività delle FOXO, riduce l'espressione di Atrogin1 e MuRF1 [117].

Se durante l'ipertrofia si riscontra un'attivazione della via PI3K/AKT, durante l'atrofia accade il contrario. Infatti, sia in vivo che in vitro si riscontra una minore fosforilazione di AKT e, quindi, una minore attività di p70S6K e una maggiore attività di 4E-BP1, con conseguente blocco della sintesi e una maggiore degradazione proteica dovuta proprio ad un incremento dell'espressione di MuRF-1 e Atrogin1 [108, 115, 117].

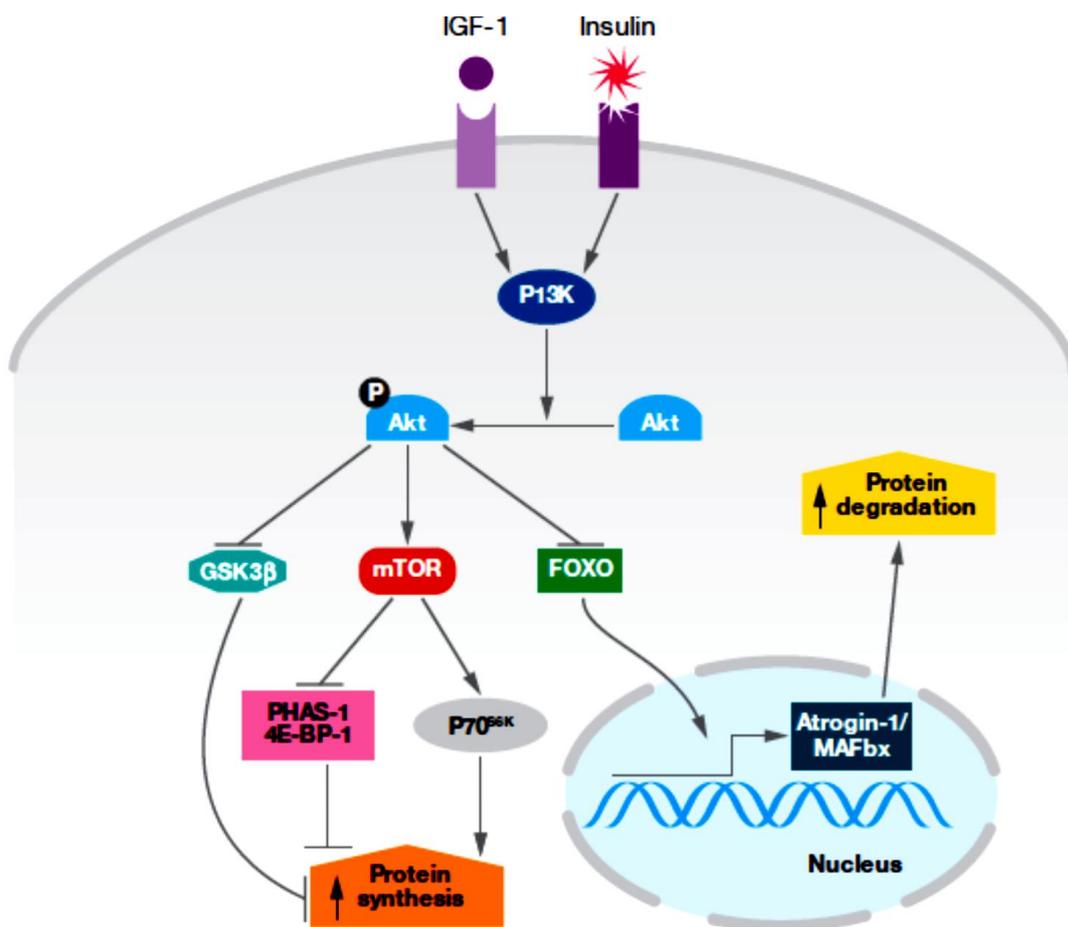


Figura 8 Cascata del segnale dell'atrofia e dell'ipertrofia muscolare.
.....Tratto da Annu. Rev. Biochem.

1.3.6 Le cellule satelliti

Le cellule satelliti (SC) rappresentano un pool di cellule staminali miogeniche localizzato tra la lamina basale e la membrana plasmatica delle fibre muscolari scheletriche. Esse sono responsabili della crescita e della rigenerazione del muscolo adulto [117]. Questa popolazione è stata descritta per la prima volta nel 1961 da Mauro nel corso di uno studio di microscopia elettronica sulla regione periferica di miofibre scheletriche di rana [118]. La definizione di "satelliti" deriva quindi dalla loro peculiare posizione anatomica, indipendentemente dalle loro funzioni o dal profilo di espressione genica.

Nel muscolo adulto in condizioni fisiologiche le SC si trovano in uno stato di quiescenza [119]. Tuttavia, in risposta a stimoli quali traumi muscolari, ipertrofia da carico e esercizio di resistenza, esse vengono attivate e rientrano così nel ciclo cellulare, proliferano e migrano dalla loro posizione sulla miofibra verso le zone danneggiate. Tale attivazione porta anche all'espressione di marcatori miogenici specifici che regolano e caratterizzano il differenziamento muscolare e alla trasformazione delle cellule satelliti in precursori miogenici attivati.

Per identificare le cellule satelliti sono stati condotti studi ultrastrutturali e, recentemente, l'individuazione di marcatori molecolari come Pax7 (Paired Homeobox Transcription Factor 7) ha permesso la loro caratterizzazione attraverso tecniche molecolari e di immunofluorescenza [120].

Nello stato di quiescenza le cellule satelliti esprimono Pax7, poi una volta che vengono attivate iniziano a esprimere i MRFs.

Il primo di questi fattori ad essere attivato è Myf5, la cui espressione è rilevabile nel 90% delle cellule satelliti aderenti alle fibre [120-121] e che è coinvolto nell'attivazione e nella proliferazione di precursori muscolari. Rapidamente si elevano anche i livelli di espressione di MyoD [122], il cui ruolo è di promuovere il differenziamento muscolare e di bloccare la proliferazione [123].

Miogenina è implicata nell'ultima fase del differenziamento sia durante lo sviluppo [124] che durante processi rigenerativi [125], e in particolare nella formazione di miotubi e miofibre mature a partire da mioblasti [126]. Infine Myf6 ha un ruolo peculiare nel differenziamento terminale di precursori muscolari per dare origine a miofibre completamente differenziate [127].

La rigenerazione del muscolo scheletrico è un processo finemente orchestrato, che implica l'attivazione delle cellule satelliti, la loro proliferazione e il loro differenziamento. Queste fasi sono, anche, regolate da meccanismi che coinvolgono interazioni cellula-cellula, cellula-matrice come pure la secrezione di fattori extracellulari. Il danno muscolare determina, infatti, il rilascio di molecole biologicamente attive nello spazio extracellulare, come dimostrato dalla presenza di mitogeni per le cellule satelliti nel siero estratto da un muscolo danneggiato, ma non da un muscolo integro.

1.3.7 Fattori di crescita coinvolti nella regolazione della massa muscolare

Numerosi studi hanno messo in evidenza che fattori presenti nel muscolo danneggiato sono in grado di mantenere un equilibrio tra crescita e differenziamento delle cellule satelliti, necessario per il recupero della normale architettura muscolare.

Il muscolo è una fonte dei fattori di crescita IGF-I e IGF-II, che agiscono in modo autocrino/paracrino durante la rigenerazione [128]. IGF-I e IGF-II controllano l'infiammazione, favorendo una più rapida risoluzione dell'evento infiammatorio e riducendo la fibrogenesi, mentre modulano il livello di espressione degli MRFs nelle cellule satelliti, favorendo la proliferazione e il differenziamento [129]. L'aumento di IGF-I nel muscolo è associato anche a ipertrofia, dovuta ad un incremento della sintesi proteica e ad una maggior attivazione delle cellule satelliti, che provvedono a rifornire le fibre di nuovi mio nuclei. Questi effetti sono mediati da diverse vie di segnale, come PI3K/AKT/mTOR che determina sia l'aumento della sintesi proteica sia la sopravvivenza cellulare [108].

Durante le prime fasi della rigenerazione l'espressione di HGF (Hepatocyte Growth Factor) risulta aumentata in maniera proporzionale all'estensione dell'area interessata dal processo [130, 131], ma con il progredire della rigenerazione la sua concentrazione diminuisce, suggerendo un suo particolare coinvolgimento durante gli eventi iniziali. HGF è rilasciato anche dalla matrice extracellulare in seguito al danneggiamento della lamina basale. In particolare, lo stiramento o la rottura della lamina basale causa l'attivazione di NOS (Nitric Oxide Synthase) e la produzione di NO,

che fa rilasciare HGF dalla matrice extracellulare [132]. HGF agisce direttamente sulle cellule satelliti, sul recettore specifico c-met, espresso sia dalle cellule quiescenti sia dalle attivate [133].

FGF-2 è un altro possibile candidato nella regolazione dell'attività delle cellule satellite durante la rigenerazione. FGF-2, infatti, è particolarmente efficace in vitro sull'attivazione dei mioblasti. È inoltre presente nella membrana basale che avvolge i miotubi durante lo sviluppo e quando sono maturi [134]. Benché le proteine FGF possano non giocare un ruolo critico nell'attivazione delle cellule satellite durante la rigenerazione muscolare, il loro ruolo potrebbe risiedere nel processo di ri-vascularizzazione grazie alle loro riconosciute proprietà angiogeniche [135].

I fattori di crescita della famiglia TGF- β sono importanti citochine che regolano la crescita cellulare. TGF- β si lega a recettori della membrana cellulare che attivano la fosforilazione delle proteine SMAD e che traslocano nel nucleo, dove innescano l'attivazione dei geni bersaglio in base allo stato cellulare. I membri della famiglia TGF- β sono stati identificati a lungo come modulatori dell'attività dei mioblasti poiché in grado di inibire sia la proliferazione sia il differenziamento [136].

Anche le protein chinasi Ca²⁺-calmodulina dipendente (CAMK) sono in grado di controllare l'attività di MEF2 e di influenzare il fenotipo muscolare. L'attività trascrizionale di MEF2 è regolata dai membri della famiglia delle proteine di HDAC II (Class II Histone Deacetylase), che formano dei complessi con MEF2 nel nucleo [137]. La fosforilazione di HDAC ne determina la traslocazione dal nucleo al citoplasma e

attiva MEF2. Durante la stimolazione, l'incrementata attività di MEF2 è appunto associata ad una traslocazione di HDAC nel citoplasma. La chiave di questo meccanismo è la fosforilazione di HDAC ad opera delle CAMK [138].

Due chinasi, CAMKII e CAMKIV, sembrano giocare un ruolo importante nella plasticità muscolare. Studi in vivo hanno dimostrato che la corsa stimola l'attività di CAMKII [139], mentre studi in vitro suggeriscono che sia coinvolta nell'attivazione del promotore della MyHC 2A [140], indicandone un ruolo nella trasformazione tra le isoforme rapide delle MyHC, durante l'allenamento di resistenza.

Inoltre, vi sono evidenze sperimentali che indicano una stretta relazione tra la forma attiva di CAMKIV e la biogenesi mitocondriale, dovuta ad una maggiore espressione di PGC-1 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 α), il principale regolatore della biogenesi stessa [141]. PGC-1 α attiverebbe la trascrizione in cooperazione con MEF2, confermando che il rimodellamento richiede un effetto combinato di più fattori di trascrizione, bersagli di altrettante vie di segnale.

I vari fattori di crescita (in particolare HGF e FGF) attivano le cellule satelliti stimolando le MAPK chinasi che contano almeno 4 famiglie principali (ERK, c-jun, ERK5 e p38), di cui è ormai noto il ruolo nel controllo sia positivo che negativo della miogenesi [142]. A p38 α/β e a p38 γ in particolare sono stati attribuiti ruoli chiave sia nel controllo dell'attivazione e della successiva proliferazione che del differenziamento dei precursori miogenici adulti [143].

2. SCOPO DEL LAVORO

L'inattività fisica è un fattore chiave nello sviluppo sia dell'obesità che del diabete. Uno stile di vita sedentario non rappresenta solo una delle principali concause dell'eziopatogenesi di queste patologie, ma costituisce la quarta causa di morte nel mondo, incrementando i principali meccanismi coinvolti nell'insorgenza delle malattie cardiache, neurodegenerative e tumorali [4, 8, 11]. In particolare, la sedentarietà svolge un ruolo fondamentale nel velocizzare il fenomeno sarcopenico [33].

La Metformina, che rappresenta il farmaco di prima scelta nel trattamento del T2DM, negli ultimi anni è stata proposta come farmaco anti-aging, data la sua capacità di regolare negativamente lo stress ossidativo e di attivare la protein chinasi AMPK [38-42, 50-53].

Sulla base degli effetti cellulari e molecolari della Metformina, in questo lavoro di ricerca si è voluto valutare la capacità del farmaco di prevenire i danni prodotti dall'inattività fisica in topi giovani. In particolare l'attenzione è stata focalizzata sul ruolo svolto dalla Metformina nel mantenimento della performance fisica e, in generale, dei processi di formazione e regolazione della massa muscolare scheletrica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Tutti i reagenti utilizzati sono stati acquistati dalla ditta Sigma Chemical Co. (MO, U.S.A.)

Sono stati usati i seguenti anticorpi primari prodotti dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, U.S.A.): AKT (C-20), CAMKII (M-176), Calnexina (H-70), ERK1 (K-23), ERK2 (C-14), GAPDH (FL-335), MyoD (C-20) Miogenina (D-10), MyHC (H-300), Myf5 (c-20), N-Caderina (H-63), p70S6 (C-18), SOD2 (FL-222), pERK1/2 (E-4-4) pp70S6 (sc-7984). Gli anticorpi primari specifici per fosfo-AKT (Ser473) (D9E) XP™ e fosfo-AMPK alpha (Thr172) (40H9) sono stati forniti dalla ditta Cell Signaling Technology (Maryland, U.S.A.); mentre l'anticorpo coniugato per Falloidina (Alexa Fluor® 488 Phalloidin molecular probes-Invitrogen) è stato fornito dall'azienda Life Technologies Italia. Per le analisi di Western blot o di Immunofluorescenza sono stati utilizzati anticorpi secondari Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, U.S.A.) rispettivamente coniugati con perossidasi, rodamina o FITC.

3.2 Modello Animale

Gli esperimenti sono stati condotti su 10 topi maschi C57BL/6. Durante il protocollo sperimentale gli animali sono stati stabulati in singola gabbia, mantenuti in un ciclo di luce-buio di 12 ore alla temperatura di $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidità del 65% costanti. E' stato loro fornito loro cibo standard per roditori e l'accesso all'acqua era libero.

Le variazioni ponderali e di glicemia sono stata monitorate settimanalmente per tutto il periodo dell'esperimento. In dettaglio, la concentrazione plasmatica di glucosio è stata determinata mediante un glucometro (Breeze2, Bayer, Basilea, Svizzera) effettuando dei micro prelievi di sangue dalla vena della coda.

Tutti gli esperimenti sono stati approvati dal comitato etico della nostra istituzione e sono stati condotti rispettando tutti le linee guida indicate dalle direttive nazionali ed internazionali.

3.2.1 Trattamento con METF in vivo

Dopo le prime due settimane di ambientazione in stabulario, alla 12 settimana di vita i topi sono stati randomizzati in due gruppi: il gruppo trattato con METF e il gruppo controllo (CONTR). La METF (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A.) è stata aggiunta all'acqua per 60 giorni. Sulla base dei dati farmacocinetici presenti in letteratura è stata scelta la dose di 250 mg/kg/die METF, corrisponde a quella normalmente somministrata agli uomini [144-145]. Ai topi controllo è stata somministrata acqua non implementata con METF. La somministrazione di METF non ha

influenza il senso di sete: il consumo quotidiano di acqua è stato di circa 7 ml in entrambi i gruppi, in linea con i dati presenti in letteratura e con i risultati uno studio pilota effettuato nei giorni precedenti all'inizio dell'esperimento [146].

Ogni giorno è stata cambiata l'acqua ad entrambi i gruppi. La dose di METF è stata aggiustata quotidianamente sulla base di quanto era stato bevuto e settimanalmente in base la peso. (Fig. 9A).

3.2.2 Valutazione della performance fisica

La performance fisica degli animali è stata valutata all'inizio e alla fine dell'esperimento mediante un test incrementale submassimale su treadmill. E' stato utilizzato un treadmill motorizzato a cinque corsie, equipaggiato con un'unità elettronica di controllo (2biological Instruments, Italia) e una griglia elettrificata all'estremità opposta al senso di marcia (Fig. 9B). L'intensità dello shock elettrico era di 0.4 mA per stimolare blandamente gli animali. L'inclinazione del treadmill era di 0° (nessuna inclinazione) per i primi 5 min ad una velocità di 0 m/min in modo da permettere l'acclimatazione degli animali al tappeto.

La corsa iniziava con un'inclinazione di 15° gradi a una velocità bassa di 10 m/min, equivalente alla normale velocità di locomozione dei topi, e veniva incrementata ogni 1.5 min. La corsa continuava fino all'esaurimento, definita come l'incapacità al mantenimento della velocità di corsa nonostante il contatto ripetuto con la griglia elettrica. Gli animali sono stati tolti dal treadmill se restavano per più di 5 sec sulla griglia senza tentare di

reingaggiarsi nella corsa. Il tempo all'esaurimento era registrato automaticamente dall'inizio della sessione di corsa [147].

Preliminarmente è stato osservato come i topi erano capaci di correre sul treadmill secondo le velocità del protocollo in uso nel protocollo utilizzato, senza segni osservabili di stress.

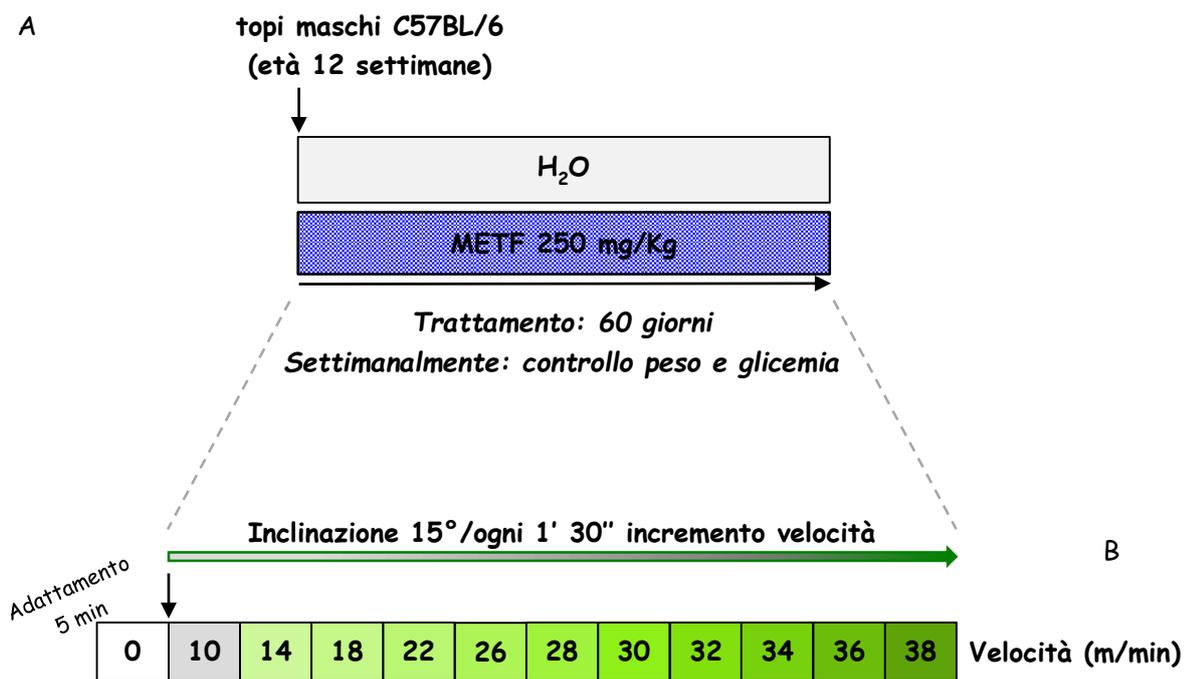


Figura 9. Protocollo sperimentale per il trattamento con METF in vivo.

A. Schema del lavoro. B. Test di valutazione della performance fisica.

Sulla base dei dati diretti ottenuti dal test (tempo di corsa, velocità massima raggiunta) è stato stimato il consumo VO₂ max secondo il protocollo da Høydal et al. nel 2007 [148].

3.2.3 Prelievo Tessuti

Alla fine dell'esperimento gli animali sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale; i muscoli gastrocnemio e femorale ed il fegato sono stati prelevati e immediatamente congelati in azoto liquido, successivamente sono stati conservati per le ulteriori analisi a -80°C.

3.3 Modello cellulare

La linea cellulare di mioblasti murini C2C12, derivata da cellule satelliti isolate da muscolo rigenerante di topo adulto è conosciuta come modello standard per lo studio del differenziamento muscolare. Queste cellule muscolari in coltura forniscono, infatti, un eccellente modello per lo studio del differenziamento miogenico in vitro poiché tale processo risulta facilmente inducibile attraverso la composizione del mezzo di coltura e controllabile attraverso il monitoraggio dei fattori di trascrizione legati al differenziamento (MRFs) [149, 150].

Il processo di differenziamento dei mioblasti C2C12 in vitro mima la miogenesi: sostituendo a mioblasti sub confluenti il siero fetale bovino normalmente presente nel terreno di crescita, con siero di cavallo, a più basso contenuto di mitogeni, tali cellule smettono di proliferare, si allineano e si fondono dando origine a miotubi maturi [151].

3.3.1 Condizioni di coltura C2C12

La linea cellulare di mioblasti murini immortalizzati C2C12, è stata fornita dall'European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC).

Le C2C12 in proliferazione sono state coltivate in terreno GM così composto: DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) ad alta concentrazione di glucosio (4.5 g/l), penicillina 100 U/ml, streptomicina a 100 µg/ml, 1% L-glutamina e 20% (v/v) di siero fetale bovino (FBS). Al fine di evitare l'inizio del processo spontaneo di differenziamento, che si osserva quando si raggiunge il 70% di confluenza, le cellule

sono state mantenute ad una confluenza del 40-50%. Le cellule in coltura sono state mantenute in un incubatore termostato a 37° C, 80% di umidità ed una concentrazione di CO₂ pari al 5%. Ogni giorno è stata valutata al microscopio ottico la morfologia delle cellule e la loro densità.

3.3.2 Induzione del processo di differenziamento C2C12

Per indurre il differenziamento, le cellule, al raggiungimento del 70% di confluenza, sono state trasferite dal terreno GM al terreno di differenziamento (DM), che differisce dal primo esclusivamente per il tipo di siero: siero di cavallo (HS) al 1% (v/v). Nel nostro modello cellulare, i primi miotubi appaiono nelle prime 24 e a 72 ore (h) l'intero processo differenziativo è completato con la formazione dei neo miotubi [152]. Il terreno è stato cambiato ogni giorno. L'intero processo differenziativo si completa in 72-96h, durante questo periodo la morfologia cellulare viene osservata al microscopio ottico giornalmente.

3.3.3 Trattamento con METF in vitro

I miociti proliferanti, durante il differenziamento e i miotubi neoformati sono stati trattati con 400 μM METF. Nelle rispettivi controlli la METF non è stata aggiunta al medium. In Fig. 10 sono riportati gli schemi di trattamento, con l'indicazione della percentuale di confluenza e i tempi di trattamento. Sulla base degli studi di farmacocinetica la somministrazione con METF è stata ripetuta ogni 8 ore [40, 153].

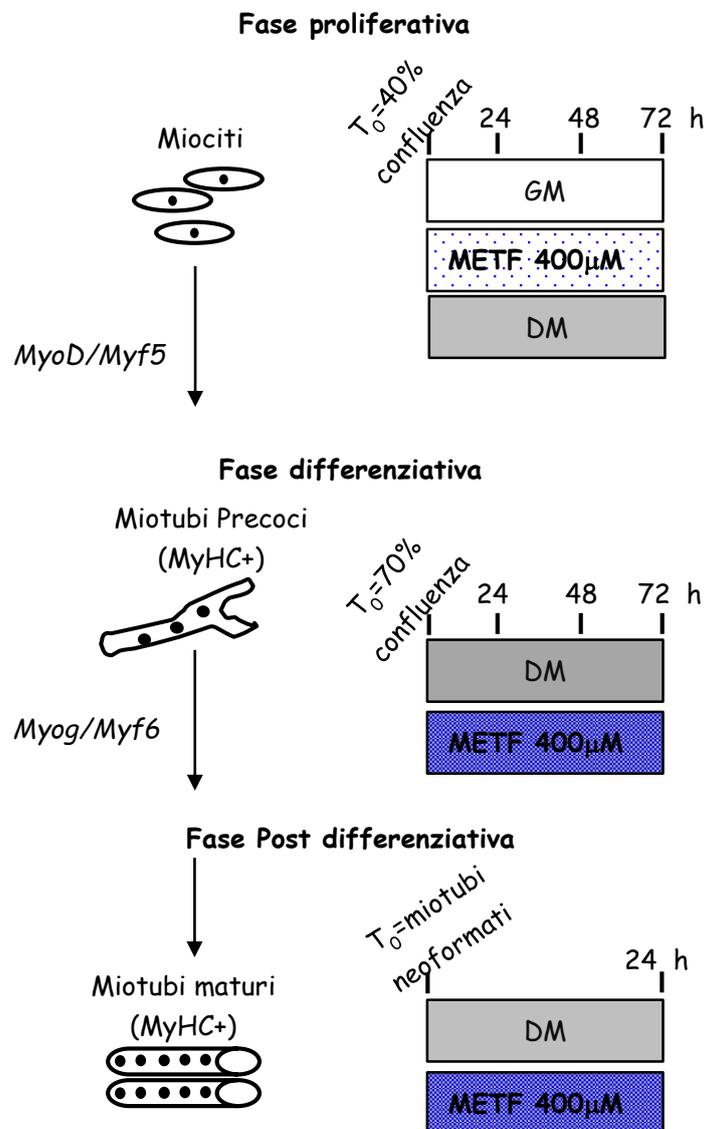


Figura 10 Schema dei trattamenti METF in vitro. Per ogni fase è stata indicata la durata del trattamento e la densità cellulare.

3.3.4 Test di crescita e vitalità cellulare

Allo scopo di ottenere una curva di crescita cellulare, è stato valutato il numero di cellule per piastra attraverso un conteggio in presenza di una colorazione vitale con il colorante Trypan Blue.

I mioblasti proliferanti sono stati seminati in piastre di petri della dimensione 60mm x 15mm ad una confluenza del 40%. Sono state valutati gli effetti dello stimolo alla crescita prodotto dal solo *GM*, dal *GM* supplementato con *METF* e dal medium *DM*. L'esperimento è stato condotto fino al raggiungimento da parte delle cellule di controllo dello stato di sub-confluenza. Ogni giorno le cellule sono state tripsinizzate e contate mediante emocitometro al microscopio ottico. Il numero di cellule morte è stato determinato mediante colorazione con Trypan Blue (in soluzione allo 0.4% w/v), colorante che penetra per diffusione attraverso la membrana cellulare delle cellule morte che così assumono una caratteristica colorazione blu, mentre le cellule vive si presentano tondeggianti e translucide. La vitalità cellulare è stata calcolata come rapporto delle cellule vitali sul numero totale di cellule.

3.3.5 Preparazione dei lisati cellulari da tessuto e da colture cellulari

I tessuti ancora congelati sono stati posti in tubi contenenti un'adeguata quantità di tampone di lisi e sono stati omogeneizzati per pochi secondi con un omogeneizzatore (Ultra Turrax T25, Janke & Kankel) e incubati per 45 min in ghiaccio agitando di volta in volta.

Per la preparazione degli estratti cellulari le cellule in coltura sono state lavate due volte in PBS, staccate meccanicamente in presenza del tampone di lisi. Le cellule sono state mantenute in ghiaccio per circa 1 ora, agitando di tanto in tanto. Sia per la preparazione dei lisati da tessuti che da cellule è stato usato come tampone di lisi il RIPA buffer implementato con gli inibitori delle proteasi (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM Sodio Ortovanadato (Na_3VO_4), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/ml aprotinina, 1 mg/ml leupeptina, 1 mg/ml pepstatina. Dopo un'ora sono state eliminate dai campioni le sospensioni insolubili mediante centrifugazione a 12,000 x g per 30 minuti, il surnatante è stato raccolto e conservato a -20°C .

3.3.6 Quantificazione della concentrazione proteica dei lisati cellulari

Le proteine totali contenute nei vari campioni esaminati sono state quantificate usando il kit commerciale Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, U.S.A.). Questa metodica si basa sul fatto che in condizioni alcaline gli ioni rame Cu^{2+} formano un complesso con i legami peptidici delle proteine e vengono

ridotti a Cu^+ . L'acido bicinconinico (BCA) in condizioni alcaline è un reagente altamente sensibile, stabile e specifico per il Cu^+ , e forma con esso un composto di color porpora la cui intensità è proporzionale alla quantità di proteina presente. L'assorbanza è stata determinata a 562 nm, mediante uno spettrofotometro (Ultrospec 2100 pro, UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech). Il valore della concentrazione è stato estrapolato da una retta di taratura costruita utilizzando campioni di albumina di siero bovino a concentrazione nota.

3.3.7 Western blot: Preparazione dei campioni e corsa elettroforetica

Aliquote dei campioni corrispondenti a 30 o 50 μg di proteine sono state separate in SDS-PAGE. I campioni sono stati ridotti mediante nel tampone di caricamento di 2- β -mercaptoetanololo. I campioni sono stati bolliti per 5 minuti al fine di permettere la denaturazione completa delle proteine e successivamente caricati sul gel di acrilamide/ bis-acrilamide a 8%, 10% o 15% a secondo del peso molecolare della proteina che si voleva studiare. La corsa elettroforetica è stata condotta in condizioni denaturanti ad una corrente costante di 130 V in celle Mini-Protean (Bio-Rad, California, U.S.A.) per circa 1 ora e 30 min.

3.3.8 Western blot: Immunoblotting

Al termine della corsa elettroforetica le proteine separate in SDS-PAGE sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa (Protran®, Whatman® Schleicher & Schuell) come descritto [154].

Le membrane sono state incubate overnight in una soluzione di Tris Buffered Saline (TBS) + 0.1 % (v/v) Tween 20 (TBS-T) contenente latte in polvere al 5% (w/v) per saturare i siti di legame aspecifici. Dopo aver effettuato alcuni lavaggi in TBS-T, le membrane sono state incubate con gli specifici anticorpi primari e dopo con gli anticorpi secondari specie-specifici coniugati con perossidasi. Tutte le incubazioni sono state eseguite sotto agitazione costante.

Dopo lavaggi in TBS-T, si è proceduto alla rivelazione delle bande tramite tecnica ECL (Enhanced Chemiluminescence) utilizzando un chemiluminescente (Amersham Pharmacia Biotech, New York, U.S.A.) ed esposizione su lastre fotografiche Hyperfilm™ (Amersham Bioscience Biotech, New York, U.S.A.), sottoposte a sviluppo e fissaggio con liquidi fotografici (KODAK) in camera oscura.

La quantificazione delle bande è stata effettuata mediante un'analisi densitometrica utilizzando il programma informatico Scion Image Software (Scion corporation, Maryland, U.S.A.). Allo scopo di verificare l'effettiva concentrazione proteica analizzata per ogni campione, sono stati scelti dei controlli interni rappresentati dalle proteine Calnexina e GAPDH.

I dati ottenuti sono stati presentati come fold-change (FC) rispetto al controllo.

3.3.9 Immunofluorescenza su sezioni di tessuto e su colture cellulari

Il tessuto epatico di interesse fissato in OCT è stato tagliato in sezioni sottili (circa 7-8 μm) tramite un criostato (CM 1850, Leica) alla temperatura di circa -25°C . Le sezioni sono state poste su vetrini (Superfrost) e conservate a -20°C .

Le cellule, invece, sono state fissate in paraformaldeide al 4% (PFA 4% w/v) in PBS a pH 7.4 e conservate in PBS contenente NaN_3 allo 0.02% (w/v) a 4°C .

Il protocollo utilizzato per le reazioni di immunofluorescenza su sezioni è uguale a quello utilizzato per le cellule: i campioni sono stati incubati con PBS contenente bovina serum albumine (BSA) al 1% (w/v) e Triton X-100 (TX-100) allo 0.2% (w/v) per 30 minuti a temperatura ambiente per permeabilizzarle e bloccare i siti di legame aspecifici con i quali l'anticorpo potrebbe interagire. Le cellule sono state quindi incubate con gli anticorpi primari e successivamente con lo specifico anticorpo secondario coniugato con Rodamina. I nuclei sono stati colorati con una soluzione di DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato) e i vetrini sono stati montati mediante l'uso del Moviol.

Le sezioni di tessuto o le cellule sono state osservate mediante l'uso di un microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse 50I microscopy, Nikon Instruments Europe BV, Olanda) software collegato ad un analizzatore di immagini Nis-Elements D software (Nikon Instruments Europe BV, Olanda), per lo studio delle modificazioni morfologiche e i parametri dimensionali. Le immagini ottenute sono state in seguito analizzate mediante l'impiego del programma informatico Adobe® Photoshop® CS4.

3.4 Analisi statistica

Tutti i dati presentati sono stati ottenuti da almeno tre prove sperimentali. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo statistico del t-test. I dati sperimentali sono stati presentati come media \pm deviazione standard. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi se $p \leq 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Metformina e sedentarietà: Studio In Vivo

4.1.1 Analisi delle variazioni di peso e glicemia

Al fine di valutare, in vivo, la capacità della METF di contrastare i danni provocati dall'inattività fisica 10 topi C57BL/6 sono stati mantenuti in condizioni di assoluta sedentarietà, in assenza di qualsiasi forma di esercizio. Metà degli animali sono stati trattati con una dose di 250 mg/Kg/die di METF per 60 giorni, mentre l'altra metà ha costituito il gruppo controllo (CONTR) (Fig. 9).

Il controllo settimanale del peso ha evidenziato come METF non alteri il peso dell'animale (Fig. 11A). In entrambi i gruppi è stato osservato un aumento ponderale di simile entità tra l'inizio e la fine dell'esperimento, ma non tra i due gruppi. Anche la glicemia non è influenzata dal trattamento con METF (Fig. 11B).

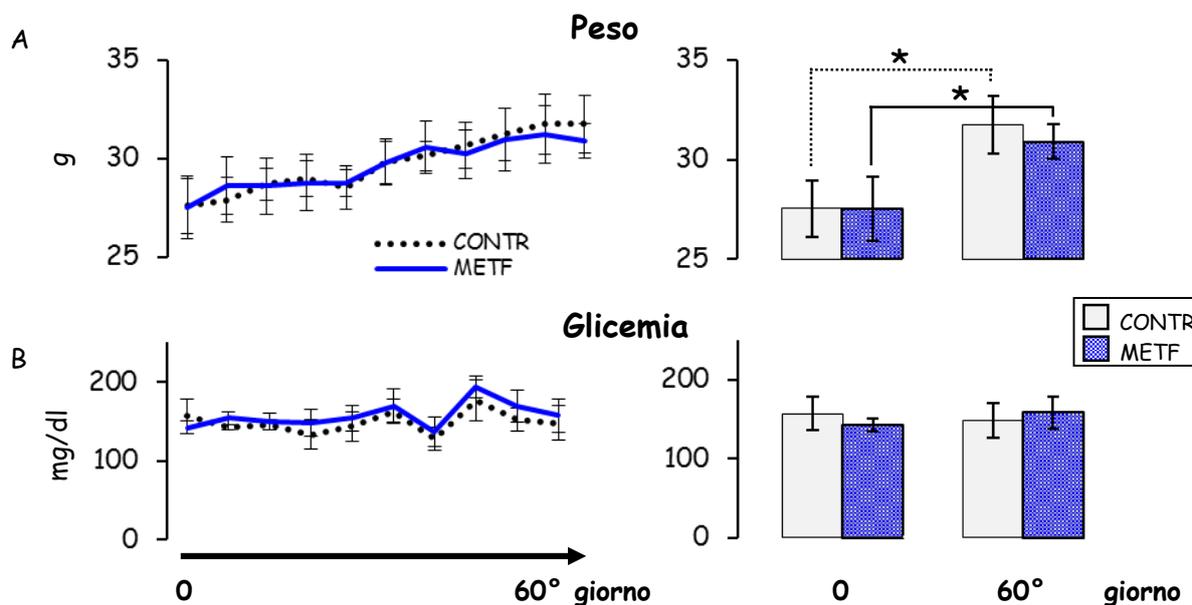


Figura 11 Peso e valori glicemici misurati settimanalmente nei topi controllo e trattati. * $p < 0.05$.

4.1.2 Valutazione della performance fisica

La valutazione della performance fisica, effettuata mediante test incrementale submassimale su treadmill, ha rilevato come nei topi con METF si registra un significativo aumento del tempo di corsa e quindi della velocità massima raggiunta (Fig. 12).

Valutazione della performance fisica
Test submassimale incrementale su treadmill

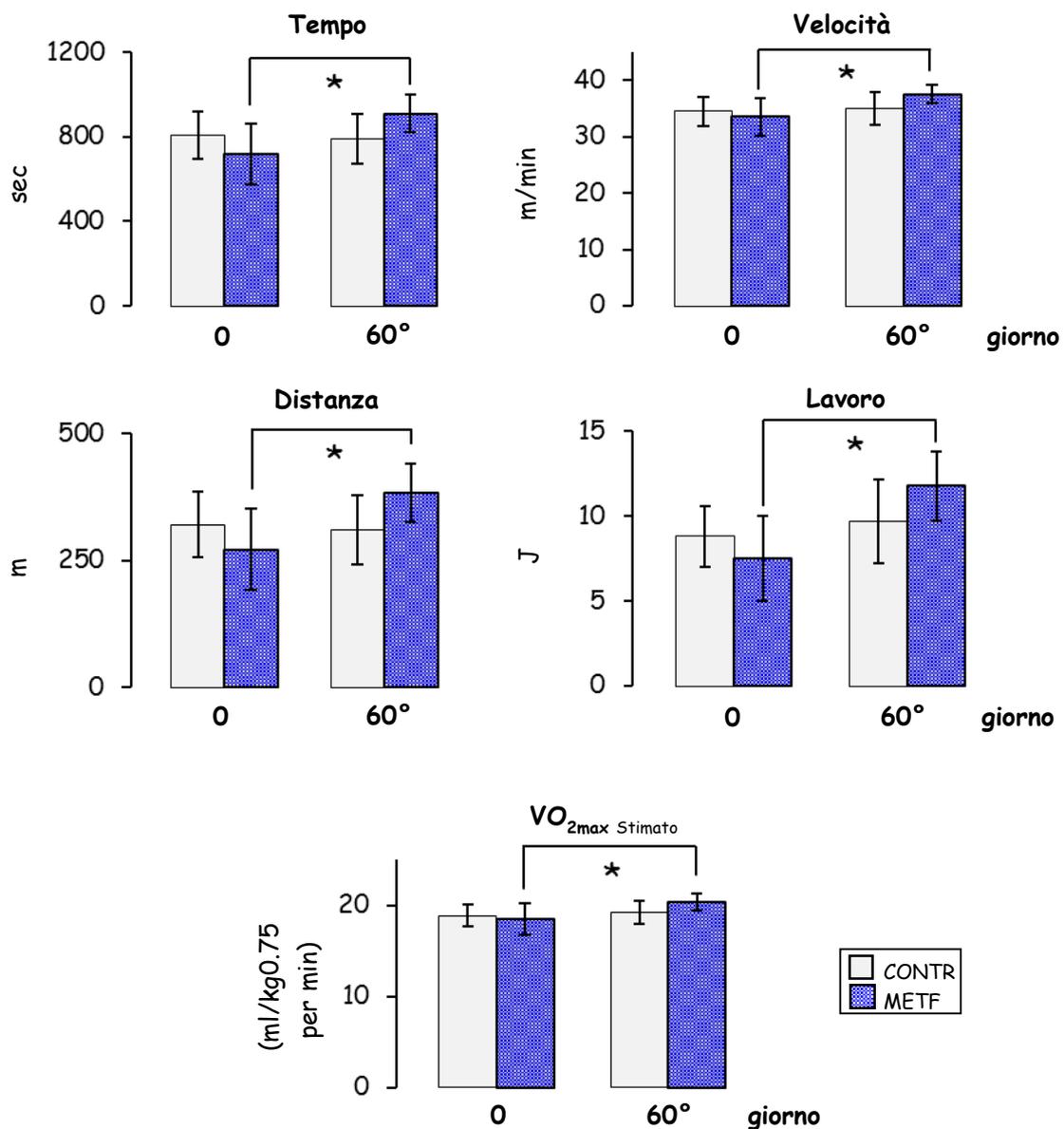


Figura 12 Il test submassimale con il treadmill mostra come il trattamento con METF migliori la performance muscolare. * $p < 0.05$

Le misure indirette del lavoro e del volume massimo di ossigeno (VO_{2max}) sottolineano, quindi, come il trattamento cronico con METF sia stato in grado di migliorare la capacità muscolare nonostante la condizione di estrema sedentarietà e l'invecchiamento del topo che, come è noto, è associato ad una minore resistenza all'esercizio [33].

4.1.3 Analisi dell'azione di METF a livello muscolare

Al fine di comprendere con quale meccanismo d'azione la METF riesca a contrastare a livello muscolare i danni indotti dalla sedentarietà, è stato valutato il grado di attivazione della chinasi AKT, regolatore cruciale della massa muscolare [106-110]. Come mostrato in Fig. 13, un significativo aumento del grado di attivazione di AKT caratterizza il muscolo gastrocnemio dei topi stimolati con METF rispetto al controllo. Inoltre, anche nel bicipite femorale si osserva un tendenziale aumento dell'attività di AKT.

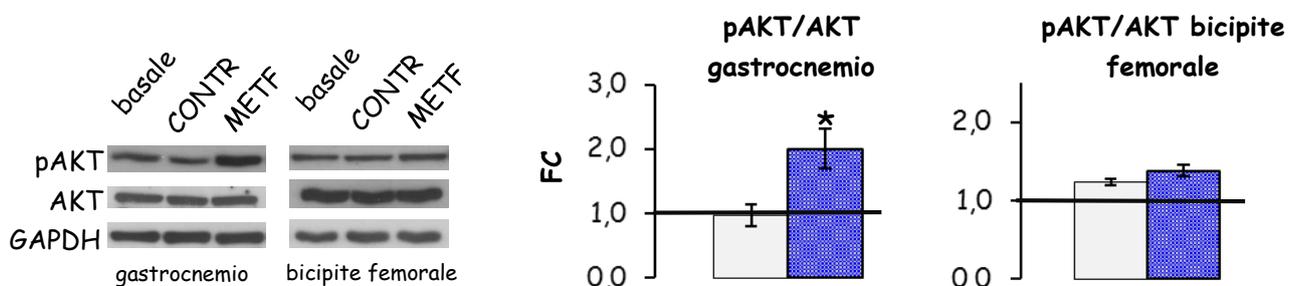


Figura 13 Analisi del grado di attivazione di AKT a livello muscolare. I topi METF mostrano un significativo aumento dei livelli di pAKT rispetto al controllo. * $p < 0.05$. Sono state riportate le bande delle proteine studiate.

4.1.4 Analisi dell'azione di METF a livello epatico

E' stato analizzato il tessuto di elezione dell'azione della METF: il fegato. Inizialmente, è stato valutato il livello di fosforilazione di AMPK: come si evince dalla Fig. 14 il contenuto di pAMPK è significativamente aumentato nei topi METF, rispecchiando i dati presenti in letteratura [155].

Successivamente sono stati valutati markers specifici legati allo stress epatico. Nei topi METF le proteine ERKs sono significativamente disattivate (Fig. 14).

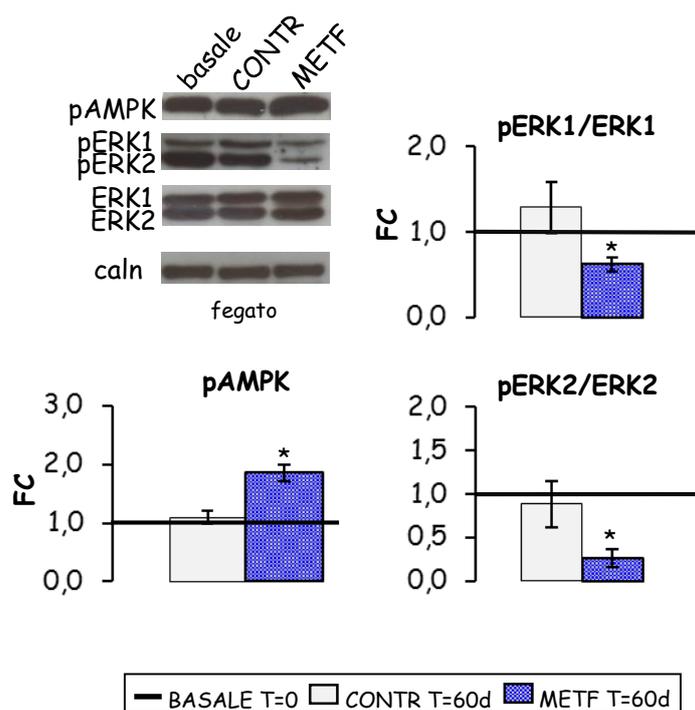


Figura 14 Analisi dell'azione di METF a livello epatico: METF incrementa i valori di pAMPK e disattiva le ERKs. * $p \leq 0.05$. Sono state riportate le bande esemplificative delle proteine analizzate.

Considerando che la maggiore attività di queste chinasi è associata con un aumento dello stress ossidativo [155], questi dati rilevano come il trattamento con METF non solo migliori la performance fisica ma anche blocchi i meccanismi molecolari capaci di attivare i processi stressogeni epatici.

Infine, gli esperimenti in immunofluorescenza mostrano come nel fegato METF sembra essere capace di modulare positivamente la CAMKII, suggerendo come questo farmaco possa influenzare anche questo importante regolatore del segnale del calcio intracellulare (Fig. 15).

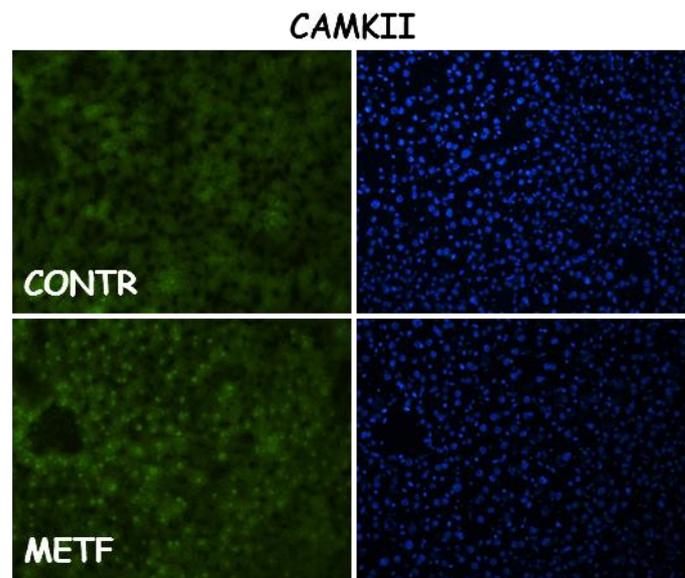


Figura 15 Colorazione delle sezioni epatiche dei topi controllo e METF con anticorpo specifico per CAMKII. Ingrandimento 20x. Scale bar 200 μ m.

Nella loro totalità, i dati ottenuti dallo studio in vivo indicano come la METF possa rallentare la degenerazione funzionale associata allo stato di sedentarietà.

4.2 Metformina e sedentarietà: Studio In Vitro

4.2.1 Studio degli effetti della METF sulla crescita delle C2C12

Al fine di voler meglio comprendere l'azione della METF a livello muscolare, sono stati investigati gli effetti dello stimolo con questo farmaco nelle cellule C2C12, durante la fase proliferativa, durante il differenziamento e a differenziamento concluso (Fig. 10)

Il trattamento con 400 μM METF non altera il ciclo cellulare delle cellule C2C12, come si osserva in Fig. 16. Gli andamenti della curva di crescita delle cellule controllo GM e delle cellule METF sono infatti sovrapponibili e significativamente diversi rispetto alle cellule coltivate in DM, ovvero nella condizione dove vengono sottratti i principali nutrienti allo scopo di indurre il processo differenziativo.

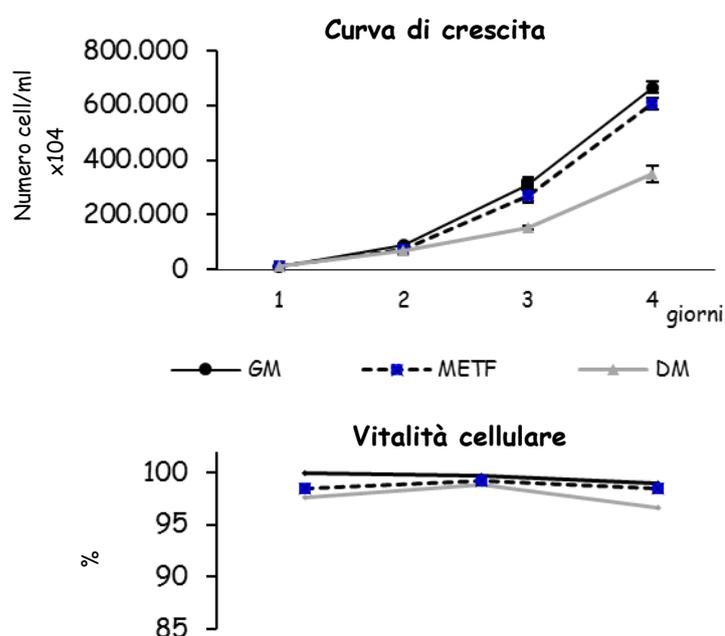


Figura 16 Valutazione della capacità proliferativa e della vitalità delle cellule C2C12. La METF non influenza la crescita cellulare e non induce effetti citotossici.

Il test di vitalità indica come nella dose prescelta per condurre questi esperimenti la METF non ha alcun effetto citotossico.

Queste evidenze sono confermate dalle immagini ottenute in contrasto di fase: le C2C12 cresciute in terreno GM implementato con METF mostrano una forma abbastanza tondeggiante, la loro densità risulta elevata e le cellule sono molto più compattate rispetto alle cellule mantenute in DM; tutte queste caratteristiche morfologiche sono tipiche di un'importante attività proliferativa (Fig. 17).

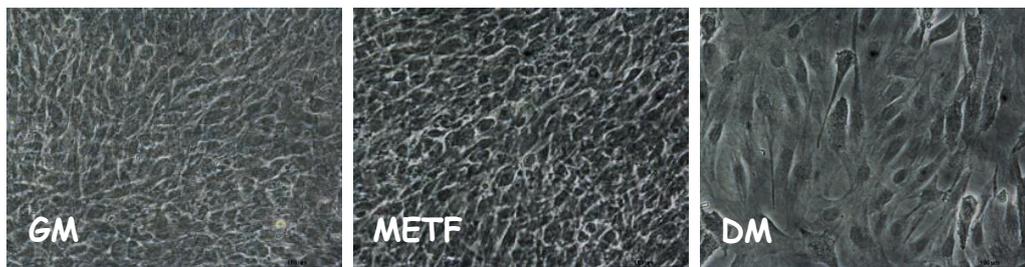


Figura 17 Immagini in contrasto di fase alla fine della proliferazione: le C2C12 METF non mostrano differenze morfologiche significative rispetto alle cellule controllo. Ingrandimento 20x.

4.2.2 Studio dell'azione della METF su MyoD durante la fase proliferativa

Questi primi dati sembrano indicare come la METF non sia in grado di promuovere l'inizio del processo differenziativo, mediante blocco del ciclo cellulare. Ipotizzando un effetto di METF sull'espressione dei MRFs, è stato determinato il contenuto proteico del principale fattore di trascrizione coinvolto nell'inizio del processo differenziativo: MyoD [89-92, 97-98].

Come si osserva dal grafico presentato nella Fig. 18, METF è capace di promuovere l'aumento del contenuto proteico di MyoD in maniera del tutto simile allo

stimolo con DM. Questo risultato suggerisce come la METF, pur non influenzando il ciclo cellulare, sia in grado di favorire la sintesi del principale fattore di trascrizione coinvolto nell'induzione del differenziamento e protagonista principale nella determinazione del fenotipo miogenico.

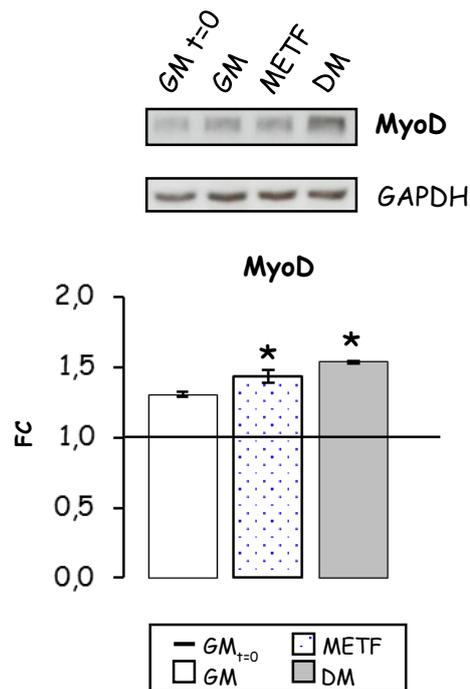


Figura 18 Determinazione tramite Western blot del contenuto proteico di MyoD. La METF incrementa significativamente il contenuto di MyoD. Bande rappresentative delle proteine analizzate sono riportate in figura. * $p \leq 0.05$.

4.2.3 Studio degli effetti della METF sulla morfologia dei mioblasti

Per avvalorare questa osservazione sono stati condotti test di immunofluorescenza usando anticorpi specifici non solo per MyoD ma anche per l'altro MRFs tipico della fase precoce del differenziamento: Myf5. Dopo 24h dall'inizio della fase proliferativa, il trattamento con METF non solo incrementa il numero delle cellule positive ai due fattori ma induce dei cambiamenti morfologici tali per cui le C2C12 METF sono caratterizzate da un aspetto morfologico intermedio tra le cellule controllo e le cellule DM (Fig. 19).

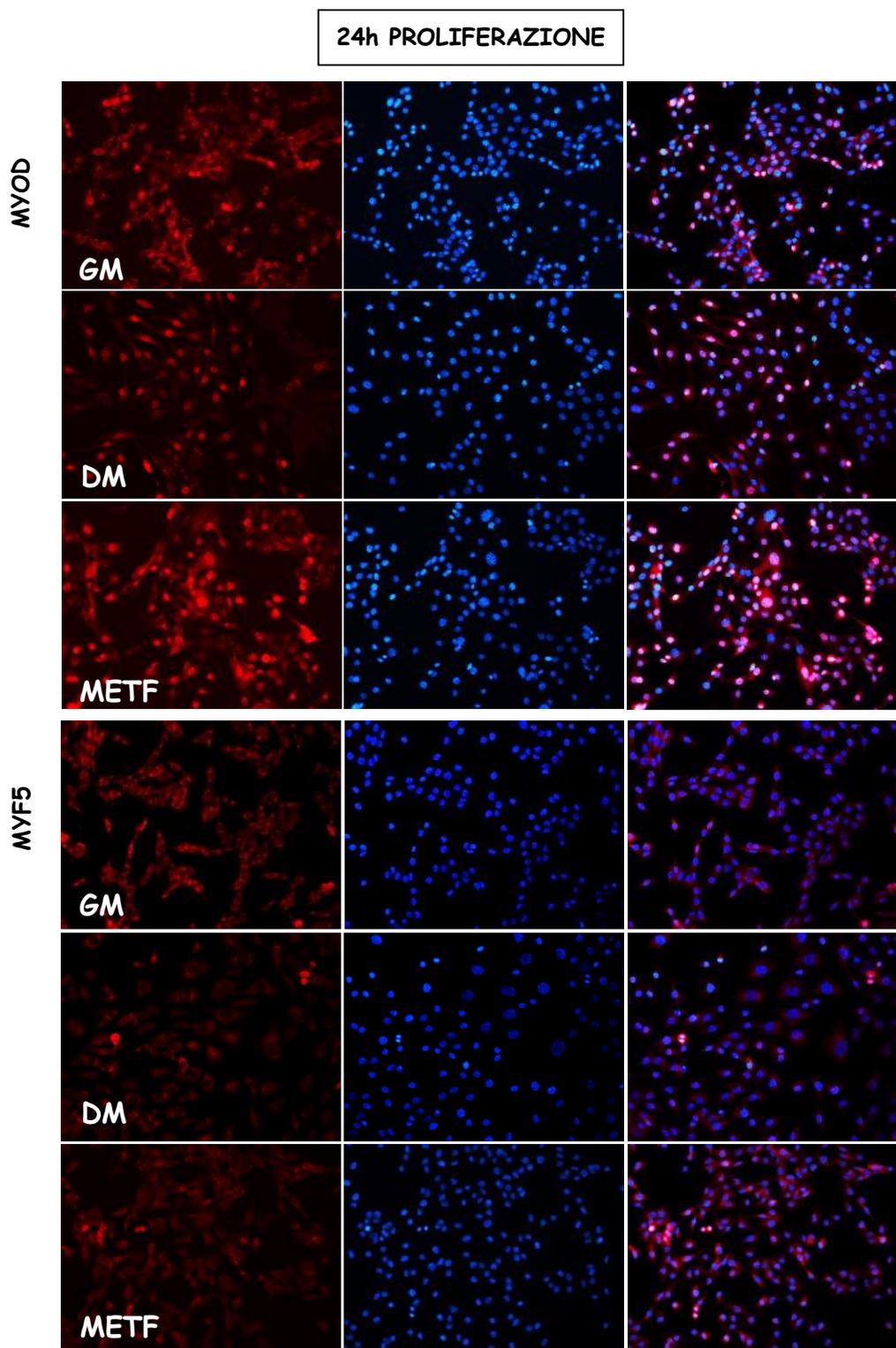


Figura 19 Immunofluorescenza nelle prime 24h di proliferazione per Mfy5 e MyoD. Il trattamento con METF incrementa il segnale dei due MRFs e modifica la morfologia delle cellule in direzione di un inizio del processo differenziativo. Scale bar 200 μ M.

Ad ulteriore conferma dei cambiamenti morfologici indotti da METF, la colorazione con Falloidina (48h proliferazione), principale marker citoscheletrico, mostra come le cellule METF perdono la loro caratteristica forma tondeggiante tipica delle cellule in GM per assumere una morfologia più allungata (Fig. 20).

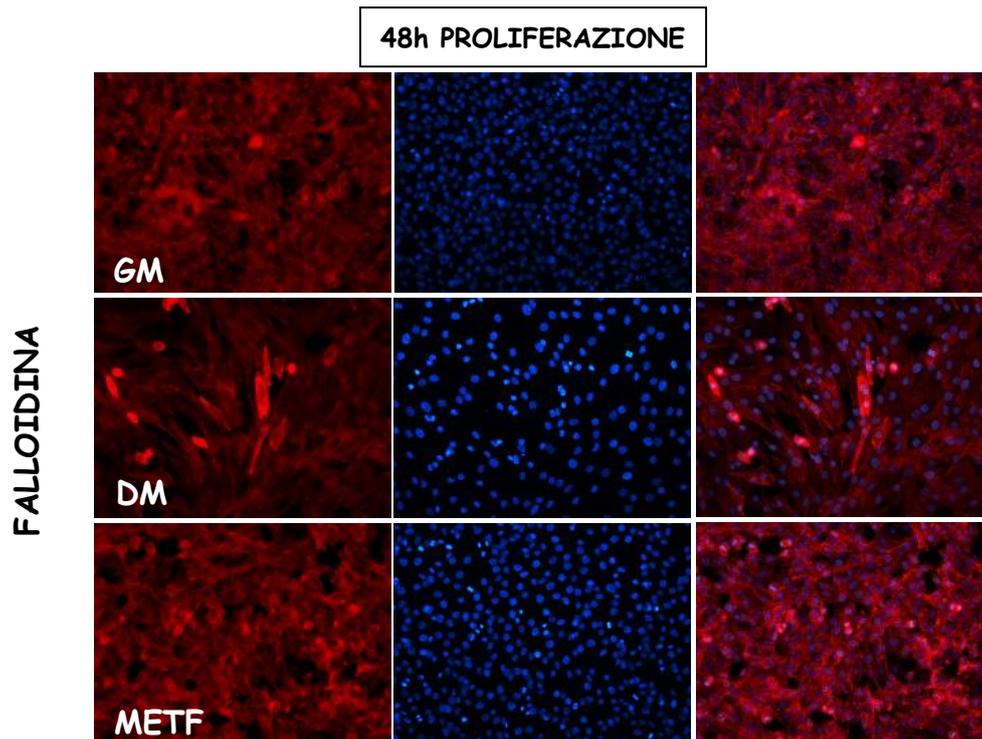


Figura 20 Colorazione specifica per Falloidina di mioblasti proliferanti. Le cellule METF mostrano una morfologia più allungata rispetto alle cellule GM. Scale bar 200 μ M.

Nella loro totalità i risultati in fase proliferativa, indicano come la METF possa svolgere un ruolo positivo importante nell'acquisizione del fenotipo miogenico, promuovendo l'attivazione dei MRFs e non influenzando il ciclo cellulare.

4.2.4 Studio dell'azione di METF nella formazione di neo miotubi

Successivamente è stata analizzata mediante Western blot e Immunofluorescenza l'azione della METF durante la fase precoce (24h), intermedia (48h) e tardiva (72h) del processo differenziativo (Fig. 10-21).

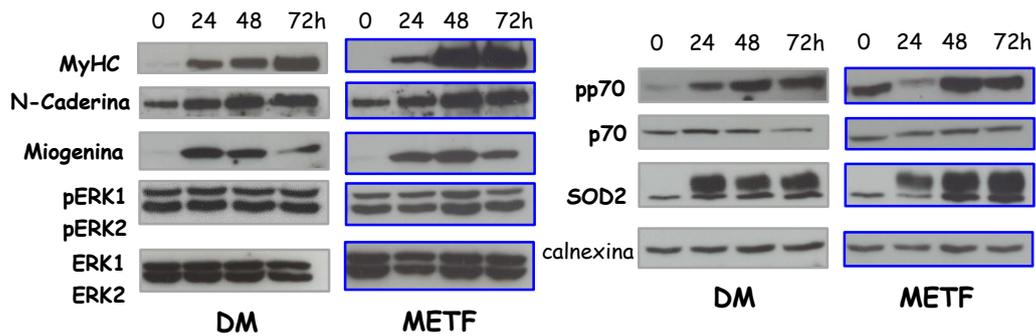


Figura 21 Bande rappresentative delle proteine analizzate mediante Western blot durante il differenziamento delle cellule C2C12.

La progressione del differenziamento è stata valutata determinando il contenuto proteico della principale proteina marker della formazione dei miotubi, la catena pesante della Miosina (MyHC). Come mostrato in Fig. 22, le cellule trattate con METF sono caratterizzate da un significativo aumento dell'MyHC rispetto alle cellule controllo. Una simile azione si osserva per N-Caderina, proteina chiave nella riorganizzazione citoscheletrica, fondamentale nel processo di fusione dei miociti in nuovi miotubi. [156].

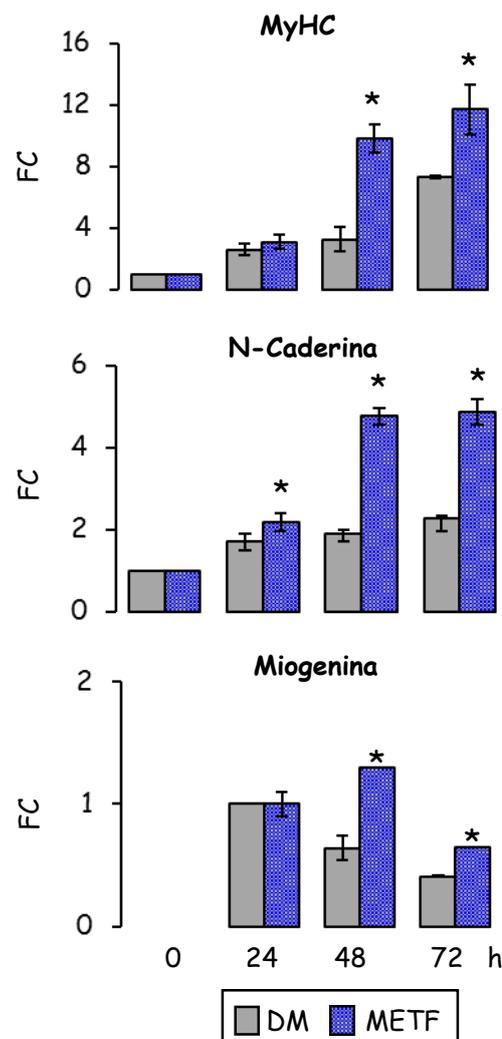


Figura 22 Valutazione della progressione del differenziamento di cellule C2C12 trattate con METF. Lo stimolo con la biguanide promuove la sintesi dell'MyHC, dell'N-Caderina e della Miogenina. *p<0.05.

Al fine di comprovare questi risultati, che suggeriscono un ruolo positivo della METF nella formazione di neo miotubi, è stato determinato il contenuto proteico del fattore di trascrizione miogenica tipico della fase intermedia Miogenina. METF aumenta il contenuto di questo MRFs e, in particolare, incrementa il suo picco di espressione a 48h (Fig. 22).

Inoltre è stato osservato come, durante il differenziamento, il contenuto proteico della Superossido Dismutasi 2 (SOD2)(Fig. 23), enzima mitocondriale essenziale per i processi di detossificazione cellulare [157], sia aumentato nelle cellule METF rispetto alle cellule controllo, indicando come l'azione di contrasto da parte della METF ai danni provocati dalla sedentarietà possa coinvolgere anche le funzioni mitocondriali anti ossidanti.

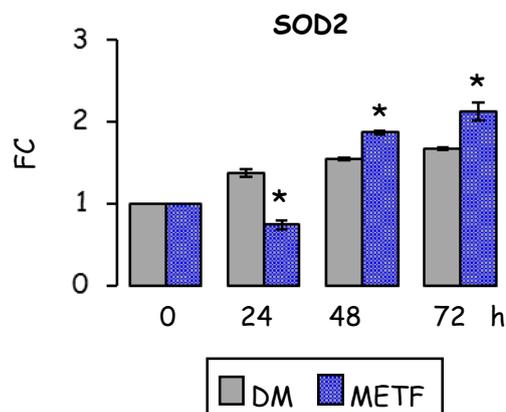


Figura 23 Determinazione del contenuto proteico di SOD2 durante il differenziamento effettuato in presenza di METF: il farmaco promuove la sintesi di SOD2. * $p \leq 0.05$.

4.2.5 Studio dell'azione di METF sui pathway cellulari coinvolti nel differenziamento

Durante il differenziamento, è stato studiato anche il grado di attivazione di alcune delle chinasi chiave nelle cascate del segnale coinvolte nella formazione dei miotubi: ERKs e p70S6 chinasi [106-110]. I risultati del Western blot indicano come METF promuova il differenziamento muscolare attivando la via del segnale delle ERKs.

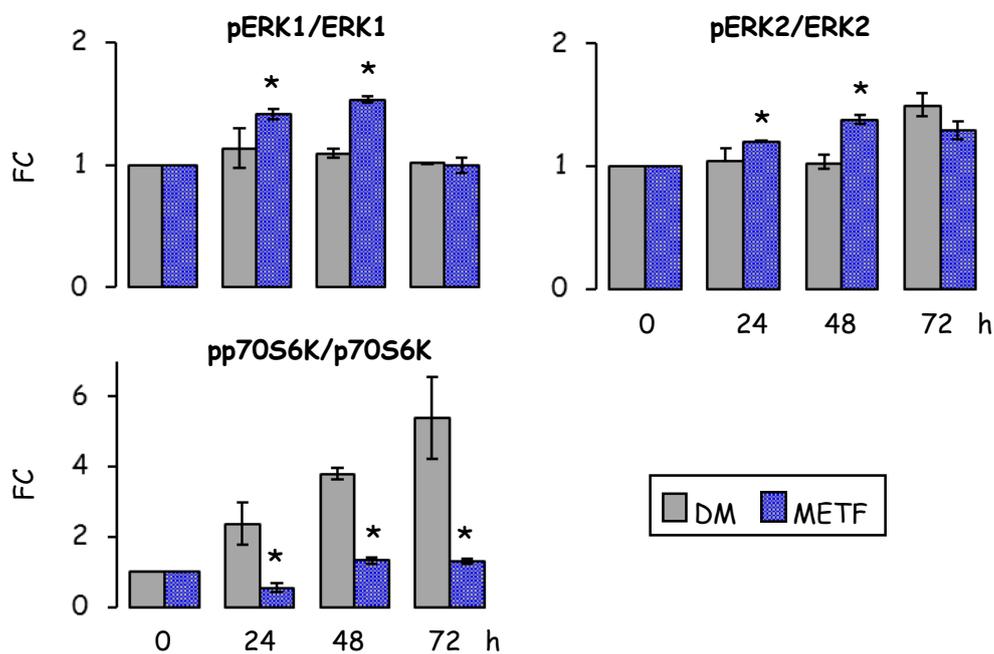


Figura 24 Valutazione dei livelli di attivazione delle chinasi ERKs e p70S6 durante il differenziamento. METF sembra agire attivando la cascata del segnale di ERKs. * $p \leq 0.05$.

4.2.6 Analisi dei cambiamenti morfologici indotti da METF durante il differenziamento

Sono stati eseguiti saggi di immunofluorescenza indiretta specifici per CAMKII, a 48 ore dall'induzione del differenziamento. Come si può osservare dalle immagini di Fig. 25, le cellule METF mostrano un incremento del numero di cellule CAMKII positive suggerendo, anche in vitro, come METF possa influenzare uno dei principali regolatori dell'omeostasi del calcio intracellulare.

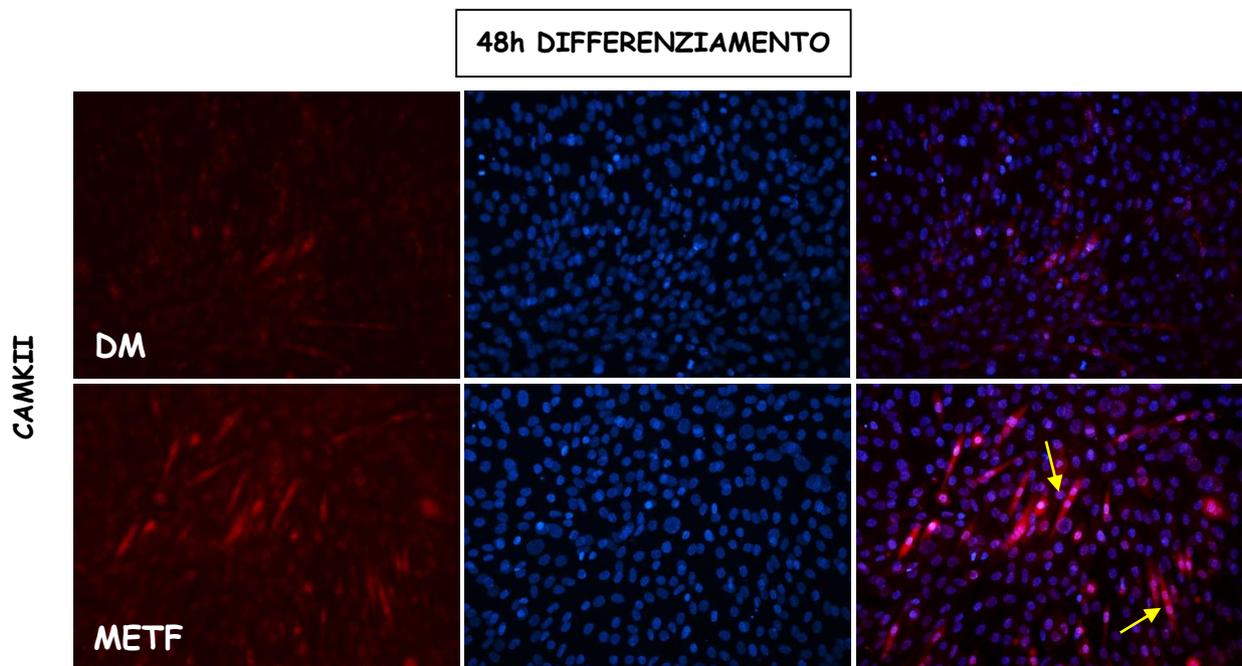


Figura 25 Immunofluorescenza specifica per CAMKII dopo 48h dall'inizio del differenziamento. Il numero di cellule positive per CAMKII è maggiore nella condizione METF rispetto al controllo. Inoltre si nota come le cellule METF positive mostrano parametri dimensionali maggiori. Scale bar 200 μ M.

Inoltre le immagini mostrano l'aspetto morfologico delle cellule stimulate con METF e delle cellule controllo DM. Le cellule METF appaiono più allungate, alcuni neo miotubi sono

caratterizzati da più nuclei disposti longitudinalmente (freccia gialla) e si osservano anche i primi raggruppamenti di neo miotubi.

I risultati ottenuti in Western blot e immunofluorescenza indicano come la METF possa promuovere il differenziamento, evidenza che si può osservare dalle immagini ottenute a fine esperimento in contrasto di fase (Fig. 26).

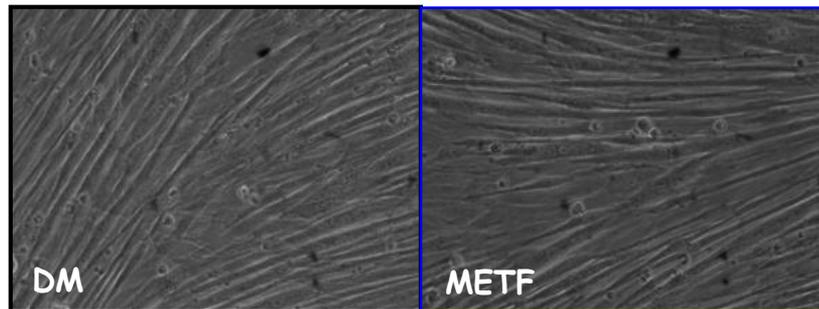


Figura 26 Immagini in contrasto di fase a fine del processo differenziativo. Scale bar 200 μ M.

4.2.7 Studio dell'azione di METF sui miotubi neoformati

Nella parte finale di questo lavoro sono stati studiati gli effetti di un trattamento cronico con METF sui miotubi neoformati. In un precedente lavoro, condotto sempre dal nostro gruppo di ricerca, era già stato osservato come uno stimolo acuto con METF fosse capace di promuovere l'inizio del processo ipertrofico in miotubi neo formati [154]. Come si può osservare nella Fig. 27, la stimolazione prolungata con METF (24h) incrementa significativamente il contenuto proteico di MyHC.

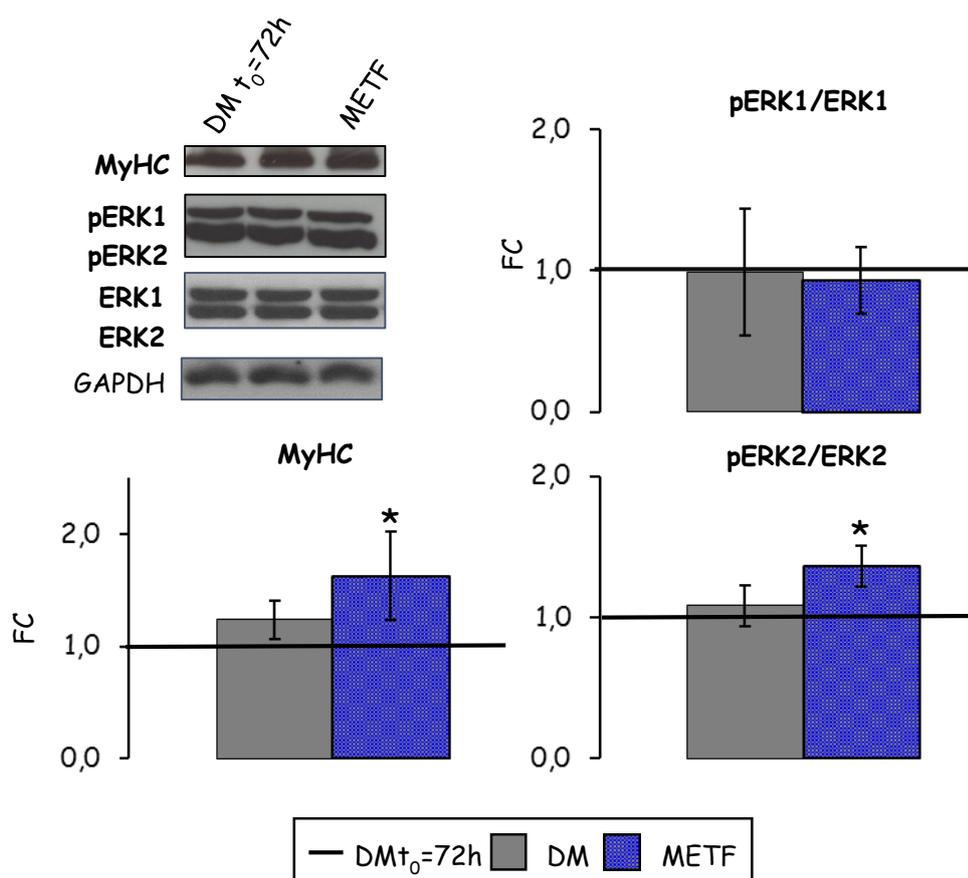


Figura 27 Studio degli effetti sui neo miotubi del trattamento con METF. La METF incrementa il contenuto proteico di MyHC attivando la via del segnale di ERK2. * $p < 0.05$. Sono riportate bande rappresentative delle proteine analizzate.

Anche in questo caso l'azione della METF sembra mediata dall'attivazione della cascata del segnale di ERKs. In particolare, si osserva come l'azione di METF si esplica principalmente a livello della chinasi ERK2, nota dalla letteratura essere centrale nei fenomeni di riarrangiamento citoscheletrico tipici delle fasi terminali del differenziamento [158].

Inoltre, le immagini ottenute in immunofluorescenza eseguita con gli anticorpi specifici per MyHC e N-Caderina evidenziano come i neo miotubi stimolati per 24h con METF mostrano una maggiore lunghezza e diametro rispetto ai neo miotubi mantenuti in DM [Fig. 28].

Queste colorazioni hanno permesso anche di valutare il movimento dei nuclei all'interno dei miotubi di nuova formazione nella fase post-differenziativa. Infatti, la migrazione dei nuclei nella zona centrale del miotubo e la loro disposizione in modo ordinato su più file parallele rappresenta uno dei più noti marker in vitro dell'inizio del processo ipertrofico. In letteratura [160, 161], tale migrazione è accuratamente documentata e considerata un indice di ipertrofia cellulare: i nuclei, a seguito del processo di fusione, sono disposti all'interno del miotubo in posizione non determinata, non sono allineati e sono localizzati contro la membrana plasmatica. L'inizio del processo di ipertrofia invece regola la distribuzione nucleare in maniera precisa: i nuclei migrano nella zona centrale del miotubo e si dispongono in modo ordinato su più file parallele. Nel corso del processo ipertrofico è comune osservare caratteristiche disposizioni circolari dei nuclei, a formare anelli singoli o multipli all'interno dello stesso miotubo. La

presenza di questi anelli circolari è un indicatore comprovato del fenomeno ipertrofico cellulare. Come si evince dall'analisi della Fig. 28, i neo miotubi stimolati con METF sono caratterizzati da queste particolari disposizioni nucleari (frecche gialle).

La METF può, quindi, influenzare il processo di ipertrofia muscolare.

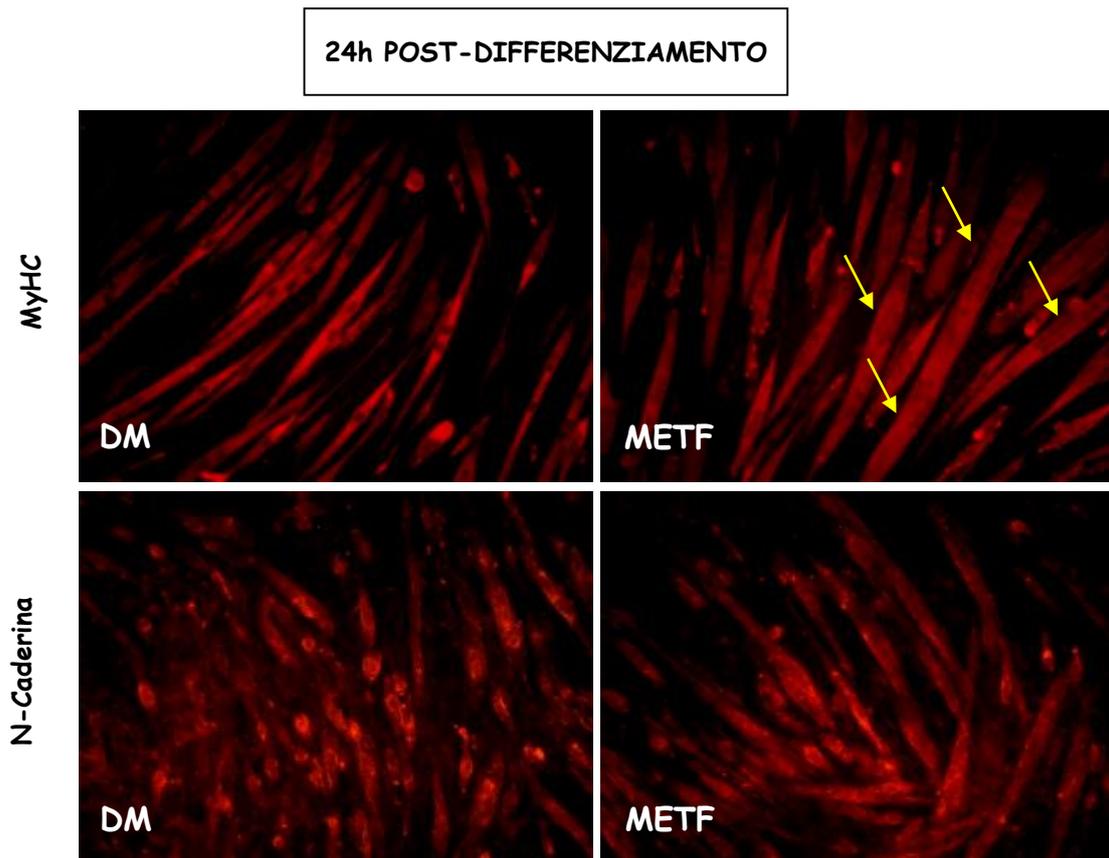


Figura 28 Colorazione specifica per MyHC e N-Cadherina di neo miotubi stimolati con METF per 24h. I neo miotubi METF presentano dimensioni maggiori e una classica disposizione dei nuclei su file parallele, indice in vitro dell'inizio del processo differenziativo. Scala bar 200 μ M.

5. DISCUSSIONE

La sedentarietà ha un ruolo fondamentale nell'insorgenza e nella progressione di patologie riconducibili all' ambiente "obesogenico", caratterizzato da un bilancio positivo tra l'intake energetico e la spesa energetica [4-11].

In questo lavoro, usando un modello murino, si è studiata la possibile azione della METF nel contrastare uno stile di vita caratterizzato dall'assenza di una significativa attività fisica.

I risultati del test submassimale effettuato dopo 60 giorni di somministrazione di METF (Fig. 12) indicano come il farmaco non solo è in grado di prevenire la perdita di funzionalità muscolare ma, anche, di migliorare la performance muscolare. L'analisi dei muscoli gastrocnemio e femorale mostrano come la METF potrebbe agire incrementando il grado di attivazione della chinasi AKT (Fig. 13), molecola chiave nei processi di atrofia e ipertrofia muscolare [106-110].

Confrontando i dati ottenuti in questo studio con i risultati ottenuti da altri gruppi di ricerca che identificano la METF come un farmaco anti-aging, si può speculare che la METF possa, in futuro, essere usata non solo in una particolare sottopopolazione (anziani, obesi, ect), ma in generale in tutte quelle condizioni caratterizzate da perdita di funzionalità muscolare.

Infatti, come suggeriscono i risultati ottenuti in vitro, la METF può favorire la rigenerazione muscolare. E' importante notare come nelle C2C12, la METF non sembra provocare effetti citotossici (Fig. 16): questo aspetto appare rilevante per il possibile uso della METF come farmaco antitumorale [39-42, 70, 162]. La METF potrebbe inibire la crescita delle cellule neoplastiche senza accentuare i processi di cachessia muscolare tipici del paziente oncologico.

La cachessia è una sindrome frequentemente riscontrata nei pazienti con cancro in stadio avanzato, con un impatto rilevante sulla prognosi [163,164]. Infatti, essa è associata a diminuzione della capacità fisica, minore tolleranza ai trattamenti e ridotta sopravvivenza [165]. Oltre il 70 per cento dei pazienti affetti da neoplasia, soprattutto nelle fasi avanzate, sviluppa i segni ed i sintomi della cachessia e circa il 20 per cento muore per le conseguenze di questa sindrome. Nonostante la sua rilevanza clinica, la cachessia non è diagnosticata e trattata in modo efficace e rappresenta, pertanto, una complicanza clinica ancora irrisolta [166]. La cachessia neoplastica è una sindrome multifattoriale, caratterizzata dalla perdita progressiva di massa muscolare (con o senza perdita di massa grassa), che non può essere completamente corretta con un supporto nutrizionale convenzionale. Dal punto di vista fisiopatologico, la cachessia neoplastica è caratterizzata da un bilancio proteico ed energetico negativo, causato sia da un ridotto introito calorico sia da alterazioni metaboliche. L'infiammazione cronica, le alterazioni del metabolismo proteico, lipidico e glucidico sono condizioni frequentemente associate alla cachessia. Come emerge da questa semplice descrizione,

la cachessia neoplastica presenta numerose caratteristiche comuni con il T2DM e quindi appare importante approfondire il possibile uso della METF come farmaco antitumorale e anti cachettico.

Parallelamente i dati ottenuti in vitro indicano che la METF potrebbe non solo contrastare i processi atrofici ma anche promuovere l'ipertrofia muscolare mediante l'attivazione del segnale delle ERKs (Fig. 27). I risultati ottenuti in vitro possono in parte spiegare come, nel nostro modello murino, si osserva un miglioramento della performance fisica. Inoltre, l'azione della METF sembra essere tessuto specifica: a livello epatico la biguanide reprime il segnale delle ERKs.

Questa evidenza rafforza l'ipotesi di un possibile impiego della METF come molecola anti ossidante [40-41]. Numerosi lavori presenti in letteratura hanno dimostrato come la METF, inibendo l'azione del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, decrementa la produzione dei ROS [39,43-44]. I risultati di questo lavoro suggerisco, quindi, come la METF possa anche implementare il contenuto dei principali enzimi coinvolti nella detossicazione delle specie reattive dell'ossigeno (Fig. 23).

Inoltre è stato osservato come la METF regola positivamente l'azione dei fattori di trascrizione delle sirtuine, in particolare di SIRT1 e SIRT3 [176]. Le sirtuine sono enzimi ad attività deacetilase che agiscono rimuovendo residui di lisina da substrati proteici o da istoni in presenza del cofattore NAD⁺. Le sirtuine hanno la capacità di deacetilare, oltre agli istoni, anche fattori di trascrizione con conseguente

interferenza sull'espressione genica [169]. Nella maggior parte dei casi, questi fattori controllano geni legati alla crescita, al ciclo cellulare, all'apoptosi e al metabolismo energetico.

Anche altre molecole, soprattutto di origine nutraceutica, hanno funzioni anti ossidanti simile alla METF (eg, i flavoni quercetina e fisetina e gli stilbeni piceatannolo e resveratrolo) [170, 171]. Sulla base di queste analogia, sono stati condotti alcuni studi che hanno valutato positivamente l'azione sinergica della METF con resveratrolo o quercetina nel miglioramento dell'insulino sensitività [172, 173].

Questi studi gettano le basi per utilizzi futuri finalizzati a sviluppare interventi terapeutici volti ad amplificare gli effetti benefici dei più comuni antiossidanti e della METF, non solo nel trattamento della patologia diabetica.

Ovviamente un limite all'uso della METF è rappresentato dal fatto di non poter essere usata in tutti i soggetti, considerate le sue peculiari caratteristiche antiglicemiche. Ma, come detto in precedenza, sono già conosciute numerose sostanze aventi delle proprietà simili alla METF che possono essere usate per contrastare gli effetti di uno stile di vita sedentario o per amplificare gli effetti positivi dell'esercizio fisico.

In conclusione questo lavoro di ricerca mostra come la METF:

- 1) migliora la performance fisica in giovani topi sani mantenuti in una condizione di sedentarietà;
- 2) promuove la formazione dei miotubi, modulando alcune delle principali vie del segnale coinvolte nei processi di atrofia e ipertrofia muscolare;
- 3) previene lo stress ossidativo mostrando capacità antiossidanti.

Queste osservazioni possono costituire le basi per ulteriori studi atti a comprendere l'azione combinata della METF, attività fisica e dieta nel prevenire i danni della vita sedentaria.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Ginter E and Simko V, "Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century" *Advances in Experimental Medicine and Biology* 771:42-50, 2012.
2. Wilmot E and Idris I "Early onset type 2 diabetes: risk factors, clinical impact and management." *Ther Adv Chronic Dis* 5:234-44, 2014.
3. Roberts CK, Hevener AL and Barnard RJ, "Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training" *Comprehensive Physiology* 3:1-58, 2013.
4. Wilmot EG, Edwardson CL, Achana FA et al., "Sedentary time in adults and the association with diabetes, cardiovascular disease and death: systematic review and meta-analysis" *Diabetologia* 56:942-3, 2013.
5. Siegel LC, Sesso HD, Bowman TS, et al., "Physical activity, body mass index, and diabetes risk in men: a prospective study" *Am J Med* 122:1115-1121, 2009.
6. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, et al., "Diet, lifestyle and risk of type 2 diabetes mellitus in women." *N Engl J Med* 345:790-797, 2001.
7. Kreboukia M, Nassis GP, Psarra G, et al., "Elevated total and central adiposity and low physical activity are associated with insulin resistance in children." *Metabolism* 56:206-213, 2007.
8. Kohl HW, Craig CL, Lambert EV et al., "The pandemic of physical inactivity: global action for public health" 3rd, *Lancet Physical Activity Series Working Group*. *Lancet* 380(9838):294-305, 2012.

9. World Health Organization. Diet and Physical Activity Factsheet. Secondary Diet and Physical Activity Factsheet. 2013.
http://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_inactivity/en/index.html
10. Bauman A, Craig C., "The place of physical activity in the WHO Global Strategy on Diet and physical activity." *Int J Behav Nutr Phys Act* 2:10, 2005.
11. Knight JA., "Physical inactivity: associated diseases and disorders." *Ann Clin Lab Sci* 42(3):320-37, 2012.
12. Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, et al., "Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update." *Circulation* 115:1481-1501, 2007.
13. Djouss'e L, Driver JA, Gaziano JM, "Relation between modifiable lifestyle factors and lifetime risk of heart failure." *JAMA*, 302:394-400, 2009.
14. Morris JN, Heady JA, Raffle PA, et al., "Coronary heart disease and physical activity of work." *Lancet*, 265:1053-1057, 1953.
15. Franco OH, de Laet C, Peeters A, et al., "Effects of physical activity on life expectancy with cardiovascular disease.", *Arch Intern Med* 165:2355-2360, 2005.
16. Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, et al., "Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women." *N Engl J Med* 347:716-725, 2002.

17. Hung C, Daub B, Black B, et al., "Exercise training improves overall physical fitness and quality of life in older women with coronary artery disease." *Chest* 126:1026-1031, 2004.
18. Taylor RS, Brown A, Ebrahim S, et al., "Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." *Am J Med* 2004 116:682-692, 2004.
19. Shephard RJ, Fitcher R., "Physical activity and cancer: how may protection be maximized?" *Crit Rev Oncog* 8:219-272, 1997.
20. Kruk J, Czerniak U., "Physical activity and its relation to cancer risk: updating the evidence." *Asian Pac J Cancer Prev* 14(7):3993-4003, 2013.
21. Isomura K, Konos S, Moore MA, et al., "Physical activity and colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study." *Cancer Sci* 97:1099-1104, 2006.
22. Slattery MJ, Edwards S, Curtin K, et al. "Physical activity and colorectal cancer." *Am J Epidemiol* 158:214-224, 2003.
23. Friedenreich CM, "Physical activity and breast cancer risk: the effect of menopausal status." *Exerc Sport Sci Rev* 32:180-184, 2004.
24. Eyigor S, Kanyilmaz S, "Exercise in patients coping with breast cancer: An overview." *World J Clin Oncol.* 10;5(3):406-11, 2014.
25. Filaire E, Dupuis C, Galvaing G, et al., "Lung cancer: what are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition." *Lung Cancer* 82(3):383-9, 2013.

26. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH, "Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice." *J Neurosci* 25:8680-8695, 2005.
27. Middleton LE, Manini TM, Simonsick EM, et al., "Activity energy expenditure and incident cognitive impairment in older adults." *Arch Intern Med* 171:1251-1257, 2011.
28. Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, et al., "Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease." *JAMA* 302:627-637, 2009.
29. Lazarov O, Robinson J, Psant Y-P, et al., "Environmental enrichment reduces A beta levels and amyloid deposition in transgenic mice." *Cell* 120:701-713, 2005.
30. Rideout CA, McKay HA, Barr SI, "Self-reported lifetime physical activity and areal bone mineral density in healthy postmenopausal women. The importance of teenage activity." *Calcif Tissue Int* 79:214-222. 31, 2005.
31. Rikkonen T, Tuppurainen M, Kroger H, et al., "Distance of walking in childhood and femoral bone density in perimenopausal women." *Eur J Appl Physiol* 97:509-515, 2006.
32. Santilli V, Bernetti A, Mangone M, Paoloni M, "Clinical definition of sarcopenia." *Clin Cases Miner Bone Metab.* 11(3):177-80, 2014.
33. Delmonico MJ, Harris TB, Lee JS, et al., "Alternative definitions of sarcopenia, lower extremity performance, and functional impairment with aging in older men and women. Health, Aging and Body Composition Study.", *J Am Geriatr Soc.*, 55(5):769-74, 2007.

34. Hepple RT, "Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle." *Front Aging Neurosci.* 10;6:211, 2014.
35. Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, et al., "The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61(10):1059-64, 2006.
36. Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL, "Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies." *Nat Rev Drug Discov* 31;14(1):58-74, 2014.
37. Rosa EF, Silva AC, Ihara SS, et al., "Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal, and cardiac muscles against aging." *J Appl Physiol* 99(4):1569-75, 2005.
38. American Diabetes Association, "Standards of medical care in diabetes— 2014." *Diabetes Care* 37 (Suppl 1):S14-S80, 2014.
39. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc, et al., "Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview." *Clin. Sci* 122:253-270, 2012.
40. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, et al., "Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies." *Cell Metab* 20(6):953-966, 2014.
41. Nasri H, Rafieian-Kopaei M, "Metformin: Current knowledge." *J Res Med Sci* 19(7):658-64, 2014.
42. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K, "Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights?" *Diabetologia* 56(9):1898-906, 2013.

43. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, et al., "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." *J. Biol. Chem* 275: 223-228, 2000.
44. Owen MR, Doran E, Halestrap AP, "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." *Biochem. J* 348: 607-614, 2000.
45. Stephenne X, Foretz M, Taleux N, et al., "Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status." *Diabetologia* 54: 3101-3110, 2011.
46. Guigas B, Detaille D, Chauvin C, et al., "Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study." *Biochem J* 382:877-884, 2004.
47. Hirsch A, Hahn D, Kempna P, et al., "Metformin inhibits human androgen production by regulating steroidogenic enzymes HSD3B2 and CYP17A1 and complex I activity of the respiratory chain." *Endocrinology* 153:4354-4366, 2012.
48. Kim KH, Jeong YT, Kim SH, et al., "Metformin-induced inhibition of the mitochondrial respiratory chain increases FGF21 expression via ATF4 activation." *Biochem Biophys Res Commun* 440: 76-81, 2013.
49. Piel S, Ehinger JK, Elme E, et al., "Metformin induces lactate production in peripheral blood mononuclear cells and platelets through specific mitochondrial

complex I inhibition." *Acta Physiol. (Oxf.)* Published online May 6, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1111/apha.12311>.

50. Zhou G, Myers R, Li Y, et al., "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." *J. Clin. Invest* 108:1167-1174, 2001.
51. Hardie DG, "AMPK-Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways." *Cell Metab* 2;20(6):939-952, 2014.
52. Hardie DG, "AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis." *Curr Opin Cell Biol* 23;33C:1-7, 2014.
53. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM, "AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome." *J Clin Invest* 1;123(7):2764-72, 2013.
54. Liu WY, Jiang RS, "Advances in the research of AMPK and its subunit genes." *Pak J Biol Sci* 15;16(22):1459-68, 2013.
55. Shaw RJ, Lamia, KA, Vasquez D, et al., "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin." *Science* 310:1642-1646, 2005.
56. Lee, JM, Seo, WY, Song, KH, et al., "AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB.CRTC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner" *J Biol Chem*, 285:32182-32191, 2010.
57. Caton PW, Nayuni NK, Kieswich J, et al., "Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5.", *J. Endocrinol.*, 205:97-106, 2010.

58. Foretz M, He´ Brard S, Leclerc J, et al., "Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state." *J. Clin Invest*, 120: 2355-2369, 2010.
59. Cao J, Meng S, Chang E, et al., "Low Concentrations of Metformin Suppress Glucose Production in Hepatocytes through AMP-activated Protein Kinase (AMPK)." *J. Biol Chem* 289: 20435-20446.
60. Miller RA, Chu Q, Xie J, et al., "Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP." *Nature* 494: 256-260, 2013.
61. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, et al., "Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase." *Nature* 510: 542-546, 2014.
62. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti, S., Zoli, M., et al "Metformin in non-alcoholic steatohepatitis." *Lancet* 358:893-894, 2001.
63. Woo SL, Xu H, Li H, et al., "Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity." *PLoS ONE* 9:e91111, 2014.
64. Setji TL, Brown AJ, "Polycystic ovary syndrome: update on diagnosis and treatment." *Am J Med* 127(10):912-9, 2014.
65. Johnson NP, "Metformin use in women with polycystic ovary syndrome." *Ann Transl Med* 2(6):56, 2014.

66. Jones RG, Plas DR, Kubek S, et al., "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint." *Mol Cell*, 29;18(3):283-93, 2005.
67. Zhuang Y, Miskimins WK, "Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1." *J Mol Signal*, 1;3:18, 2008.
68. Sarbassov DD, Sabatini DM, "Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex." *J Biol Chem*, 25;280(47):39505-9, 2005.
69. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al., "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." *Mol Cell* 25;30(2):214-26, 2008.
70. Pollak M, "Potential applications for biguanides in oncology." *J. Clin. Invest.* 123: 3693-3700, 2013.
71. Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, Pollak MN., "The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase." *Cancer Prev Res (Phila)* 1(5):369-75, 2008.
72. Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, et al., "Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer." *J Clin Oncol.* 10;27(20):3297-302, 2009
73. Berstein LM, "Metformin in obesity, cancer and aging: addressing controversies" *Aging* 4(5):320-9, 2012.
74. Taormina G, Mirisola MG, "Calorie restriction in mammals and simple model organisms." *Biomed Res Int* 2014:308690, 2014.

75. Rizza W, Veronese N, Fontana L, "What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity?" *Ageing Res Rev* 13:38-45, 2014.
76. Everitt AV, Le Couteur DG, "Life extension by calorie restriction in humans." *Ann N Y Acad Sci* 1114:428-33, 2007.
77. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, et al., "Metformin improves healthspan and lifespan in mice", *Nature Communication*, vol. 4, pp 2192, 2013.
78. Onken B, Driscoll M, "Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1" *PLoS One* vol. e8758, 2010.
79. Rosati P "Istologia", Edi Ermes., 1981.
80. AAVV. "Trattato di anatomia umana", Edi Ermes, 2006.
81. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. "Human skeletal muscle fiber type classification." *Phys Ther* 81(11): 1810-6, 2001.
82. AAVV. "Citologia e istologia funzionale" Edi Ermes., 2005.
83. Dreizen P, "Structure and function of the myofibrillar contractile proteins." *Annu Rev Med.*, 22:365-90, 1971.
84. Stockdale FE, "Myogenic cell lineages." *Dev Biol*, 154(2):284-98, 1992.
85. Spielholz NI., "Skeletal muscle. A review of its development in vivo and in vitro." *Phys Ther*, 62(12):1757-62, 1982.

86. Carozzi AJ, Ikonen E, Lindsay MR, Parton RG. "Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis." *Traffic* 1(4):326-41, 2000.
87. Williams BA, Ordahl CP, "Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification." *Development* 120(4):785-96, 1994.
88. Maione R, Armati P., "Interdependence between muscle differentiation and cell-cycle control" *Biochim Biophys Acta* M19-M30, 1997.
89. Walsh K, Perlman H, "Cell cycle upon myogenic differentiation." *Current opinion in Genetics and Development* 7:597-602, 1997.
90. Perry RL, Rudnick MA, "Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation." *Front Biosci Sep 1; 5:D 750-67*, 2000.
91. Sabourin LA, "The molecular regulation of myogenesis." *Clin Genet* 57:16-25, 2000.
92. Sartorelli V, Caretti G, "Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis" *Curr Opin Genet Dev.* 15(5):528-35, 2005.
93. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB, "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts" *Cell* 51:987-1000, 1987.
94. Wright WE, Sassoon DA, Lin VK, "Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD." *Cell* 56:607-617, 1987.
95. Olson E, Arnold HH, Rigby PWJ, Wold BJ, "Know your neighbours: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene *Mrf4*." *Cell* 85:1-4., 1989.

96. Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH, Jaenisch R, "Targeted inactivation of the muscle regulatory gene *Myf-5* results in abnormal rib development and perinatal death." *Cell* 71:369-382, 1992.
97. Kataoka Y, Matsumura I, Ezoe S, "Reciprocal inhibition between MyoD and STAT3 in the regulation of growth and differentiation of myoblasts." *J Biol Chem.* 278(45):44178-87, 2003.
98. Berkes CA, Tapscott SJ, "MyoD and the transcriptional control of myogenesis." *Semin Cell Dev Biol* 16:585-595, 2005.
99. Thayer MJ, Tapscott SJ, Davis RL, "Positive autoregulation of the myogenic determination gene *MyoD1*." *Cell.* 58(2):241-8, 1989.
100. Spitz F, Demignon J, Porteu A, et al., "Expression of myogenin during embryogenesis is controlled by Six/sine oculis homeoproteins through a conserved MEF3 binding site." *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14220-25, 1998.
101. Potthoff MJ, Olson EN, "MEF2: a central regulator of diverse developmental programs." *Development* 134(23):4131-40, 2007.
102. Kaushal S. "Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD" *Science* 266, 1236-1240, 1994.
103. Fomin M, Nomokonova N, Arnold HH, "Identification of a critical control element directing expression of the muscle-specific transcription factor MRF4 in the mouse embryo." *Dev Biol* 272:498-509, 2004.

104. Bober E, "The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development." *J Cell Biol* 113, 1255-1265, 1991.
105. Bogdanis GC, "Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue." *Front Physiol.* 3:142, 2012.
106. Bassel-Duby R, Olson EN., "Signaling pathways in skeletal muscle remodeling." *Annu Rev Biochem.* 75:19-37, 2006.
107. Blaauw B, Schiaffino S, Reggiani C, "Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr Physiol* 3(4):1645-87, 2014.
108. Glass DJ, "Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy." *Nature Cell Biology* 5(2): 87-90, 2003.
109. Knight JRD, Kothary R, "The myogenic kinome: protein kinases critical to mammalian skeletal myogenesis.", *Skeletal Muscle.* 1:29, 2011.
110. Lai KM, Gonzalez M, Poueymirou WT, "Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy." *Mol Cell Biol* 24(21):9295-304, 2004.
111. Vivanco I, Sawyers CL., "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer.* 2(7):489-501, 2002.
112. Baretic D, Williams RL. "The structural basis for mTOR function." *Semin Cell Dev Biol* 36C:91-101, 2014.
113. Schakman O, Gilson H, Kalista S, Thissen JP "Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids" *Horm Res.* 72 Suppl 1:36-41, 2009.

114. Carlsson P, Mahlapuu M, "Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* 250(1):1-23m, 2002.
115. Wang Y, Zhou Y, Graves DT, "FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation." *Biomed Res Int*. 2014:925350. 2014.
116. Nader GA "Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together." *Int J Biochem Cell Biol* 37(10):1985-96, 2005.
117. Chargé SB, Rudnicki MA, "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." *Physiol Rev* 84(1):209-38, 2004.
118. Scharner J, Zammit PS "The muscle satellite cell at 50: the formative years." *Skelet Muscle* 17;1(1):28, 2011.
119. Hawke TJ, Garry DJ, "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." *J Appl Physiol* 91(2):534-51, 2001.
120. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, "Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?" *J Cell Biol* 2;166(3):347-57, 2004.
121. Buckingham M, "Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes." *C R Biol*. 330(6-7):530-3, 2007.
122. Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA, "Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration." *Cell* 27;113(7):841-52, 2003.

123. Tapscott SJ, Lassar AB, Davis RL, Weintraub H, "5-bromo-2'-deoxyuridine blocks myogenesis by extinguishing expression of MyoD1." *Science* 4;245(4917):532-6, 1999.
124. Rawls A, Wilson-Rawls J, Olson EN, "Genetic regulation of somite formation." *Curr Top Dev Biol* 47:131-5, 2000.
125. Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ, "Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers." *Dev Biol* 164(2):588-603, 1994.
126. Brunetti A, Goldfine ID "Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor." *J Biol Chem* 15;265(11):5960-3, 1990.
127. Rhodes SJ, Konieczny SF, "Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family." *Genes Dev* 3(12B):2050-61, 1999.
128. Goldspink G, "Impairment of IGF-I gene splicing and MGF expression associated with muscle wasting." *Int J Biochem Cell Biol.* 37(10):2012-22, 2005.
129. Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, et al., "Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines." *FASEB J.* 21(7):1393-402, 2007.
130. Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M, "Muscle regeneration: cellular and molecular events." *In Vivo.* 23(5):779-96, 2009.

131. Brzoska E, Ciemerych MA, Przewozniak M, Zimowska M, "Regulation of muscle stem cells activation: the role of growth factors and extracellular matrix." *Vitam Horm* 87:239-76, 2011.
132. Tatsumi R, Liu X, Pulido A, Morales M, et al., "Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor." *Am J Physiol Cell Physiol*. 290(6):C1487-94, 2006.
133. Cornelison DD, Wold BJ, "Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells." *Dev Biol* 191(2):270-83, 1997.
134. Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, et al., "Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration." *Dev Biol* 239(1):79-94, 2001.
135. Lefaucheur JP, Gjata B, Sebille A et al., "Factors inducing mast cell accumulation in skeletal muscle." *Neuropathol Appl Neurobiol*. 22(3):248-55, 1996.
136. Allen RE, Boxhorn LK, "Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor." *J Cell Physiol* 138(2):311-5, 1989.
137. Miska EA, Karlsson C, Langley E et al., "HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor." *EMBO J* 18(18):5099-107, 1999.
138. Bharathy N, Ling BM, Taneja R, "Epigenetic regulation of skeletal muscle development and differentiation." *Subcell Biochem* 61:139-50, 2013.

139. Flück M, Booth FW, Waxham MN et al., "Skeletal muscle CaMKII enriches in nuclei and phosphorylates myogenic factor SRF at multiple sites." *Biochem Biophys Res Commun.* 13;270(2):488-94, 2000.
140. Allen DL, Leinwand LA, "Intracellular calcium and myosin isoform transitions. Calcineurin and calcium-calmodulin kinase pathways regulate preferential activation of the IIa myosin heavy chain promoter." *J Biol Chem* 22;277(47):45323-30, 2002.
141. Guerfali I, Manissolle C, Durieux AC et al., "Calcineurin A and CaMKIV transactivate PGC-1alpha promoter, but differentially regulate cytochrome c promoter in rat skeletal muscle." *Pflugers Arch.* 454(2):297-305, 2007.
142. Nagata Y, Honda Y, Matsuda R, "FGF2 induces ERK phosphorylation through Grb2 and PKC during quiescent myogenic cell activation." *Cell Struct Funct.* 35(1):63-71, 2010.
143. Lassar AB, "The p38 MAPK family, a pushmi-pullyu of skeletal muscle differentiation." *J Cell Biol* 28;187(7):941-3, 2009.
144. Memmott RM, Mercado JR, Maier CR, et al., "Metformin prevents tobacco carcinogen—induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 3, 1066-1076, 2010.
145. Wilcock C, Bailey CJ, "Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse." *Xenobiotica* 24, 49-57, 1994.

146. Algire CL, Zakikhani M, Blouin MJ, et al. "Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth", *Endocrine-Related Cancer* 15(39):833-9, 2008.
147. Calvo JA, Daniels TG, Wang X, et al. "Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake." *The Journal of Applied Physiology* 104:1304-12, 2008.
148. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O, "Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training." *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14(6):753-60, 2007.
149. Burattini S, Ferri P, Battistelli M, et al. "C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: A morpho functional characterization", *European Journal of Histochemistry*, 48(3):223-233, 2004.
150. Sharples AP, Stewart CE, "Myoblast models of skeletal muscle hypertrophy and atrophy." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 14(3):230-6, 2011.
151. Ferri P, Barbieri E, Burattini S, et al., "Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts.", *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(6): 1302-1317, 2009.
152. Senesi P, Luzi L, Montesano A, et al., "Betaine supplement enhances skeletal muscle differentiation in murine myoblasts via IGF-1 signaling activation." *Journal of Translation Medicine* 11(1):174, 2013.

153. Martineau LC, "Large enhancement of skeletal muscle cell glucose uptake and suppression of hepatocyte glucose-6-phosphatase activity by weak uncouplers of oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* 1820(2):133-50, 2012.
154. Terruzzi I, Senesi P, Magni C, et al., "Insulin-mimetic action of conglutin- γ , a lupin seed protein, in mouse myoblasts" *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 21(3):197-205, 2011.
155. Kimball SR, Jefferson LS, "Induction of REDD1 gene expression in the liver in response to endoplasmic reticulum stress is mediated through a PERK, eIF2 α phosphorylation, ATF4-dependent cascade" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 427(3):485-9, 2012.
156. Taulet, Comunale F, Favard C, et al., "N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis." *The Journal of Biological Chemistry* 284(34):23137-23145, 2009.
157. Flynn JM, Melov S, "SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration." *Free Radic Biol Med* 2:4-12, 2013.
158. Li J, Johnson SE, "ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts." *Biochem Biophys Res Commun.* 345(4):1425-33, 2006.
159. Strasser and D. Pesta, "Resistance training for diabetes prevention and therapy: experimental findings and molecular mechanisms", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 805217, Epub 2013 Dec 22, 2013.

160. Chargè S, Rudnicki M, "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." *Physiol. Rev.* 84(1): 209-238, 2004.
161. Folker ES, Schulman VK, Baylies MK. "Muscle length and myonuclear position are independently regulated by distinct Dynein pathways".. *Development* 139(20):3827-37, 2012.
162. Leone A, Di Gennaro E, Bruzzese F, et al., "New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent" *Cancer Treatment and Research* 159:355-76, 2014.
163. Johns N, Stephens NA, Fearon KC, "Muscle wasting in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 Oct;45(10):2215-29.
164. Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, et al., "Cancer cachexia--pathophysiology and management." *J Gastroenterol* 48(5):574-94, 2013.
165. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, et al., "Cancer cachexia: understanding the molecular basis." *Nat Rev Cancer* (11):754-62, 2014.
166. von Haehling S, Anker SD, "Treatment of Cachexia: An Overview of Recent Developments." *J Am Med Dir Assoc.*;15(12):866-872, 2014.
167. Tayek JA, "A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer." *J Am Coll Nutr* 11(4):445-56, 1991.
168. Arunachalam G, Samuel SM, Marei I, et al., "Metformin modulates hyperglycaemia-induced endothelial senescence and apoptosis through SIRT1." *Br J Pharmacol* 171(2):523-35, 2014.

169. Chang HC, Guarente L, "SIRT1 and other sirtuins in metabolism." Trends Endocrinol Metab 25(3):138-45, 2014.
170. Pallauf K, Giller K, Huebbe P, Rimbach G, "Nutrition and healthy ageing: calorie restriction or polyphenol-rich "MediterrAsian" diet?" Oxid Med Cell Longev. 2013:707421, 2013.
171. Montesano A, Luzi L, Senesi P, et al., "Resveratrol promotes myogenesis and hypertrophy in murine myoblasts." Journal of Translation Medicine, 11(1):310, 2013.
172. Bruckbauer A, Zemel MB, "Synergistic effects of metformin, resveratrol, and hydroxymethylbutyrate on insulin sensitivity." Diabetes Metab Syndr Obes. 6:93-102, 2013.
173. Kannappan S, Anuradha CV, "Insulin sensitizing actions of fenugreek seed polyphenols, quercetin & metformin in a rat model." Indian J Med Res. 129(4):401-8, 2009.

Ringraziamenti

Alla fine di questo cammino ci sono tante persone da ringraziare, soprattutto perché questi anni sono stati l'ultima parte di un percorso iniziato alla fine del 2001 quando appena laureata sono entrata a far parte del gruppo del Prof Luzi.

Il primo grazie va al Prof. Luzi, che in questi anni ha guidato la mia crescita professionale con l'esempio di chi si è sempre impegnato per ottenere il massimo da suo lavoro. Il mio grazie va alla Dottoressa Ileana Terruzzi, per avermi dato lo stimolo e la possibilità di costruire insieme a lei qualcosa di nuovo...è stata una fantastica avventura arrivare qui ...partendo da quel "pezzettino" di bancone di quasi 15 anni fa...

Il super mega (bianconero) grazie va alla mia collega Dott.ssa Anna Montesano, che è arrivata a metà di questi anni e che non mi ha fatto sentire più sola...perché lei c'è sempre... per i problemi di "provette" e non solo...e non posso chiedere di più...

E grazie al Dottor Roberto Codella: per le ore passate per e con i nostri topini, per la pazienza ad ascoltarmi quando (troppo spesso) spacco il capello in quattro, per le discussioni anche accese, per l'intelligenza di superarle...

Chi mi conosce bene sa che ogni tanto mi lamento di sentirmi un po' "Fantozzi", ma al di là di tutto so di essere fortunata perché in questi anni tra cellule e provette ho incontrato colleghe che poi sono divenute una parte fondamentale della mia vita:

Grazie a Bea e a Katia per i buongiorno la mattina, anche da Stati diversi, per essere le mie meravigliose, fantastiche, straordinarie super amiche!!senza se e senza ma...

Grazie a Dani...per i preziosi consigli di lavoro, ma soprattutto per le risate, per le lunghe chiacchierate, per il suo grande cuore, per la sua amicizia che mi onora...

Grazie a Rosa per le colazioni, sempre in lotta con il tempo, nel nostro bar di via Pacini, per i suoi "colori" che danno luce alla mia vita...

Grazie a Eli per i nostri caffè, per i nostri incontri "faschion"...

Grazie a tutte le persone del mitico "lottoQ"...da Ema, Isa, Simona ed Alice, a Barbara, Simona e Nunzia...e soprattutto a Silvietta e Gianpaolo...

E ora i grazie personali...grazie alla mia mamma, per tutto il suo appoggio, e alla mia famiglia che per piccina che sia è colma d'amore da fare invidia al mondo....

Grazie alla mia "famiglia milanese-danese"...grazie a Mluisa e Deji, che diverranno danesi, ma avranno sempre cittadinanza onoraria nel mio cuore; a Laura e Massi, a Luisa e Laura Dp, a Manuela e Paola per le serate spensierate, per i super giri per mostre e ristoranti, perché oltre alla mente va nutrito il corpo...per ricordarmi sempre che oltre al planning degli esperimenti c'è il planning dei divertimenti...

Grazie ai miei amici di giù....che mi fanno sentire sempre a casa: grazie Roberta, Walter, Silvia, Paolo, Gianluca, Christian, Simona....grazie anche quando mi inviate le foto del mare sapendo che a Milano piove...

E grazie a Pasqua mia grande "sorella" sarda...

e per finire i due grazie che devono fare il viaggio più lungo:

grazie Dora, grazie per i tuoi occhi neri pieni di vita, per il tuo sorriso, per la tua forza, per essere (non solo con il tuo camice) sempre con me...

grazie Signora Lucia...per gli spigoli del suo carattere, per non avermi mai risparmiato nulla, per avermi sempre spronato a fare meglio e di più...spero di non averla delusa...