

Università degli Studi di Napoli “Federico II”



Dottorato di ricerca

in

“Scienza dell’Alimentazione e della Nutrizione”

XXVI ciclo

“Effetti della somministrazione di latte di vacca, latte di asina e latte umano su efficienza metabolica, stato infiammatorio e microbiota intestinale”

Coordinatore

Ch.mo Prof. Franco Contaldo

Docente tutore

Dott.ssa Maria Pina Mollica

Candidata

Dott.ssa Giovanna Trinchese

INDICE

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1. IL LATTE.....	7
1.1 Composizione	7
1.1.1 Glucidi	8
1.1.2 Sostanze azotate.....	9
1.1.3 Frazione lipidica	9
1.1.4 Acidi grassi	10
1.1.5 Sali minerali.....	12
1.1.6 Enzimi.....	12
1.1.7 Vitamine.....	13
1.2 Il latte di vacca	14
1.3 Il latte di asina	16
1.4 Il latte umano	20
1.4.1 Gli oligosaccaridi del latte umano	21
CAPITOLO 2. NUTRIZIONE E METABOLISMO	23
2.1 Bilancio energetico ed efficienza metabolica	23
2.2 Tessuto adiposo, disfunzioni metaboliche ed infiammazione	25
2.3 Omeostasi energetica e microbiota intestinale	26
CAPITOLO 3. I MITOCONDRI.....	28
3.1 Funzione dei mitocondri nella cellula	28
3.2 Mitocondri e radicali liberi	35
3.3 β-ossidazione mitocondriale.....	39

CAPITOLO 4. LA FLORA BATTERICA INTESTINALE	41
4.1 Genesi della microflora	42
4.2 Distribuzione della microflora nel tratto intestinale dell'adulto	44
4.3 Analisi del microbiota intestinale	45
4.3.1 Sequencing.....	46
4.4 Funzioni della microflora	46
4.5 Omeostasi metabolica e flora batterica intestinale	49
CAPITOLO 5. SCOPO DELLA TESI	52
CAPITOLO 6. PARTE SPERIMENTALE	54
6.1 Misura del bilancio energetico	56
6.2 Misure dei contenuti energetici – La bomba calorimetrica	57
6.3 Misure della composizione corporea	57
6.4 Determinazione dei livelli plasmatici di glucosio, insulina e dell'indice Homa	58
6.5 Determinazione dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi, ALT	58
6.6 Determinazione dei livelli serici di TNF-α, MCP-1, IL-1α, IL-10 e LPS	59
6.7 Analisi delle proteine mediante Western Blot	59
6.8 Determinazione del contenuto epatico di lipidi	61
6.9 Preparazione dei mitocondri	61
6.10 Dosaggio proteico	62
6.11 Determinazione della massa proteica mitocondriale	62
6.12 Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati	63
6.13 Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati	64
6.14 Misura della conduttanza protonica basale	65
6.15 Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi	66
6.16 Determinazione dell'attività totale della Carnitina-Palmitoil-Transferasi	66
6.17 Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale	67
6.18 Determinazione del rilascio mitocondriale di H₂O₂	67
6.19 Misurazione del GSH	68
6.20 Attività della glutatione-S-transferasi (GST)	68
6.21 Attività della NADPH-chinone ossido reduttasi (NQO1)	69

6.22 Analisi del microbiota intestinale	70
6.23 Analisi statistiche	71
CAPITOLO 7. RISULTATI	72
CAPITOLO 8. DISCUSSIONE	92
BIBLIOGRAFIA	98

INTRODUZIONE

La nutrizione è vitale per tutti gli esseri viventi. L'elaborazione dei requisiti per un'adeguata nutrizione negli organismi viventi, particolarmente nei mammiferi, è stata sviluppata nel corso degli anni. Oggi sono disponibili numerose linee guida che enumerano le sostanze nutritive e le quantità necessarie per promuovere una corretta crescita e un efficace stato di benessere. Questi requisiti vengono costantemente aggiornati e perfezionati, con particolare attenzione rivolta verso alcune fasce d'età, come quelle pediatriche e geriatriche, che necessitano di esigenze possibilmente differenti dalla norma. La nutrizione è un settore in continua espansione. Decine di anni fa, la scienza della nutrizione era principalmente concentrata sullo stato di carenza nutrizionale. Questi studi hanno enormemente contribuito alle nostre attuali conoscenze circa i componenti essenziali di base nella dieta e alle conseguenze delle singole carenze. Più di recente, l'interesse dei ricercatori è stato rivolto alle complicità correlate alla nutrizione: tossicità, anomalie metaboliche, ecc. I confini della nutrizione sono stati così ampliati fino ad includere tutte le forme di disturbi alimentari che influenzano l'organismo direttamente o indirettamente.

L'uomo è consapevole del fatto che una corretta alimentazione è di notevole influenza per la sua sopravvivenza. Squilibri nella nutrizione, esogeni o endogeni, possono essere coinvolti nell'insorgenza di molte patologie, che vanno dalle malattie metaboliche, come diabete e obesità, alle patologie "killer" quali il cancro e le malattie cardiovascolari. La recente rinascita dell'interesse e della consapevolezza dell'alimentazione in relazione a stati di malattia, sia da parte di scienziati che da parte della popolazione in generale, ha portato ad espandere l'ambito della ricerca scientifica verso nuove ed importanti direzioni.

Recentemente, particolare interesse è stato rivolto alla nutrizione in grado di svolgere un ruolo preventivo fondamentale non solo nelle diverse età della crescita ma sin dall'epoca prenatale. Studi epidemiologici supportano l'ipotesi dell'esistenza di una forte correlazione tra lo stato nutrizionale nella fase prenatale e postnatale e il rischio di sviluppare patologie metaboliche ed infiammatorie in età adulta dimostrando che la regolazione del genoma, in termini di programmazione metabolica, è ampiamente modificata dal comportamento nutrizionale. Dunque, l'importanza di condurre scelte alimentari consapevoli già nei primi mesi di vita assume sempre maggiore rilievo.

Uno dei primi interventi maggiormente incoraggiato è l'allattamento al seno. Esso è associato ad un miglior sviluppo cognitivo e conferisce un effetto protettivo a lungo termine sul rischio di

insorgenza di obesità, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari. Il latte umano è la prima e migliore fonte alimentare nell'infanzia. Essa assicura per la crescita e lo sviluppo sano del neonato, perché contiene una vasta gamma di composti benefici per la salute compresi gli oligosaccaridi del latte umano (HMO), nucleotidi, immunoglobuline, citochine, cellule immunitarie, lisozima, lattoferrina, fattori di crescita, e altri fattori immunomodulanti. I grassi in esso contenuti forniscono energia per la crescita, soddisfano l'assunzione degli acidi grassi essenziali ed assicurano un adeguato assorbimento delle vitamine liposolubili necessarie per una crescita e uno sviluppo sano.

D'altra parte, nei primi mesi di vita la disponibilità del latte materno non sempre è garantita lasciando spazio all'utilizzo di prodotti sostitutivi; inoltre, soprattutto nelle società occidentali, l'uomo continua a consumare oltre l'infanzia latte di altre specie animali come prodotto alimentare e il suo crescente consumo ha sollevato non poche preoccupazioni.

La gestione nutrizionale degli animali e i differenti fattori ecologici, evolutivisti e genetici influenzano la composizione e le proprietà nutritive del latte derivante da diverse specie.

Il latte di vacca contribuisce per circa l'85% alla produzione totale mondiale di latte. Tuttavia, un'insufficiente palatabilità, risposte immunitarie sfavorevoli e intolleranze intestinali continuano a limitare la preferenza del latte vaccino per determinati gruppi di persone. Inoltre, il ruolo svolto dall'elevata assunzione di acidi grassi saturi sullo sviluppo di diverse patologie umane resta controverso. Di conseguenza, la ricerca si è concentrata sulla descrizione biochimica e la capacità nutrizionale del latte di altre specie meno conosciute allo scopo di utilizzarlo come potenziale sostituto del latte bovino.

Negli ultimi anni c'è stato un crescente interesse verso il latte d'asina e numerosi studi hanno enfatizzato le sue proprietà benefiche sulla salute umana. Emergono, infatti, conoscenze che oltre a rimarcare il valore nutritivo del latte di asina molto vicino al latte di donna, evidenziano aspetti di grande significato funzionale e addirittura di prevenzione per molte patologie umane. Il suo notevole valore nutrizionale e le eccellenti proprietà probiotiche, accoppiati ad una ridotta allergenicità e ad un'ottima palatabilità, rendono il latte di asina uno dei migliori sostituti per neonati quando il latte umano non è disponibile e la somministrazione di latte di vacca è controindicata.

Alla luce di questo ampio panorama scientifico rivolto alle possibili relazioni tra nutrizione, resistenza alle malattie nella prima infanzia ed insorgenza di patologie metaboliche ed infiammatorie nell'età adulta, l'obiettivo di questo progetto di ricerca fonda sull'esigenza di

evidenziare e confrontare gli eventuali cambiamenti nella regolazione del bilancio energetico, del metabolismo lipidico e glucidico e dello stato infiammatorio in ratti trattati con un'iso-energetica quantità di latte di vacca, latte di asina e latte umano.

In aggiunta, particolare attenzione è stata recentemente rivolta agli effetti di diete specifiche su modificazioni della flora batterica intestinale ed è ormai un dato acquisito che un'interazione tra fattori dietetici, metabolismo lipidico, microbiota intestinale e sistema immunitario innato, potrebbe essere coinvolta nell'induzione di uno squilibrio metabolico, coinvolgendo la funzione di barriera e la risposta infiammatoria della mucosa intestinale. Inoltre, la traslocazione di batteri e antigeni batterici nell'ospite, mediante il sistema immunitario innato, verso tessuti metabolicamente attivi, può portare ad uno stato infiammatorio cronico e conseguentemente a compromesse funzioni metaboliche come insulino resistenza ed eccessivo accumulo adiposo tramite una comunicazione diretta tra cellule infiammatorie e metaboliche. Dunque, un ulteriore obiettivo di questa tesi è stato quello di analizzare presumibili differenze nella composizione della flora batterica intestinale degli animali differentemente trattati, integrando i rapporti tra approcci nutrizionali e metabolismo con il probabile ruolo svolto dal microbiota intestinale nello sviluppo dell'infiammazione e dei disturbi metabolici associati all'obesità.

CAPITOLO 1

IL LATTE

Uno dei primi alimenti dell'uomo della preistoria, dopo i prodotti della pesca e della carne, fu il latte ottenuto dagli animali ormai addomesticati che facevano parte del nucleo tribale; infatti è certo che già nell'età della pietra l'uomo allevava capre, pecore e vacche. Secondo la legge italiana per ogni specie di lattifere può essere adottata la seguente definizione di latte. Il latte è il prodotto della mungitura regolare, completa ed ininterrotta di animali in buono stato di salute, di alimentazione e in corretta lattazione. In questa definizione sono sinteticamente riportati i fattori che possono influire sui contenuti del latte che, almeno in termini quantitativi e in funzione, soprattutto, delle capacità produttive dei diversi animali, differiscono da specie a specie¹.

Component	Cow	Goats	Camel	Donkey	Mare	Human
Fat, g	40	45	45	11	13	40
Protein, g	34	38	35	17	21	19
Lactose, g	48	47	44	66	64	65
Minerals, g	7	8	7	4	4	2
Solids-non-fat, g	90	90	86	92	93	73
Total solids, g	133	135	128	102	105	121
Cholesterol, mg	140	100	370	22	45	200
Calcium, mg	1200	1000	1430	680	890	320
Phosphorus, mg	930	1110	1160	500	560	140
Saturated FA, g	24	23	24	4	4	18
Monounsaturated FA, g	11	8	14	2	3	16
Polyunsaturated FA, g	1	1	5	4	5	5

Note: FA = fatty acids.

Composizione media del latte di diverse specie (per 1 Kg di latte).

1.1 Composizione

Il latte sostanzialmente è costituito da 3 fasi in equilibrio tra loro:

- soluzione di lattosio, sostanze azotate non proteiche, sali minerali e vitamine idrosolubili;
- emulsione di lipidi e vitamine liposolubili;
- sospensione colloidale di caseina, proteine globulari e lipoproteine

Queste componenti “passano” nel latte attraverso due differenti sistemi:

- tramite sintesi (da precursori ematici modificati nella ghiandola mammaria), come ad esempio il lattosio, non specie-specifico, proteine e lipidi specie-specifici.
- tramite filtrazione (direttamente dal plasma sanguigno), come acqua, urea, vitamine, sodio, cloruri e sali solubili, non specie-specifici, e siero-albumina, immunoglobuline (IgG, IgM), plasminogeno e lisozima. Infine residui di farmaci, aflatossine, metalli pesanti, pesticidi, etc. passano nel latte attraverso la mammella.

1.1.1 Glucidi

La componente glucidica è rappresentata in massima parte da lattosio che è lo zucchero specifico del latte. Sono presenti in minori quantità altri glucidi: glucosammina, N-acetilglucosammina, galattosammina, N-acetilgalattosammina e acido sialico in genere coniugati a proteine (glicoproteine), come la k-caseina, differente dalle caseine calcio sensibili ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e β) per la sua solubilità su una vasta gamma di concentrazioni di calcio e il suo basso contenuto di fosforo. Il tenore di glucidi del latte è piuttosto costante nell'ambito di ogni specie; tra specie diverse invece si riconoscono importanti differenze. In generale sembra esserci una relazione inversa tra tenore proteico del latte e tenore in glucidi. Poiché, come si vedrà, il tenore proteico del latte tende ad essere più elevato in quelle specie che sono caratterizzate da rapida crescita dei giovani soggetti dopo la nascita, il tenore glucidico, al contrario, è più alto nel latte di specie a crescita lenta (ad esempio, l'uomo).

Il lattosio rappresenta il 98% circa degli zuccheri presenti nel latte, è un disaccaride costituito da una molecola di glucosio e da una di galattosio unite tramite legame $\beta(1-4)$ ed è il principale responsabile del tipico sapore dolciastro del latte. Esso viene sintetizzato nelle cellule secernenti a partire da glucosio ematico grazie a due proteine, la galattosiltransferasi e l'alfa-lattoalbumina. Diverse ipotesi sono state avanzate per spiegare la presenza nel latte di lattosio al posto di altri zuccheri. Secondo una di queste ipotesi il lattosio sarebbe utile come fonte di galattosio per il neonato in quanto è impiegata nella sintesi dei galattolipidi e in particolare dei galattocerebrosidi del sistema nervoso. Nei casi di esclusione totale del lattosio dalla dieta, per intolleranza congenita, si sono infatti riscontrate anomalie della sintesi dei galattocerebrosidi.

Il lattosio ingerito con il latte viene digerito nel digiuno ad opera della betagalattosidasi, un enzima secreto dall'intestino, che libera glucosio e galattosio. Il momento di massima attività della beta-galattosidasi nei mammiferi coincide con la nascita; successivamente si assiste ad un declino della sua attività che si assesta, dopo lo svezzamento, intorno al 10% dell'attività iniziale. Questa diminuzione si verifica in tutte le specie di mammiferi anche se con modalità e

secondo meccanismi differenti. Le popolazioni umane di ceppo europeo rappresentano un'eccezione in quanto gran parte degli individui sono in grado di mantenere anche da adulti un'attività lattasica intestinale elevata. Tuttavia, alcuni soggetti presentano una produzione di beta-galattosidasi insufficiente e questa carenza può determinare un quadro sintomatico che prende il nome di intolleranza al lattosio.

1.1.2 Sostanze azotate

Generalmente il tenore proteico del latte di una specie è in relazione con la velocità di crescita dei neonati: più la velocità di crescita è elevata più il tenore proteico del latte è alto. I valori più bassi si trovano nella specie umana (1% circa) mentre i valori più elevati si trovano nel latte dei mammiferi marini (11%). Le sostanze azotate presenti nel latte sono composte per circa il 95% da proteine, a loro volta costituite da caseine e siero proteine. Le caseine (proteine sintetizzate direttamente dalle cellule della ghiandola mammaria) sono costituite da diverse frazioni, tre sono fosfoproteine (α_1 , α_2 e β) ed una (k-caseina) è una glicoproteina. Esse sono organizzate in micelle all'interno delle quali si trovano le fosfoproteine e, all'esterno, la k-caseina; quest'ultima, proprio per la presenza dello zucchero ad essa coniugato, ha caratteristiche polari e può pertanto coordinarsi con l'acqua consentendo all'intera micella la dispersione in essa. Le micelle hanno un diametro variabile tra 20 e 600 nm, in particolare, quelle del latte bovino hanno un diametro che si aggira intorno ai 200 nm. Nel latte umano le micelle hanno un diametro inferiore e questo rende la caseina umana più digeribile. All'interno della micella caseinica, le submicelle sono tenute insieme e stabilizzate da legami ionici con Ca e P. Le siero proteine possiedono un minor peso molecolare rispetto alle caseine e si dividono in albumine (a loro volta classificate in β -lattoglobulina, α -lattoalbumina, sieralbumina) e globuline (comprendenti le immunoglobuline); sono di elevatissimo valore nutrizionale e biologico, carrier di molti nutrienti ma spesso chimicamente delicate e in vario grado termolabili. Il restante 5% è costituito da sostanze azotate non proteiche (urea, aminoacidi liberi, ammoniaca).

1.1.3 Frazione lipidica

La componente lipidica del latte è particolarmente interessante per le molteplici proprietà nutrizionali e nutraceutiche che vengono esercitate dalle numerose molecole lipidiche che la costituiscono. I lipidi si presentano sottoforma di globuli di diametro oscillante tra 1 e 10 μm . Nei tipi di latte ricchi di grasso i globuli tendono ad avere grosse dimensioni. A mantenere i globuli di grasso in stato di emulsione è la così detta membrana costituita da lipoproteine,

fosfolipidi, colesterolo ed i suoi esteri, acidi grassi liberi, carotenoidi, vitamine liposolubili (A, D, E, K). Più del 95% dei grassi del latte è costituito da trigliceridi (posti all'interno del globulo di grasso), formati da una molecola di glicerolo cui si legano tre acidi grassi mediante un legame chimico detto estere. I costituenti primari del grasso del latte sono, dunque, gli acidi grassi e alla loro composizione sono legate molte delle caratteristiche nutrizionali del latte stesso, essi verranno pertanto descritti nel dettaglio.

1.1.4 Acidi grassi

Gli acidi grassi, componenti fondamentali dei lipidi, sono molecole costituite da una catena di atomi di carbonio, denominata catena alifatica, con un solo gruppo carbossilico (-COOH) ad una estremità. La catena alifatica che li costituisce è tendenzialmente lineare e solo in rari casi si presenta in forma ramificata o ciclica. La lunghezza di questa catena è estremamente importante, in quanto influenza le caratteristiche fisico-chimiche dell'acido grasso. Quindi potremmo classificarli, a seconda della lunghezza della catena carboniosa, in:

- acidi grassi a corta catena (SCFA) fino a 4 atomi di carbonio di cui il principale rappresentante è l'acido butirrico (4:0) il cui ruolo trofico e protettivo a livello della mucosa del colon è di fondamentale importanza.
- acidi grassi a media catena (MCFA) fino a 12 atomi di carbonio con funzione metabolica ed energetica i cui principali rappresentanti sono: acido caproico (6:0), acido caprilico (8:0), acido caprico (10:0) e acido laurico (12:0).
- acidi grassi a lunga catena (LCFA) fino a 18 atomi di carbonio con un ruolo energetico, metabolico e strutturale come acido palmitico (18:0).
- acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA) da 20 atomi di carbonio in poi.

Gli acidi grassi a corta e media catena sono privi di potere aterogeno. Essi vengono direttamente assorbiti nel sangue andando a rifornire il fegato e non contribuendo perciò all'aumento della concentrazione di lipoproteine nel sangue o alla deposizione del tessuto adiposo². Gli acidi grassi possiedono generalmente un numero pari di atomi di carbonio e possono presentare anche uno o più doppi legami nella catena alifatica. La presenza o meno di doppi legami fa variare la temperatura di fusione degli acidi grassi stessi, essi possono essere classificati in:

- acidi grassi *saturi* quando la loro struttura chimica presenta tutti legami semplici. (es: acido caprilico C8:0, acido palmitico C16:0, acido stearico C18:0)
- acidi grassi *insaturi* quando sono presenti uno o più doppi legami: monoinsaturi (MUFA) quando presentano un unico doppio legame e polinsaturi (PUFA) se ne presentano più di

uno. (es: acido oleico C18:1, acido linoleico C18:2, acido linolenico C18:3, acido arachidonico C20:4).

Gli acidi grassi saturi presentano potere aterogeno variabile: i più pericolosi sono il palmitico (C16:0), il miristico (C14:0) ed il laurico (C12:0). L'apporto giornaliero consigliato di acidi grassi saturi deve essere compreso tra il 7 e il 10% delle calorie totali.

Negli alimenti gli acidi grassi insaturi sono presenti prevalentemente in forma "cis"; tuttavia, nei prodotti derivati da processi chimici di idrogenazione per rendere solidi gli oli vegetali e nella carne e nel latte dei ruminanti (grazie alla trasformazione ad opera di specifici batteri presenti nel rumine) esiste una percentuale di acidi grassi insaturi in forma trans. Siccome i doppi legami trans rendono la catena più rigida degli acidi grassi con insaturazioni cis, le loro proprietà fisiche si avvicinano a quelle degli acidi grassi saturi.

L'apporto giornaliero di acidi grassi monoinsaturi è consigliato fino a ricoprire il 20% del fabbisogno calorico totale. I più diffusi acidi grassi monoinsaturi in natura sono l'acido oleico e l'acido palmitoleico. L'apporto calorico giornaliero in acidi grassi polinsaturi deve rappresentare circa il 7% delle calorie totali. I più importanti acidi grassi polinsaturi di interesse alimentare sono senza dubbio gli acidi grassi essenziali: omega-3 ed omega-6. Vengono indicati come acidi grassi essenziali in quanto il nostro organismo non è in grado di sintetizzarli e devono essere necessariamente assunti con la dieta. Essi differiscono per la posizione del primo doppio legame a partire dal metile terminale:

- gli **omega-3** (o n-3) hanno il primo doppio legame in corrispondenza del terzo atomo di carbonio lungo la catena dell'acido grasso e derivano principalmente dall'acido α -linolenico
- gli **omega-6** (o n-6) hanno il primo doppio legame in corrispondenza del sesto atomo di carbonio lungo la catena dell'acido grasso e derivano principalmente dall'acido linoleico.

Il rapporto ideale omega-6/omega-3 da assumere con la dieta è intorno al valore di 4-5:1. Gli omega-6, pur esercitando numerose funzioni essenziali, possono diventare dannosi se introdotti in eccesso rispetto agli omega-3, provocando l'aumento del rischio cardiovascolare mediante l'aumento delle reazioni infiammatorie, della pressione sanguigna, dell'aggregazione piastrinica. D'altro canto, gli effetti benefici esercitati dagli omega-3 sono una realtà ampiamente dimostrata e consolidata. I principali rappresentanti degli omega-3 sono l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA). Il DHA si trova prevalentemente nella composizione lipidica della membrana cellulare; esso è fondamentale per la composizione dei lipidi del cervello e dei fosfolipidi delle membrane sinaptiche, implicate nella trasmissione dell'impulso nervoso³; infatti, la presenza di adeguate quantità di DHA nel latte materno è ritenuta fondamentale per

uno sviluppo ottimale del cervello del bambino. Simili funzioni sono rivestite anche a livello della retina e del tessuto nervoso⁴. Poiché gli omega-3 giocano un ruolo importante nelle funzioni visive e cognitive, diventa di particolare importanza assumerne in maniera adeguata in fase di gravidanza e allattamento. Nel caso in cui non sia possibile l'allattamento al seno, le società di nutrizione raccomandano di includere EPA e DHA nella formula del latte artificiale⁵. Gli acidi grassi omega-3 svolgono un ruolo importante anche nell'apparato riproduttivo, infatti la diminuzione di DHA negli spermatozoi può essere associata con l'infertilità⁶; in aggiunta, supplementazioni con DHA in donne in gravidanza sono correlate ad un maggiore peso e lunghezza del bambino al momento della nascita⁷⁻⁸. L'assunzione di omega-3 può anche avere un effetto antinvecchiamento, infatti, tali acidi grassi stimolano l'espressione dei geni del collagene e delle proteine delle fibre elastiche⁹, migliorando l'aspetto della pelle. Gli omega-3, inoltre, modulano la risposta infiammatoria, risultando di valido aiuto in numerose patologie (disturbi articolari, asma, sindrome del colon irritabile).

1.1.5 Sali minerali

I sali minerali o sostanze saline presenti nel latte rappresentano circa l'1% della sostanza secca. Tra loro, quelli presenti in concentrazione elevata vengono definiti macroelementi, quelli presenti in tracce vengono definiti microelementi. Tra i macroelementi troviamo: calcio, magnesio, sodio, potassio, fosforo e sali. Tra i microelementi troviamo ferro, iodio, selenio, bromo, fluoro, arsenico, zinco, piombo. Il calcio è presente sotto forma di fosfato organico e, pertanto, è facilmente disponibile per l'assorbimento. Il calcio e il fosforo sono molto importanti dal punto di vista nutritivo, infatti in virtù del loro rapporto superiore all'unità fanno del latte un alimento d'elezione per gli individui di tutte le età, in quanto favoriscono una buona mineralizzazione dello scheletro. Il tenore in sostanze minerali varia notevolmente a seconda della razza, dell'età, dello stato di salute e dello stadio di lattazione.

1.1.6 Enzimi

Gli enzimi sono oltre 60 e di varia origine, ma solo un terzo ha provenienza endogena. Molti enzimi si trovano sulle membrane dei globuli di grasso mentre altri sono elaborati dalle cellule che si trovano nel latte (batteri, leucociti). Alcuni di essi hanno un'importante funzione antibatterica (lattoferrina, lattoperossidasi, lisozima), altri attaccano i costituenti del latte e possono determinare perciò variazioni delle caratteristiche tecnologiche dello stesso (lipasi, proteasi). In particolare, il *lisozima* è una sostanza enzimatica ad azione batteriolitica che scinde i legami glucosidici $\beta(1-4)$ fra l'acido N-acetilmuramico e l'acido N-acetilglucosamina, propri dei

mucopolisaccaridi costituenti della parete batterica determinandone la dissoluzione. Inibisce la crescita di molti batteri, in particolare dei Gram-positivi. La lattoferrina, detta anche lattotransferrina, è una glicoproteina di 80 kDa che appartiene alla famiglia delle transferrine, con due siti di legame per lo ione ferrico. E' una proteina che svolge diverse funzioni, tra cui la regolazione dell'omeostasi del ferro, crescita e differenziamento cellulare, difesa contro agenti infettivi, attività antinfiammatoria, protezione contro il cancro ed, infine, svolge un'attività trofica sulla mucosa intestinale¹⁰. E' presente principalmente nel latte, ed in piccole quantità anche nei fluidi esocri come la saliva, le lacrime, la bile, il liquido seminale ed il succo pancreatico. L'attività antimicrobica della lattoferrina è correlata alla sua affinità per il ferro e ad un' azione diretta sulla membrana esterna dei batteri Gram negativi. La combinazione della lattoferrina con lo ione ferrico nelle secrezioni mucose modula l'attività e le capacità aggregative dei batteri e dei virus verso le membrane cellulari. Questo perché alcuni batteri richiedono ferro per poter effettuare la replicazione cellulare e la lattoferrina, al contrario, lo sottrae dall'ambiente circostante, impedendone la proliferazione.

1.1.7 Vitamine

Altre componenti del latte di estrema importanza sono le vitamine, bioregolatori presenti in gran quantità nel latte appena munto ma danneggiati in varia misura dai processi termici. Esse si suddividono in liposolubili (A, D, E, K,) e idrosolubili (vitamine del gruppo B, C, H, colina e inositolo). Tra le vitamine idrosolubili si trovano in quantità significativa alcuni dei principi del complesso B, quali la B2 (riboflavina o lattoflavina), la vitamina H (biotina), la vitamina PP (Niacina), l'acido pantotenico e l'acido ascorbico (vitamina C).

Non di minore importanza sono le componenti extranutrizionali; ne fanno parte tutti quei componenti naturali che, per capacità proprie o per trasformazione a livello digestivo di alcuni componenti, manifestano un'azione fisio-farmacologica. Ricordiamo:

- gli anticorpi, ad azione antinfettiva;
- fattori di crescita (prolattina, transforming growth factor [TGF], insulin-like growth factor [IGF]);
- caseomorfine e lattorfine, assorbite nell'intestino, hanno un'azione oppioidi-simile: narcotica, analgesica, calmante sui sistemi respiratori, cardiovascolare, nervoso centrale e periferico; rallentano il transito nel lume intestinale e favoriscono il riassorbimento di acqua ed elettroliti, in caso di sindromi diarroidiche.

1.2 Il latte di vacca

Per legge il termine generico "latte" indica quello di vacca (*Bos taurus*), mentre per il latte di diversa provenienza è necessario specificarne l'origine. Dal punto di vista chimico-fisico il latte bovino, dunque, non differisce dalla composizione descritta genericamente nel paragrafo precedente, di seguito saranno riportate solo alcune specifiche peculiarità che lo distinguono da quello delle altre specie considerate in questo lavoro.

Il latte bovino è composto da acqua (87.5%), zuccheri (4.9%), grassi (3.6%), sostanze azotate (3.4%) sali minerali (0.8%) ed altri costituenti minori (vitamine, enzimi). Nel latte di vacca la percentuale di lattosio è del 5% circa; esso viene sintetizzato nelle cellule secernenti della mammella a partire da glucosio ematico. Nei ruminanti il principale precursore del glucosio ematico è l'acido propionico, uno degli acidi grassi volatili che si formano in sede ruminale.

Il tasso proteico del latte di vacca si aggira intorno al 3,2%; esso è variabile in funzione di molti fattori tra i quali la razza, il corredo genetico individuale, lo stadio di lattazione, il numero di lattazione, le caratteristiche della razione, lo stato sanitario della mammella, la stagione. Inoltre tra le diverse specie di mammiferi esistono importanti differenze per quanto attiene al tenore proteico del latte. Il latte bovino, così come quello degli altri ruminanti, presenta un'elevata proporzione di caseine rispetto alle sieroproteine, al contrario di quanto si riscontra nel latte di mammiferi monogastrici (uomo, asino, cavallo). Le caseine rappresentano il 78% circa delle sostanze azotate presenti nel latte di vacca. Si distinguono in diverse "frazioni" aventi peso molecolare differente e diversa affinità per l'acqua: α_1 , α_2 , β , κ e γ . Le caseine si distinguono in :

- caseina α_1 : variante dell'alfa-caseina tipica del latte vaccino dove rappresenta circa il 35% della massa delle micelle caseiniche. Si presenta in 5 varianti genetiche (A, B, C, D, E), la variante B è la più frequente nella specie bovina. In presenza di calcio tende a flocculare;
- caseina α_2 : presente nel latte vaccino in ragione del 10% circa delle caseine totali. Esiste in 4 varianti genetiche (A, B, C, D) di cui solo due (A e D) sono presenti nella specie bovina;
- caseina β : nel latte bovino rappresenta circa il 30-35% delle caseine totali. Esiste in 9 varianti genetiche (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G). Le più frequenti sono le varianti A1 e A2. Essa è fortemente idrofoba;
- caseina γ : rappresenta solo il 2,5% delle caseine totali;

- caseina k: nel latte bovino rappresenta il 12% circa delle caseine totali e si trova in cinque varianti genetiche (A, B, B2, C ed E) tra le quali le più diffuse sono la A e la B. La variante B è la più favorevole per il latte destinato alla trasformazione casearia in quanto determina la formazione di micelle caseiniche più piccole che coagulano più velocemente e formano un coagulo più consistente. Come si è detto la frazione k è idrofila in quanto contiene zuccheri; essa si trova sulla superficie della micella dove svolge un ruolo importante nella stabilità della struttura micellare. Proprio per questo suo ruolo la k caseina è la frazione che entra in gioco nei processi di coagulazione delle micelle caseiniche.

Dunque, le caseine hanno la caratteristica di presentare, soprattutto nella specie bovina, uno spiccato polimorfismo. La frequenza delle varianti genetiche di ogni proteina varia con la specie e con la razza. Il polimorfismo delle proteine del latte determina differenze della struttura molecolare delle proteine che a loro volta si traducono in differenze delle proprietà fisico-chimiche e biologiche delle proteine in questione e delle caratteristiche tecnologiche del latte. Dal punto di vista della composizione aminoacidica le caseine si presentano ricche di prolina e di aminoacidi fosforilati mentre risultano relativamente povere di aminoacidi solforati (soprattutto cisteina). Tuttavia, considerando le proteine del latte nel loro complesso, questa carenza viene compensata dalla ricchezza in aminoacidi solforati delle sieroproteine. Le sieroproteine costituiscono il 17% circa delle sostanze azotate totali del latte di vacca. La β -lattoglobulina è la principale sieroproteina del latte bovino mentre nel latte di altre specie può non essere presente (è assente nel latte umano). Si presenta in 9 varianti genetiche, tra le quali le più frequenti, nel latte di vacca, sono la A e la B. E' considerata il più potente allergene del latte bovino.

Nel latte bovino la percentuale di grasso si aggira mediamente intorno al 3.6% con un ampio intervallo di variazione (2-5%). La composizione in acidi grassi dei trigliceridi del latte vede una prevalenza di acidi grassi saturi (circa il 70%), a numero pari di atomi di carbonio. Gli acidi grassi più rappresentati sono l'acido palmitico (C:16, pari al 25-30% degli acidi grassi totali), l'acido stearico (C:18, pari al 12%), l'acido miristico (C:14, pari all'11% circa) e l'acido laurico (C12:0). Il rimanente 30% degli acidi grassi è costituito in massima parte da acidi grassi monoinsaturi rappresentati soprattutto dall'acido oleico (C18:1 cis 9, circa il 20% degli acidi grassi del latte). Gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena (EPA e DHA) rappresentano meno dell'1% del totale degli acidi grassi. Caratteristica peculiare del grasso del latte di vacca e di altri animali ruminanti è la presenza di alcuni acidi grassi saturi composti da pochi atomi di carbonio (acidi grassi volatili) come l'acido butirrico (C4:0), l'acido caproico (C6:0), l'acido caprilico (C8:0) e l'acido caprico (C10:0). Questi forniscono al latte della specie che li contengono aromi

e sapori caratteristici. Esiste poi un'altra categoria di acidi grassi che è peculiare del latte di vacca e degli altri animali ruminanti: gli acidi grassi a catena dispari e ramificati. Questi acidi grassi si ritrovano solo nel grasso del latte dei ruminanti in quanto provengono dal metabolismo dei batteri ruminali. Gli acidi grassi coniugati dell'acido linoleico (CLA) sono una miscela di isomeri geometrici e di posizione dell'acido linoleico che possiedono due doppi legami coniugati. I CLA possiedono una provata attività anticancerogena e antiaterogena, inoltre, sono dotati di proprietà immunostimolanti e sembrano svolgere attività anabolizzante. Nel latte il principale rappresentante del gruppo è l'acido rumenico (C18:2-9c, 11t). Esso deriva dalla bioidrogenazione dell'acido linoleico ad opera della microflora ruminale. Il tenore totale di CLA nel latte è mediamente compreso tra 2 e 30 mg/g di lipidi e dipende da molti fattori tra cui principalmente la ricchezza della dieta dell'animale in acidi grassi polinsaturi. Gli acidi grassi presenti nel grasso del latte hanno differente origine: circa la metà degli acidi grassi (quelli con catena da C4 a C16 con numero pari di atomi di carbonio) è sintetizzata nel citoplasma delle cellule secernenti della mammella a partire dagli acidi grassi volatili (acido acetico e acido butirrico) prodotti dalla flora ruminale per fermentazione della cellulosa, delle emicellulose e degli zuccheri ingeriti con la razione. Gli acidi grassi volatili giungono alla mammella per via ematica dopo essere passati attraverso la parete ruminale; in questo passaggio l'acido butirrico viene convertito in β -idrossibutirrato; la rimanente parte (acidi grassi saturi a lunga catena e acidi grassi insaturi) deriva direttamente dal circolo ematico dove giunge per assorbimento intestinale degli acidi grassi alimentari (40% circa) o in seguito alla lipolisi dei grassi corporei di riserva (10% circa, variabile in funzione dello stadio fisiologico, dell'entità delle riserve adipose e del bilancio energetico dell'animale). I grassi presenti nelle razioni per ruminanti sono composti in gran parte da acidi grassi insaturi in considerazione della loro prevalente origine vegetale; tuttavia, poiché in sede ruminale essi vengono sottoposti ad una parziale saturazione, gli acidi grassi assorbiti a livello intestinale sono rappresentati da una miscela di acidi grassi saturi e insaturi.

La componente minerale del latte (0.7-1%) nella specie bovina è caratterizzata dalle elevate concentrazioni di potassio (0.15%), calcio (0.12%) e fosforo (0.09%). Il calcio e il fosforo sono presenti in misure tali da determinare un rapporto ottimale con il calcio (>1)¹¹.

1.3 Il latte di asina

Da qualche anno nel nostro paese si è fatta spazio la riscoperta di latte di specie animali diverse da quelle abitualmente considerate ad attitudine lattifera (bovina, ovina e caprina): si fa riferimento, nello specifico, al prodotto ottenuto dalla specie asinina. Diversi studi hanno

enfaticamente le proprietà benefiche del latte di asina sulla salute umana. Emergono, infatti, conoscenze che oltre a rimarcare il valore nutritivo del latte di asina, molto vicino al latte di donna, evidenziano aspetti di grande significato funzionale e addirittura di prevenzione per molte patologie umane. È importante sottolineare il ruolo e l'importanza di questo alimento attraverso una disamina sulle peculiarità di alcune delle sue componenti.

Nel latte d'asina, il lattosio è l'elemento più rappresentativo, il suo contenuto in percentuale è del 6,8 prossimo a quello del latte umano. Ad esso viene attribuito un ruolo fondamentale nel metabolismo del calcio, in quanto aumenta l'assorbimento del minerale in prossimità della mucosa intestinale, così come è stato dimostrato nel ratto e nell'uomo¹². L'elevato contenuto in lattosio oltre a rendere il latte d'asina palatabile, gli conferisce un'azione importante per la cura dell'osteoporosi negli adulti e nel processo di mineralizzazione ossea nei bambini. Il lattosio, inoltre, favorisce il corretto sviluppo della flora lattica intestinale riuscendo a garantire condizioni di pH ad essa favorevole; per tale ragione il latte d'asina rappresenta il substrato ideale per la preparazione di bevande probiotiche¹³.

La concentrazione azotata media del latte d'asina è prossima al tenore proteico del latte umano, risultando così compatibile con le esigenze dietetiche dei bambini. La frazione proteica totale nel latte umano è 1,64%, mentre quella riferita al latte d'asina è 1,74%. Tale componente proteica è ricca di aminoacidi essenziali il che suggerisce una favorevole applicazione del latte di asina sia in età pediatrica che geriatrica senza produrre un eccessivo carico renale di soluto¹⁴. Il latte d'asina è un alimento ipoallergenico ed è spesso ben tollerato da pazienti affetti da intolleranza alle proteine del latte vaccino (APLV). Il meccanismo di tale tolleranza resta ancora da chiarire, ma certamente è legato alla composizione chimica della frazione proteica. La frazione proteica del latte di asina è particolarmente ricca di proteine del siero. Queste rappresentano il 35-50% della frazione azotata, mentre nel latte bovino arrivano solo al 20%¹⁵. Il contenuto medio di sieroproteine, sostanze ad altissimo valore biologico, del latte di asina risulta essere prossimo a quello riscontrato nel latte umano che tuttavia rispetto al latte d'asina evidenzia un titolo caseinico inferiore. Il contenuto in caseina nel latte d'asina (0,64%-1,03g/100g) risulta essere un valore intermedio tra il latte umano e quello dei ruminanti. Gli studi ad oggi disponibili hanno accertato la presenza di α 1-caseina, piccolissime quantità di α 2-caseina, e della frazione β -caseina; non è mai stata individuata la frazione κ -caseina, se non in piccolissime tracce. Inoltre il rapporto tra la percentuale di caseina e quella delle proteine del siero è risultato anch'esso più elevato nel latte di asina rispetto al latte di donna. Nel latte dei ruminanti, tale rapporto è addirittura quattro volte superiore rispetto al latte di asina e sette volte maggiore di quello

umano¹⁰. Dallo studio delle proteine del siero sono state identificate le seguenti proteine: lattoferrina (4,48%), sieralbumina (6,18%), β -lattoglobulina (29,85%), lisozima (21,03%) e α -lattoalbumina (22,56%). Per quanto riguarda il contenuto di α -lattoalbumina, nel latte di asina è presente in una quantità (1,8 g/l) piuttosto vicina a quella determinata nel latte umano (2,2 g/l). Tale proteina oltre ad essere fondamentale per la produzione di lattosio, in quanto regola a livello delle cellule epiteliali della mammella il complesso enzimatico della lattosio sintetasi, come proteina multimerica lega ioni calcio e zinco e possiede attività antimicrobica. Inoltre a pH acido assume una conformazione intermedia che la rende particolarmente digeribile¹⁰. La percentuale di lisozima sulla proteina del siero nel latte di asina (21,03%) è molto più alta sia di quella del latte di cavalla che del latte di donna¹¹, mentre nel latte bovino si ritrova solo in tracce. Il titolo di lisozima nel latte di asina è risultato mediamente pari a 1,0 mg/ml¹⁰. Nel latte di asina si ritrovano 2 varianti di lisozima: LYS A e LYS B¹⁵, che differiscono per tre aminoacidi in posizione 48, 52 e 61. Si ritiene che sia proprio tale enzima che conferisce al latte di asina la peculiarità di conservare a lungo inalterate le proprie caratteristiche organolettiche e microbiologiche. Infatti, è stato osservato che in un campione mantenuto a regime di refrigerazione per 10 giorni i caratteri organolettici, il pH e la flora microbica totale non mostravano variazioni significative. Nel latte di asina la concentrazione di *lattoferrina* è pari a 0,09 mg/ml, dunque un valore paragonabile a quello riscontrato nel latte umano (1,0 mg/ml) e maggiore rispetto al latte bovino (0,02-0,2 mg/ml). Recenti ricerche condotte sia in vivo che in vitro hanno dimostrato che la β -lattoglobulina e le caseine rappresentano i principali allergeni del latte vaccino¹⁶. Nel latte di asina la percentuale di β -lattoglobulina trovata (29,85%) è considerevolmente più bassa di quella contenuta nel latte bovino, laddove si può ritrovare in concentrazioni fino al 50% della proteina totale del siero¹⁴, ma nel latte umano tale peptide risulta praticamente assente. Tale dato sembrerebbe inficiare le potenzialità ipoallergeniche del latte di asina, sebbene i casi in cui questo alimento sia stato utilizzato nella cura di APLV abbiano mostrato una valida efficacia con altissime percentuali di guarigione. L'ipotesi formulata da diversi pediatri è che la β -lattoglobulina svolga un ruolo minore nella comparsa dell'APLV rispetto alle caseine. Inoltre le analisi sull'eterogeneità della frazione proteica del latte d'asina hanno evidenziato l'esistenza di alcune varianti proteiche (polimorfismo), sia nella frazione caseinica (variante della caseina α 1) che nella frazione delle sieroproteine¹⁵ (varianti B e C della β -lattoglobulina), che contribuirebbero a garantire l'efficacia del consumo di tale latte in dietoterapia. La β -lattoglobulina presenta un'alta affinità per una vasta quantità di composti e si pensa sia coinvolta nel trasporto e rilascio di ligandi idrofobici, nella regolazione di alcuni enzimi, e nella acquisizione dell'immunità passiva nei neonati. Recentemente alcuni autori

hanno dimostrato che la β -lattoglobulina presenta una alta affinità per il resveratrolo e per l'acido folico facilitandone il trasporto e aumentandone la fotostabilità e la idrosolubilità¹⁷.

La composizione della frazione lipidica conferisce a questo alimento molte potenziali applicabilità in ambito dietoterapico. Il latte di asina ha un basso tenore lipidico, con valori medi di circa 0,45%. La frazione dei saturi è apparsa la più rappresentata tra le classi acide con i contenuti di acido palmitico (C16:0 = 11,47%), caprilico (C8:0 = 12,80%) e caprinico (C10:0 = 18,65%) più alti fra tutti. Tra gli acidi grassi monoinsaturi, l'acido oleico (C18:1) è uno dei più presenti in questa frazione (9,65%); l'acido palmitoleico (C16:1) mostra una più alta concentrazione (2,37%) rispetto a quella riscontrata nel latte vaccino. Degni di nota sono i livelli di acidi grassi polinsaturi che, raggiungono valori notevolmente superiori rispetto ad altre specie di animali lattiferi (16,60%). In particolare tra gli acidi grassi essenziali, il contenuto in acido α -linolenico (C18:3 ω 3 = 6,32%) e linoleico (C18:2 ω 6 = 8,15%) presenta valori molto elevati. Il rapporto tra il contenuto in acidi grassi polinsaturi della serie omega 3 e quello della serie omega 6 nel latte di asina (ω 3/ ω 6) è pari allo 0,86%, superiore rispetto a quello dei ruminanti ed a quello umano (0,07). Il rapporto Insaturi/Saturi (UFA/SFA=0,48) appare leggermente inferiore rispetto a quello del latte di cavalla e di donna, ma comunque superiore a quello dei ruminanti¹⁰⁻¹⁸. La composizione lipidica del latte di asina rispetto a quello umano o bovino, mostra dunque:

- un basso contenuto in acidi grassi saturi;
- un elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi (PUFA) della serie omega-3;
- una bassa proporzione di trigliceridi, compensata però da un'elevata concentrazione di acidi grassi liberi (FFA) e fosfolipidi¹¹.

Gli acidi α -linolenico (C18:3) e linoleico (C18:2), si ritrovano nel latte di asina con percentuali più elevate rispetto ai ruminanti, presumibilmente per l'assenza di idrogenazione nel tratto digestivo prima dell'assorbimento, fenomeno biochimico proprio dell'attività ruminale. L'alto ed equilibrato contenuto di acidi grassi essenziali, così come il basso indice aterogenico (0,80) e trombogenico (0,32) sottolinea le proprietà immunomodulatrici del latte d'asina. Dunque, comparato con il latte di ruminanti, la considerevole presenza di acidi grassi insaturi pone il latte d'asina come interessante alimento nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, autoimmuni e infiammatorie. Il contenuto in acidi grassi polinsaturi della serie omega-3 possono contrastare le sopra menzionate patologie attraverso la sintesi di sostanze antinfiammatorie, antiaggreganti e non immunosoppressivi, come mediatori lipidici (eicosanoidi), prostaglandine (PGE3) e leucotrieni (LTB5), mediatori proteici (citochine), interleuchine e tumor necrosis factor. In aggiunta, l'elevata percentuale di acidi grassi a catena media ha influenza sui fenomeni di vasodilatazione ed agisce sinergicamente con gli acidi grassi a catena corta, contribuendo, in

modo indiretto, ad aumentare le difese antiossidanti di tale alimento. Tutto ciò ci porta a concludere che il latte d'asina, a causa del suo basso contenuto in acidi grassi saturi e dell'elevata concentrazione di acidi grassi insaturi, possiede attività antiaterogeniche ed antitrombogeniche più alte di quelle trovate nel latte bovino¹⁸.

E' interessante notare che nel latte di asina si riscontrano contenuti di vitamina C compresi tra 35 e 50 mg/l, nettamente superiori a quelli determinati nel latte di vacca tra 5 e 25 mg/l. La vitamina C è importante, soprattutto nelle prime fasi di vita, per il corretto funzionamento del sistema immunitario e la sintesi di collagene nell'organismo. La composizione minerale del latte è influenzata da fattori genetici e ambientali quali dieta, stadio della lattazione e stato di salute della mammella; tuttavia è stato dimostrato che la ghiandola mammaria ha una buona capacità di regolare le concentrazioni di alcuni microelementi quali zinco, ferro e rame secreti nel latte, indipendentemente dallo status minerale della madre¹⁹. La concentrazione media dei minerali nel latte d'asina (0,39g/100ml) è risultata più elevata rispetto a quella del latte di donna, mentre il latte dei ruminanti presenta tenori ben più elevati¹⁰.

1.4 Il latte umano

La capacità di produrre latte è lo straordinario fenomeno biologico appartenente ai mammiferi ed in grado di garantire la sopravvivenza della specie. Tale processo biologico è ottimale quando il rapporto fra madre e figlio non viene modificato, nel totale rispetto dello stato fisiologico. Il latte di ogni mammifero presenta diverse caratteristiche, tuttavia è dimostrato che dal punto di vista nutritivo quello più completo viene prodotto dalle specie in cui il contatto "madre-figlio" è continuo (ad esempio la specie umana). La sostanziale peculiarità del latte materno è la sua unicità ed originalità; perfino nella stessa donna, durante una seduta di allattamento, il latte non presenta la stessa composizione. La continua modificazione della struttura del latte materno ha lo scopo di garantire al bambino la completa soddisfazione delle sue esigenze nutrizionali e la stimolazione immunitaria. Tutti i componenti presenti nel latte materno (proteine, lipidi, zuccheri, sali minerali, vitamine) si adattano in qualità ed in quantità alle mutevoli esigenze del bambino.

La componente glucidica è principalmente rappresentata dal lattosio con valori che si aggirano tra i 6.7 e 7.8 g/dL, più elevati di quelli riscontrati nel latte vaccino. La maggior ricchezza in lattosio del latte umano rispetto al latte vaccino determina: bassi valori di pH a livello intestinale, che permettono un aumento della resistenza alle infezioni; un migliore utilizzo di proteine e aminoacidi liberi ed aumento dell'assorbimento intestinale di calcio e magnesio; il glucosio e il galattosio, derivati dalla scissione del lattosio, partecipano alla sintesi dei cerebrosidi,

indispensabili per la normale maturazione del SNC. Un'altra significativa frazione della componente glucidica è rappresentata dagli oligosaccaridi, fattori bioattivi ampiamente rappresentati nel latte umano raggiungendo una concentrazione pari a circa 12g/L, essa può variare in base allo stadio di lattazione ed ai fattori genetici materni²⁰. Essi verranno descritti nel dettaglio in seguito.

Il contenuto proteico del latte umano varia da 0.9 a 1.2 g/dL. Esso è costituito dalle frazioni di siero proteine e di caseine, ciascuna comprendente una notevole gamma di proteine e peptidi specifici²¹⁻²². Nel latte umano si ritrovano prevalentemente l' α -caseina, l' α -lattoalbumina, lattoferrina, immunoglobuline A secretorie (sIgA), lisozima e albumina serica²³⁻²⁴. Nel latte di donna è assente la β -lattoglobulina, proteina fortemente allergizzante, che invece è la principale componente delle proteine del latte bovino.

Il contenuto lipidico totale del latte umano è in media compreso tra 3.2 e 3.6g/dl. Gli acidi grassi che costituiscono i trigliceridi del latte umano differiscono da quelli del latte vaccino soprattutto per le seguenti caratteristiche: predominano gli acidi grassi insaturi; gli acidi grassi polinsaturi essenziali sono presenti in un rapporto reciproco di circa 10:1, considerato ottimale per la sintesi endogena dei rispettivi derivati a lunga catena; gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena, indispensabili per la sintesi dei fosfolipidi del cervello e della retina, sono presenti in rapporto di 2:1²⁰. Il colesterolo è presente nel latte di donna in concentrazione di 20-25mg/dl, valore maggiore rispetto a quello del latte vaccino e utile per la sintesi degli ormoni steroidei e degli acidi biliari. I fosfolipidi, che sono tra i maggiori componenti del tessuto nervoso, del muscolo cardiaco e del fegato, sono presenti in una concentrazione pari a circa 80mg/dl, due volte maggiore del latte vaccino.

La composizione in micronutrienti del latte umano dipende in larga misura dalla dieta della madre e dalle sue riserve corporee. L'alimentazione della madre spesso non è ottimale, in particolare, diversi studi hanno evidenziato una carenza di vitamina D e vitamina K nel latte umano, rendendo necessarie integrazioni multivitaminiche alla donna durante l'allattamento²⁵⁻²⁶.

1.4.1 Gli oligosaccaridi del latte umano

Recenti ricerche hanno dimostrato che il latte umano, comparato con il latte di altre specie, è considerato essere unico in termini di oligosaccaridi complessi²⁷⁻²⁹. Nel latte della maggior parte dei mammiferi gli oligosaccaridi sono presenti in piccolissime quantità, solo in alcune specie (orsi, marsupiali, pinnipedi) la loro concentrazione è addirittura superiore a quella del lattosio; nel latte umano essi sono ben rappresentati raggiungendo un contenuto pari a 12 g/L. Gli oligosaccaridi del latte umano variano da 3 a 32 zuccheri in dimensione e differiscono anche in

composizione da quelli del latte di altri mammiferi³⁰⁻³¹. Le loro funzioni biologiche sono strettamente correlate alla loro conformazione. I monomeri degli oligosaccaridi del latte sono D-glucosio (Glc), D-galattosio (Gal), N-acetilglucosammina (GlcNAc), L-fucosio (Fuc) e acido sialico [acido N-acetilneuramminico (NeuAc)]. Ad eccezione di pochi casi, gli oligosaccaridi isolati sono trasportati all'estremità ridotta del lattosio. Un allungamento è ottenuto dall'attacco enzimatico dei residui di GlcNAc con legame $\beta(1-3)$ o $\beta(1-6)$ ad un residuo di galattosio seguito da un'ulteriore aggiunta di galattosio con legame $\beta(1-3)$ or $\beta(1-4)$. In tal modo viene formato un ampio numero di strutture di base. Ulteriori variazioni possono essere dovute all'attacco dei residui di fucosio e/o acido sialico in posizioni diverse della regione del core e del nucleo di allungamento della catena^{27,32}. L'aggiunta di fucosio dipende dall'azione di almeno tre differenti fucosil-transferasi in un processo determinato geneticamente. Le madri infatti differiscono nelle strutture specifiche degli oligosaccaridi presenti nel loro latte come risultato di differenze genetiche simili a quelle che si riscontrano per i differenti gruppi sanguigni²⁰. Queste variazioni nella composizione di oligosaccaridi, a differenza di quello che si riscontra con i gruppi sanguigni, non crea incompatibilità, in tal modo tutte le madri possono essere considerate "donatrici universali". Il significato funzionale degli oligosaccaridi non è ancora ben chiarito. Gran parte degli oligosaccaridi sono agenti prebiotici in grado di modulare l'ecosistema batterico favorendo lo sviluppo di flora bifida (*Bifidobacterium bifidum*)³³. Recenti ricerche hanno riconosciuto gli oligosaccaridi quali potenti inibitori dell'adesione batterica alle superfici epiteliali negli stadi iniziali dei processi infettivi, influenzando anche reazioni infiammatorie. La somiglianza tra i carboidrati delle superfici cellulari epiteliali e gli oligosaccaridi del latte umano rafforza l'idea che specifiche interazioni di questi oligosaccaridi con microrganismi patogeni permettono di prevenire l'attacco di questi ultimi alle cellule epiteliali intestinali, agendo come recettori analoghi in competizione con i ligandi epiteliali per l'attacco batterico³⁴⁻³⁶. In aggiunta alle loro possibili funzioni sui meccanismi di difesa del neonato e sugli eventi infiammatori, gli oligosaccaridi, insieme al lattosio, possono svolgere un importante ruolo nello sviluppo cerebrale postnatale³⁷. Alcuni mammiferi appena nati subiscono un periodo di rapido sviluppo cerebrale che richiede una notevole quantità di glicolipidi, che sono i componenti delle membrane cellulari dei neuroni e della mielina. Il galattocerebroside, con il galattosio presente all'estremità polare, è il glicolipide predominante nella mielina. Il fegato non è capace di fornire tutto il galattosio necessario ai mammiferi durante il periodo di mielinazione e sviluppo cerebrale. Dunque, un possibile ruolo degli oligosaccaridi del latte è quello di garantire livelli di galattosio in quantità non limitanti durante tale periodo.

CAPITOLO 2

NUTRIZIONE E METABOLISMO

E' ormai ampiamente accettato che le esposizioni ambientali durante i primi anni di vita ed, in particolare, il comportamento alimentare possono influenzare la salute a lungo termine. È necessario definire gli effetti protettivi e predisponenti della nutrizione sullo sviluppo di malattie croniche tardive. La comprensione dei meccanismi biologici coinvolti, il ruolo svolto dal microbiota intestinale ed i contributi relativi dei singoli componenti della dieta sono importanti per consentire la progettazione di efficaci piani di prevenzione o strategie di trattamento e per combattere l'onere di patologie comuni come l'obesità e i disordini ad essa correlati, allergie e malattie infiammatorie.

2.1 Bilancio energetico ed efficienza metabolica

Mantenere il peso corporeo nel range di normalità in relazione alla propria costituzione e attività fisica è uno degli interventi più importanti per conservare un buono stato di salute; ciò è possibile attraverso un equilibrato bilancio tra l'introito calorico ed il consumo energetico dell'organismo. Il bilancio energetico è la risultante tra l'energia introdotta nell'organismo (sottoforma di macronutrienti) e l'energia spesa dall'organismo (per le reazioni metaboliche e per l'attività fisica). Se l'energia introdotta è minore della spesa energetica, il soggetto si definisce ipofagico, il bilancio energetico sarà negativo e ciò determina una perdita di peso. Se l'introito calorico è maggiore della spesa energetica, il bilancio energetico sarà invece positivo e il soggetto si definisce iperfagico; tale situazione comporta un accumulo di grasso ed un aumento del peso corporeo. Infine, nel caso in cui l'introito energetico sia esattamente uguale alla spesa energetica, il soggetto è normofagico, il suo peso corporeo viene mantenuto quindi costante; questa situazione è quella ideale per l'organismo. Non tutta l'energia chimica introdotta dall'organismo può essere trasformata per compiere lavoro. Una parte di quest'energia viene persa dall'organismo sottoforma di scorie (feci e urine); la differenza tra quella introdotta e quella eliminata si definisce energia metabolizzabile di cui l'organismo dispone per le sue attività e che viene consumata nella spesa energetica giornaliera. Quest'ultima è generalmente suddivisa in tre componenti: metabolismo basale a riposo (BMR), costo energetico dell'attività fisica, effetto termico del cibo (TEF).

- Il metabolismo basale è l'energia utilizzata dall'organismo per le sue funzioni vitali a riposo, dunque rappresenta la spesa energetica minima necessaria per mantenere l'organismo in vita e nella sua determinazione i muscoli contribuiscono in maggior quantità. Esso costituisce il 60-75% del dispendio energetico totale giornaliero.
- L'attività fisica è la termogenesi data dall'attività muscolare e rappresenta il 20-25% dell'energia spesa dal corpo in un individuo adulto sedentario, ma può arrivare anche al 50% negli individui attivi. L'esercizio fisico aumenta la spesa energetica poiché il lavoro muscolare necessario per eseguirlo richiede energia e questa è ottenuta dall'idrolisi dell'ATP.
- L'effetto termico del cibo, TEF, rappresenta l'aumento del BMR indotto dall'assunzione del cibo ed equivale approssimativamente al 10% della spesa energetica giornaliera. La TEF può essere calcolata per differenza tra il metabolismo misurato nella fase post-prandiale ed il metabolismo basale misurato a digiuno.

I depositi rappresentano l'energia immagazzinata, sottratta all'energia introdotta, e sono rappresentati da glicogeno (anche se in piccola quantità), grassi e proteine. L'efficienza energetica è il rapporto tra l'energia depositata e l'energia metabolizzabile ossia la percentuale di energia introdotta che viene depositata. Se il rapporto è alto, l'organismo è ad elevata efficienza energetica ossia ha un'elevata capacità di depositare energia; se il rapporto è basso, l'organismo è a bassa efficienza piuttosto che depositare energia tende ad eliminarla.

Un organismo particolarmente efficiente da un punto di vista metabolico è in grado certamente di sopravvivere più a lungo nei periodi di carestia, ma è anche quello che accumula facilmente tessuto adiposo in un periodo di grande abbondanza di cibo. L'efficienza metabolica può anche essere definita come una misura dell'entità con cui l'organismo ottiene energia, sotto forma di composti ad elevato contenuto energetico (ATP), dai nutrienti che introduce con l'alimentazione. Il grado di efficienza metabolica potrebbe, quindi, giustificare la naturale tendenza di alcuni organismi di accumulare grasso più facilmente di altri. I meccanismi che concorrono alla regolazione dell'efficienza metabolica, in genere, sono poco conosciuti. I cambiamenti della spesa energetica a livello dell'organismo in "toto" riflettono paralleli cambiamenti a livello di quegli organi e tessuti, che maggiormente contribuiscono alla velocità metabolica corporea. A livello cellulare, variazioni dell'efficienza energetica mitocondriale nei vari tessuti possono, senz'altro, contribuire alle variazioni dell'efficienza metabolica corporea. Durante i processi di ossidazione dei substrati energetici l'energia contenuta in essi viene convertita in ATP, una parte di tale energia però è direttamente trasformata o dispersa sottoforma di calore. Dunque l'efficienza energetica dipende dalla quantità di calore dispersa durante l'ossidazione dei substrati per la produzione di ATP. La regolazione tra la quantità di ATP prodotto e la quantità

di energia termica dispersa è presente a livello mitocondriale. La comprensione dei meccanismi di regolazione dell'efficienza mitocondriale può essere di primaria importanza per capire sia la modulazione dell'efficienza metabolica dell'intero organismo, sia particolari fenomeni indotti da vari stimoli fisiologici nei vari organi. Tali aspetti verranno discussi in dettaglio in un capitolo successivo.

2.2 Tessuto adiposo, disfunzioni metaboliche ed infiammazione

Per molto tempo il tessuto adiposo è stato considerato un organo con un ruolo scarsamente attivo nell'omeostasi energetica globale. Si riteneva che la sua funzione, oltre a fornire un isolamento termico e meccanico, fosse solo quella di immagazzinare l'eccesso di energia sotto forma di trigliceridi, per restituirla, secondo i bisogni, come acidi grassi liberi. Da poco più di un decennio è in corso una rivoluzione nel modo di intendere le funzioni biologiche del tessuto adiposo. Oggi è visto come un organo dinamico, coinvolto in un'ampia gamma di processi biologici e metabolici. Il tessuto adiposo ha un ruolo importante nel controllo dell'omeostasi del glucosio e dello stato infiammatorio. Tale organo è infatti in grado di conservare l'energia metabolica sotto forma di trigliceridi (TG) durante lo stato di nutrizione e di rilasciarla sotto forma di acidi grassi liberi (FFA) nello stato di digiuno. Gli FFA rilasciati in circolo vengono poi trasportati nei tessuti bersaglio, ossidati nei mitocondri e utilizzati come fonte di energia³⁸. L'alto livello di coordinazione tra il sistema infiammatorio e quello metabolico è particolarmente evidente in condizioni di eccessivo deposito di grasso corporeo. Durante tale stato gli adipociti diventano ipertrofici a causa dell'aumentato accumulo di trigliceridi. In tale condizione gli adipociti possono secernere MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein- 1*), una molecola che stimola l'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo. Sia gli adipociti che i macrofagi producono ulteriormente MCP-1 e altre chemochine, nonché i recettori per tali molecole che contribuiscono ad un ulteriore richiamo di macrofagi nel tessuto adiposo in espansione. Inoltre producono TNF α (*Tumor necrosis factor- α*) e diverse citochine, come l'interleuchina 1 β (IL-1 β) e l'interleuchina 6, che avviano e amplificano una risposta infiammatoria^{38,39}. Oltre alle citochine pro-infiammatorie, anche altre sostanze prodotte principalmente dagli adipociti, e perciò definite adipochine, come la leptina, l'adiponectina e la resistina, possono regolare la risposta infiammatoria che si instaura in condizioni di obesità³⁹. Sia il TNF α e le altre citochine infiammatorie, che gli FFA e i suoi metaboliti, quali diacilglicerolo (DAG) e ceramidi, attivano una cascata di chinasi, come PKC θ (*protein kinase C theta*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e IKK- β (*I kappa B kinase- β*), che, come descritto prima, fosforilano la proteina IRS-1 in residui

di serina o treonina, impedendone la fosforilazione in tirosina e quindi inibendo il segnale insulinico (Fig. 1).

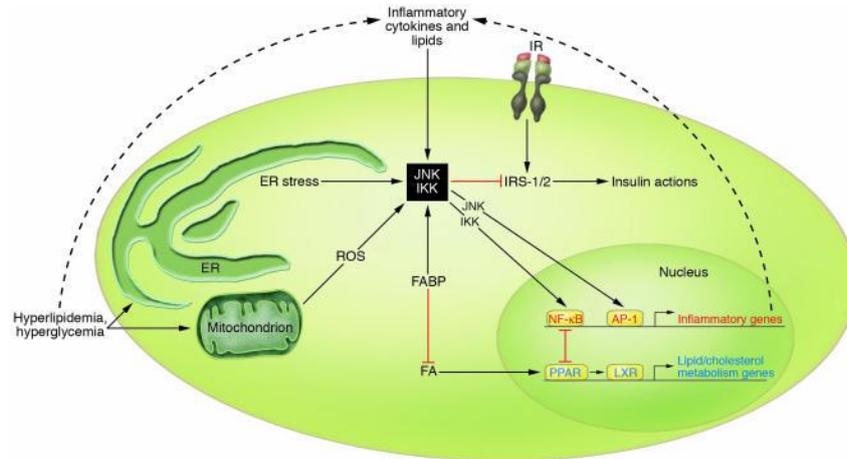


Figura 1. Modello di sovrapposizione tra pathway metabolici ed infiammatori nell'adipocita

Gli acidi grassi contribuiscono all'insulino-resistenza anche attraverso l'attivazione dei recettori TLR (*Toll-like receptors*), che sono coinvolti nell'induzione di infiammazione in adipociti e macrofagi. Il difetto nella risposta all'insulina comporta un ulteriore accumulo di FFA, creando così un circolo vizioso. Inoltre l'attivazione di IKK- β causa anche l'ulteriore induzione di molecole infiammatorie, come il TNF α stesso, creando anche in questo contesto un circuito a feedback positivo³⁸.

Va comunque ricordato che i lipidi intracellulari possono anche avere un ruolo antiinfiammatorio. I ligandi del recettore LXR (*liver X receptor*) e dei recettori PPAR sono rispettivamente gli oxisteroli e gli acidi grassi. L'attivazione di questi fattori di trascrizione inibisce l'espressione dei geni infiammatori nei macrofagi e negli adipociti. Le proteine citosoliche FABP (*fatty acids binding protein*), sequestrando i ligandi di questi fattori di trascrizione, promuovono l'infiammazione (Fig.1). La collocazione nel corpo, la composizione dell'ambiente circostante ed altri fattori sono determinanti nello stabilire se i lipidi promuovano o sopprimano l'infiammazione e quindi l'insulino-resistenza⁴⁰.

2.3 Omeostasi energetica e microbiota intestinale

E' ormai noto che condizioni di metabolismo alterato come l'incremento dei livelli di colesterolo LDL e di trigliceridi nel sangue e l'iperglicemia, sono associate ad un processo di infiammazione

cronica di basso grado che sembra promuovere in modo diretto l'insorgenza di diabete di tipo 2 e di malattie cardiovascolari⁴¹. Dal momento che questo rapporto tra infiammazione e metabolismo, nell'ambito della sindrome metabolica, assume sempre più rilievo, identificare l'origine dell'infiammazione diviene un obiettivo di massima importanza. Sebbene numerosi studi hanno dimostrato una correlazione tra infiammazione e infiltrazione di macrofagi all'interno di organi ad elevato tasso metabolico (fegato, muscolo e tessuto adiposo), il ruolo degli stessi macrofagi e l'origine e il tipo dei fattori scatenanti l'attivazione del sistema immunitario resta ancora motivo di dibattito.

Negli ultimi anni un numero crescente di studi ha dimostrato che tra i fattori ambientali che si ipotizza interferiscano con l'omeostasi energetica il microbiota intestinale gioca un ruolo critico^{42,45}. Ad oggi è stato ampiamente accettato che la flora batterica intestinale regola importanti funzioni biologiche e metaboliche incidendo sul bilancio energetico^{44,45}, metabolismo glucidico^{42,45-47} ed infiammazione di basso grado^{42,43,45,48,49} associata all'obesità ed ai disordini ad essa correlati. In particolare, il lipopolisaccaride (LPS), un componente della parete cellulare dei batteri Gram-negativi è stato identificato come uno dei fattori maggiormente coinvolti nell'insorgenza e nello sviluppo dell'infiammazione e della sindrome metabolica⁴⁵. A fronte di ciò, investigare ed approfondire gli effetti di diete specifiche sulla composizione del microbiota intestinale e in che misura tali modificazioni si riversano sul metabolismo dell'ospite rappresenta un aspetto di fondamentale importanza. Un approfondimento su composizione e funzioni della flora batterica intestinale verrà analizzato in dettaglio più avanti.

CAPITOLO 3

I MITOCONDRI

Il mitocondrio, piccolissimo organulo cellulare comparso relativamente tardi nella filogenesi della vita sulla Terra, ha svolto un ruolo essenziale nella evoluzione della cellula ed ha sostanzialmente permesso, mettendo a disposizione una grande quantità di energia sottoforma di ATP, le forme di vita superiori. Il mitocondrio ha reso possibile l'utilizzazione, ai fini energetici, dell'ossigeno con la conseguenza di una miglior degradazione dei metaboliti nutritivi. La glicolisi anaerobica della cellula primitiva, utilizzando direttamente glucosio, metabolizzato solo fino allo stadio di acido lattico, da una parte produceva grandi quantità di scorie acide, dall'altra scarso ATP. La glicolisi aerobica mitocondriale da una parte permette utilizzazione completa dei substrati nutritivi, fino alla formazione di acqua ed anidride carbonica, dall'altra una grande produzione energetica e la sintesi di molecole importanti per il metabolismo cellulare, dagli aminoacidi agli acidi grassi, dai nucleotidi a nuovo glucosio. Fini meccanismi di controllo intramitocondriali, regolano, a seconda delle necessità metaboliche della cellula, l'attivazione delle specifiche vie biosintetiche o energetiche, che nella glicolisi aerobica sono molteplici, rispetto alla via metabolica unica della glicolisi anaerobica. Per tutto quanto suddetto è importante mantenere una buona funzione mitocondriale, evitare blocchi enzimatici ed accumuli metabolici. E' necessario fornire ed attivare l'utilizzazione di tutti i fattori del metabolismo aerobico e garantire una presenza sufficiente di antiossidanti che proteggono il delicato DNA mitocondriale dai possibili danni che si possono verificare nell'ambito di un attivo metabolismo ossidativo. La disfunzione mitocondriale si ripercuote a tutti i livelli dell'organismo ed è spesso la fase iniziale della malattia. Il mitocondrio infatti, non solo regola la produzione di energia e la riparazione strutturale, ma anche decide, in base ai segnali chimici che ne riceve, se la cellula deve autodistruggersi, tramite l'apoptosi. Questo meccanismo è alla base della protezione antineoplastica di base. La cellula che ha perso le sue capacità funzionali, se non si annicchia, diventa anormalmente immortale, ovvero cancerogena.

3.1 Funzione dei mitocondri nella cellula

I mitocondri sono degli organelli cellulari di forma generalmente allungata, presenti in tutte le cellule eucariotiche ed in grado di svolgere molteplici funzioni. Vista la loro importanza nel metabolismo cellulare, questi organelli occupano in genere una frazione importante del volume

cellulare totale. I mitocondri sono delimitati da una doppia membrana e costituiti da diversi compartimenti, ciascuno con specifiche funzioni metaboliche. La membrana esterna permette il passaggio di piccole molecole, quella interna è selettivamente permeabile e ripiegata in estroflessioni chiamate creste mitocondriali, che ne aumentano la superficie. Le due membrane identificano due differenti regioni: lo spazio intermembrana, delimitato dalle due membrane e la matrice circoscritta dalla membrana interna. (Figura 2)



Figura 2. Mitocondrio

La matrice mitocondriale è una soluzione acquosa molto concentrata di enzimi e di intermedi chimici coinvolti nel metabolismo energetico. La produzione di energia, come già detto, è la funzione principale del mitocondrio e viene svolta utilizzando i principali prodotti della glicolisi, attraverso due processi: il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa. Con il ciclo di Krebs si completa l'ossidazione dei substrati energetici, già iniziata nel citosol, con formazione di NADH e FADH₂. Il NADH e il FADH₂ vengono poi utilizzati nella fosforilazione ossidativa per produrre molecole ad alta energia (ATP). Attraverso un complesso multienzimatico, avente la funzione di catena di trasporto, gli elettroni vengono prelevati da NADH e FADH₂ e, dopo una serie di passaggi intermedi, vengono ceduti all'ossigeno molecolare (O₂) che viene ridotto ad acqua. Durante il trasferimento elettronico le varie proteine trasportatrici subiscono dei cambiamenti conformazionali che consentono di trasferire dei protoni dalla matrice allo spazio intermembrana, portando così alla formazione di un gradiente protonico ed elettrico. I diversi complessi poliproteici, responsabili del trasporto degli elettroni, sono localizzati sulla membrana interna del mitocondrio (Figura 3):

- Il complesso I (NADH deidrogenasi), chiamato anche coenzima Q reduttasi, contiene diversi polipeptidi, una flavo proteina e 9 centri ferro-zolfo, che oscillano tra due stati: ossidato e ridotto. Tale complesso acquista elettroni dal NADH e per ogni coppia di elettroni fatta passare vengono trasferiti 4 protoni nello spazio intermembrana. Questo complesso trasferisce gli elettroni ricevuti direttamente al secondo trasportatore, il coenzima Q⁵⁰.
- Il coenzima Q, noto anche come ubiquinone, presenta una struttura chinonica, con una catena laterale più o meno lunga. Esso è solubile nella membrana; cioè non ha una posizione fissa come gli altri complessi respiratori, ma si può muovere liberamente; questa caratteristica gli consente di prendere elettroni sia dal complesso I che dal complesso II.
- Il complesso II (succinico deidrogenasi) oltre a catalizzare una reazione del ciclo di Krebs⁵¹, ossida il FADH₂ e, come il complesso I, trasferisce gli elettroni al coenzima Q, riducendolo; ma non permette il passaggio di protoni.
- Il complesso III, anche detto “citocromo c reduttasi”, riceve elettroni dal coenzima Q e li trasferisce al citocromo c e in seguito trasferisce 4 protoni nello spazio intermembrana.
- Il complesso IV, detto “citocromo c ossidasi” contiene ioni rame che permettono il trasferimento degli elettroni dal citocromo c all’ossigeno, e determina un nuovo ed ultimo spostamento di protoni verso lo spazio intermembrana.

Nei mitocondri, l’azione dei complessi I, III e IV ha come effetto principale quello di portare elettroni dal NADH all’ossigeno, mentre i complessi II, III e IV dal FADH₂ all’ossigeno. Il flusso di elettroni attraverso questi trasportatori è accompagnato al passaggio di protoni verso lo spazio intermembrana, generando un gradiente protonico, utilizzato per fosforilare ADP, attraverso il complesso V (ATP sintasi).

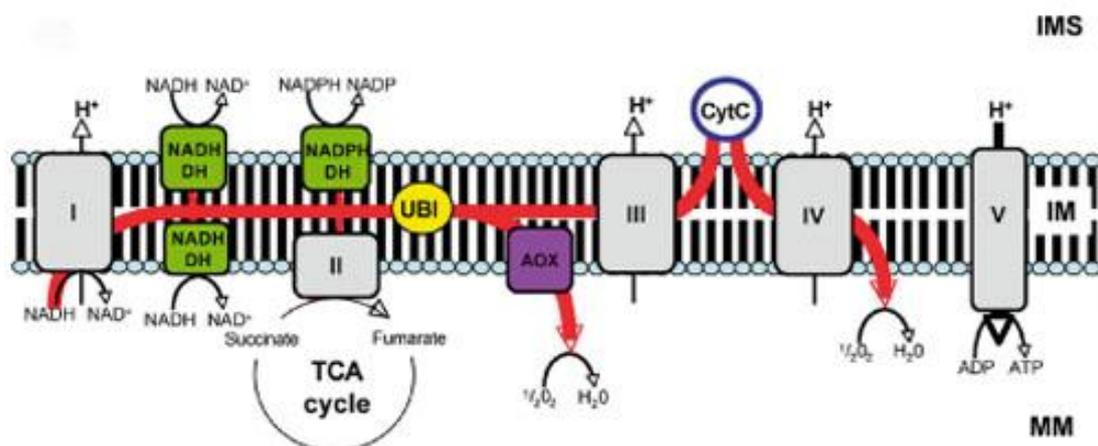


Figura 3. Catena respiratoria

L'ATP sintasi è una pompa protonica di tipo F, costituita da due strutture dette F_0 e F_1 . La subunità F_1 è una proteina periferica direttamente responsabile della sintesi di ATP⁵², costituita da tre subunità α e da tre β , organizzate in dimeri α - β , disposti a delimitare un canale. Al centro vi è una subunità γ che si collega alla struttura della F_0 . La subunità F_0 è una proteina integrale di membrana, attraversa la membrana mitocondriale interna e costituisce il canale per il passaggio dei protoni dallo spazio intermembrana alla matrice. La proteina strutturalmente è costituita da due subunità b e da dieci subunità c, quest'ultime delimitano il canale. Il passaggio di protoni attraverso la porzione F_0 determina la rotazione della subunità γ che a sua volta determina una variazione conformazionale dei dimeri α - β della porzione F_1 e la sintesi di ATP (Figura 4). L'ATP prodotta esce dal mitocondrio grazie all'enzima "Traslocasi dei Nucleotidi Adeninici" (ANT), inserito nella membrana mitocondriale interna, che catalizza lo scambio con ADP citosolico, entrante nel mitocondrio.

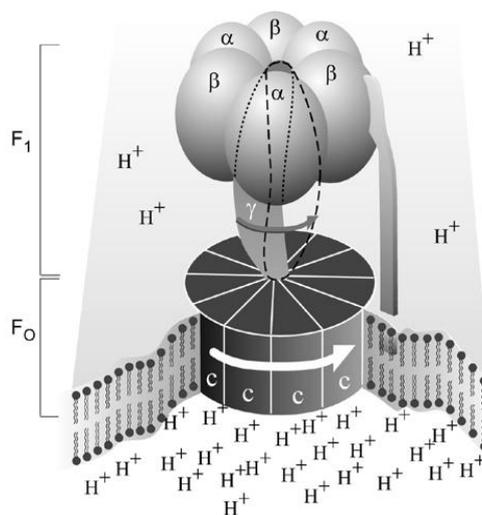


Figura 4. ATP sintasi

Nel processo di fosforilazione della catena respiratoria, l'ADP e il fosfato sono dei reagenti necessari per il trasporto degli elettroni dal NADH all'ossigeno. Infatti una diminuzione della disponibilità di ADP (ossia una bassa richiesta di energia) rallenta la velocità di fosforilazione (stato 4 o stato di riposo della respirazione), portando ad un incremento del gradiente protonico ai lati della membrana interna e rallentando così la velocità di trasporto degli elettroni. Diversamente, un aumento del contenuto di ADP (incrementato dall'idrolisi di ATP, dovuto ad una maggiore richiesta di energia), produce un aumento della velocità di fosforilazione da parte del complesso V, attenuando il gradiente protonico e stimolando il trasporto di elettroni e il consumo di ossigeno (stato 3 o stato attivo della respirazione). Infatti se ad un sistema isolato di

mitocondri, allo Stato 4 della respirazione, si aggiunge una quantità saturante di ADP, il consumo di ossigeno aumenta bruscamente fino ad un massimo e contemporaneamente l'ADP viene fosforilato ad ATP, Stato 3. Quando l'ADP aggiunto è stato fosforilato, la velocità di consumo dell'ossigeno ritorna allo Stato 4. Questo fenomeno, in cui la velocità di trasporto degli elettroni è controllata dalla concentrazione di ADP, è chiamato controllo da parte dell'accettore o controllo respiratorio. L'indice di controllo da parte dell'accettore (RCR) è il rapporto tra la velocità di respirazione dei mitocondri in presenza di notevoli quantità di ADP e la velocità di respirazione in assenza di ADP. Questo rapporto è normalmente molto alto, può essere di 5 o più nei mitocondri intatti, ma quando i mitocondri sono danneggiati perdono la loro capacità di fosforilare l'ADP e il rapporto scende ad 1. L'RCR è quindi un'utile misura dell'integrità dei mitocondri isolati. Il controllo della respirazione mitocondriale e della fosforilazione ossidativa è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, per cui è esercitato a due livelli:

- regolazione della velocità del consumo di ossigeno e produzione di ATP;
- regolazione dell'efficienza della fosforilazione ossidativa.

Il principale determinante dell'efficienza della fosforilazione ossidativa è il grado di accoppiamento tra consumo di ossigeno e sintesi di ATP. In condizioni normali la fosforilazione ossidativa è strettamente accoppiata al trasporto degli elettroni nella catena respiratoria, cioè il NADH e il FADH₂ vengono ossidati solo se contemporaneamente l'ADP viene fosforilato ad ATP.

Tuttavia, l'accoppiamento non è efficiente al 100%. Ci sono casi in cui l'accoppiamento tra il flusso di elettroni e il lavoro di sintesi compiuto dalla ATPasi non sono strettamente correlati e si parla di disaccoppiamento tra il flusso degli elettroni a livello della catena respiratoria e la sintesi di ATP. Questo è uno dei meccanismi principali di produzione di calore negli animali a sangue caldo.

Possono essere definiti due tipi di disaccoppiamento :

- *disaccoppiamento basale*, presente in tutti i mitocondri;
- *disaccoppiamento inducibile*, catalizzato da proteine e si trova solo in alcuni tipi cellulari.

Il disaccoppiamento basale è dovuto ad una perdita protonica passiva, determinata dalle caratteristiche intrinseche della membrana mitocondriale interna, definito anche conduttanza protonica basale⁵³. La conduttanza protonica basale non è un artefatto dell'isolamento dei

mitocondri poiché è stato dimostrato che essa è presente anche nei mitocondri di cellule ed organi intatti, come il fegato, i timociti, i linfociti, il muscolo scheletrico ed il cuore⁵⁴.

Il contributo della conduttanza protonica basale al consumo di ossigeno può essere molto elevato, con percentuali che oscillano dal 20% al 50% in tessuti quali il fegato ed il muscolo. In particolare, tale contributo è del 20% negli epatociti attivi e del 25% negli epatociti a riposo⁵⁵.

Per ciò che concerne il disaccoppiamento inducibile o conduttanza protonica indotta, tra i vari disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa ritroviamo gli acidi grassi. Nelle cellule intatte e nei tessuti essi rappresentano un eccellente substrato respiratorio in quanto forniscono elettroni alla catena respiratoria. Questa funzione maschera il loro potenziale effetto disaccoppiante che diventa evidente solo in speciali condizioni fisiologiche (digiuno, diete ad alto contenuto di grassi, esercizio eccessivo) o patologiche (diabete), caratterizzate da un inusuale accumulo di acidi grassi⁵⁶. Il coinvolgimento degli acidi grassi nell'indurre una variazione dell'accoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale è noto sin dagli anni '50. Alcuni ricercatori notarono che tali effetti venivano attenuati dalla presenza di albumina di siero bovino (BSA), una molecola che mostra un'alta capacità di legame per gli acidi grassi^{57,58}. Successivamente si dimostrò che gli acidi grassi non esterificati a lunga catena (NEFA) erano i reali agenti disaccoppianti "naturali", ed in particolare la loro potenzialità dipendeva dalla lunghezza della catena e dal loro grado di insaturazione^{59,60}. La differenza fondamentale tra l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi e quello dei classici disaccoppianti sintetici come il carbonilcianide-4-trifluorometossi-fenilidrazone (FCCP) e il dinitrofenolo, che agiscono da protonofori, è che gli acidi grassi agiscono sul potenziale di membrana e determinano una riduzione del pH nella matrice.

Una possibile spiegazione di ciò, come anche la riduzione del pH mitocondriale, è stato suggerito da Wrigglesworth e collaboratori⁶¹. Questi ricercatori hanno evidenziato che l'oleato può catalizzare il trasporto di K^+ e di H^+ , attraverso il doppio strato lipidico, mediante un meccanismo che prevede che l'acido grasso possa traslocare un protone all'interno della matrice mitocondriale, rispettivamente come acido associato (AH) o come coppia ionica ($A^- X^+$). La direzione del trasporto sarà determinata dalla polarità del gradiente cationico e la sua velocità dipenderà dalla natura dell'acido grasso e dal particolare catione della coppia ionica. La presenza di un potenziale di membrana accelererà la traslocazione della specie anionica. Secondo questo meccanismo, quindi, l'effetto disaccoppiante sarebbe la conseguenza di un afflusso di H^+ nella matrice mitocondriale con conseguente riduzione del potenziale di membrana; in questo modo una parte dell'energia derivata dall'incrementato flusso di elettroni, attraverso la catena

respiratoria, dovuto agli acidi grassi, sembra essere in parte dissipata con un meccanismo simile al disaccoppiamento.

Fu quindi proposto un modello che spiegasse l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi. Tale modello prevede che i carrier mitocondriali sono capaci di legare e trasportare gli acidi grassi carichi negativamente (FA^-) fuori dalla matrice. Nello spazio intermembrana gli acidi grassi subiscono una protonazione, a causa della differenza di pH, e penetrano nella matrice mitocondriale tramite un movimento flip-flop. Nella matrice mitocondriale gli acidi grassi vengono nuovamente deprotonati, causando così il trasferimento netto di un protone dallo spazio intermembrana alla matrice mitocondriale. (Figura 5)

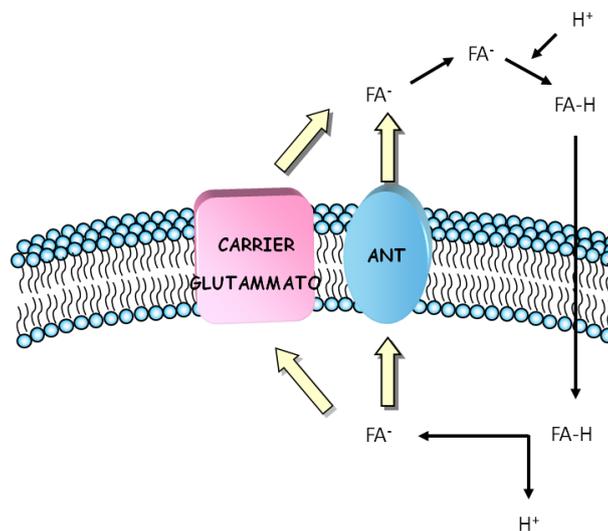


Figura 5. Effetto disaccoppiante degli acidi grassi

Studi successivi suggerirono che gli acidi grassi erano in grado di incrementare la conduttanza protonica nei mitocondri, interagendo con alcuni componenti della membrana mitocondriale interna. Il gruppo di Skulachev, infatti, osservò che alcuni inibitori dell'ANT erano in grado di abolire parte dell'effetto disaccoppiante del palmitato⁶². Tali evidenze portarono gli autori ad ipotizzare che l'ANT potesse essere coinvolta nel disaccoppiamento mediato dagli acidi grassi. In particolare Schonfeld, utilizzando uno specifico inibitore del carrier ANT, quale la carbossiatrattiloside (CAT), evidenziò una correlazione tra il grado di attivazione del carrier stesso ed il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi⁶³.

Nel tessuto adiposo bruno (BAT), ossia il tessuto specializzato nella produzione di calore, è stato provato che il disaccoppiamento è mediato da una proteina disaccoppiante o termogenina, che in

seguito è stata rinominata UCP1⁶⁴. Questa proteina forma un canale capace di aumentare il passaggio passivo di protoni, attraverso la membrana mitocondriale interna dissipando, sottoforma di calore, il gradiente protonico determinato dall'ossidazione dei substrati energetici nella catena respiratoria; offrendo così una via di rientro alternativa per i protoni rispetto a quella rappresentata dall'ATP sintetasi: in tal modo l'energia accumulatasi nel gradiente elettrochimico protonico non viene conservata come energia chimica sottoforma di ATP, ma si rende disponibile come energia termica. Nel 1997 sono state scoperte altre due proteine, omologhe alla proteina disaccoppiante 1: l'UCP2 e l'UCP3. L'espressione dell'UCP2 è ubiquitaria, infatti il suo mRNA è presente in molti tessuti quali il BAT, il tessuto adiposo bianco, il muscolo, il cervello, il cuore, ma non è presente negli epatociti parenchimali⁶⁵. Il gene dell'UCP2 è localizzato sul cromosoma 7 del topo, e sul cromosoma 11 dell'uomo, accanto alla regione associata al diabete ed all'obesità. La proteina UCP3 sembra essere una proteina specifica del muscolo scheletrico e del BAT⁶⁶. La sua espressione è regolata dall'introito calorico, dagli ormoni tiroidei e dall'esposizione al freddo. Altre due proteine della stessa famiglia, infine, chiamate UCP4 e UCP5, sono state ritrovate nel cervello^{67,68}. Sebbene inizialmente si pensasse che queste proteine disaccoppianti avessero un ruolo predominante nel disaccoppiamento mitocondriale, e quindi nella termogenesi, ulteriori studi hanno evidenziato che probabilmente il ruolo principale di queste proteine sia quello di trasportare i perossidi degli acidi grassi attraverso la membrana mitocondriale interna. È stato ipotizzato, infatti, che queste proteine disaccoppianti mitocondriali operino come trasportatori degli anioni degli acidi grassi perossidati. Tutto questo comporta l'estrusione di alcuni anioni dall'interno all'esterno della membrana mitocondriale interna, guidata dal potenziale di membrana. In questo modo la faccia interna della membrana mitocondriale si libera dai perossidi degli acidi grassi che altrimenti potrebbero formare degli ossidanti altamente aggressivi, che danneggiano il DNA mitocondriale, l'aconitasi ed altre componenti della matrice mitocondriale. Allo stato stazionario, la concentrazione dei perossidi degli acidi grassi è noto essere basso, questo potrebbe spiegare perché l'UCP 2, 3, 4 e 5 sono presenti in piccole quantità generalmente insufficienti a dare un grosso contributo alla conduttanza protonica della membrana mitocondriale.

3.2 Mitocondri e radicali liberi

I mitocondri sono i maggiori produttori cellulari di radicali liberi e nel contempo i principali bersagli dei loro effetti dannosi. I radicali liberi (R^\bullet) sono specie chimiche capaci di esistenza indipendente e che possiedono uno o più elettroni spaiati nei loro orbitali. Si formano nelle cellule, sia in seguito alle reazioni metaboliche che a stimoli esterni: radiazioni ionizzanti,

elevata tensione di ossigeno, sostanze chimiche, farmaci, stress. Di questi fanno parte le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si suddividono in:

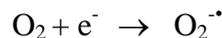
-Radicaliche :

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

-Non radicaliche:

- H_2O_2 : perossido di idrogeno

Il radicale superossido ($O_2^{\bullet-}$) può essere prodotto a livello della catena di trasferimento elettronico mitocondriale per trasferimento di un elettrone dai trasportatori di elettroni direttamente all'ossigeno che quindi viene ridotto a radicale superossido:



Nelle nostre cellule questo radicale viene dismutato in acqua ossigenata ed ossigeno, attraverso una reazione nella quale una molecola di superossido si ossida diventando ossigeno e l'altra si riduce e si protona diventando acqua ossigenata. Questa reazione è catalizzata dall'enzima superossido dismutasi:



Il radicale superossido reagisce con proteine, lipidi, polisaccaridi e acidi nucleici, ma la sua reattività è piuttosto bassa, tanto che non rappresenta una sostanza eccessivamente tossica per l'organismo. La sua azione tossica dipende in larga misura dalla produzione di acqua ossigenata e dall'interazione con essa.

Il perossido d'idrogeno può essere ottenuto mediante riduzione bivalente dell'ossigeno.



Oppure indirettamente, mediante riduzione univalente dell' O_2 a superossido, seguita da dismutazione (equazione 1).

Nelle cellule l' H_2O_2 si forma come prodotto primario della riduzione dell'ossigeno da parte di numerose ossidasi la maggior parte delle quali è localizzata a livello dei perossisomi. L' H_2O_2

può essere citotossico e, ad alte concentrazioni, è usato come disinfettante. La pericolosità dell'acqua ossigenata non è dovuta ad un suo attacco diretto a livello dei componenti cellulari, bensì all'interazione con le forme ridotte di alcuni metallo-ioni come il ferro bivalente o il rame monovalente che porta alla formazione del radicale idrossile e dello ione ossidrilico, secondo la reazione di Fenton:



Il radicale idrossile (HO^\bullet) è una specie estremamente reattiva in grado di interagire molto velocemente con qualsiasi molecola, ossidandola ed è responsabile del danno a DNA, lipidi e proteine

I radicali perossilici derivano dalla reazione dell'ossigeno con radicali centrati sul carbonio (R^\bullet):



Queste specie radicaliche sono la causa principale della propagazione delle catene di autoossidazione come la perossidazione lipidica. I radicali alcossilici si formano dal decadimento di radicali perossilici.

I radicali liberi agiscono a livello:

- *delle membrane cellulari* portando alla perossidazione lipidica che comporta:

- perdita di grassi polinsaturi;
- alterazione di fluidità;
- alterazione della permeabilità della membrana; vengono alterati i rapporti tra i lipidi e le proteine che sono immerse nella membrana;
- danni agli enzimi associati alla membrana;
- alterato trasporto ionico; molte proteine hanno funzione di trasporto;

- *delle proteine*. L'aconitasi, un enzima del ciclo di Krebs, è un esempio di proteina danneggiata dai radicali liberi. Essa contiene nel suo sito attivo un "cluster" $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$, che è il principale bersaglio dei superossidi. È stato proposto che il "cluster" $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$, venga ossidato dallo ione superossido, formando il "cluster" inattivo $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ a causa del rilascio reversibile del ferro⁶⁹. In questa reazione i probabili prodotti sono ferro (II) e H_2O_2 , perciò, l'inattivazione dell'aconitasi mitocondriale, mediata dal superossido, potrebbe incrementare la formazione del radicale idrossilico (OH^\bullet) attraverso la reazione di Fenton nei mitocondri. Questa selettiva e reversibile

distruzione dei “cluster” [4Fe-4S], può essere usata per stimare la concentrazione dei superossidi nelle cellule di mammifero⁷⁰. Nelle cellule sane, l’accumulo di proteine ossidate è prevenuto dalla eliminazione, poiché esse sono più suscettibili alla proteolisi. Le proteine degradate sono sostituite da altre sintetizzate de novo, che contengono grandi quantità di aminoacidi riciclati. Se l’attacco ossidativo è forte, può essere superata la capacità proteolitica delle cellule e in tali condizioni le proteine non digerite possono formare aggregati dannosi per la normale funzione cellulare.

- *degli acidi nucleici* (Dna nucleare e mitocondriale, Rna); l’ossidazione porta alla comparsa di punti di rottura nella doppia elica del Dna con la formazione di legami destabilizzanti che possono sfociare in mutazioni.

I siti maggiormente coinvolti nella produzione di ROS sono localizzati a livello della catena di trasporto degli elettroni (Figura 3). Ubichinone e NADH-deidrogenasi sono tra i componenti più facilmente autoossidabili della catena di trasferimento elettronico. L’ubichinone si alterna tra gli stati di chinone (completamente ossidato), semichinone (il prodotto della riduzione monovalente); durante tale processo vi è la tendenza per un elettrone di passare direttamente all’ossigeno invece che al seguente carrier di elettroni nella catena, con conseguente generazione di superossido. La catena di trasporto mitocondriale può, quindi, cedere un elettrone all’ossigeno mediante il radicale semichinone dell’ubichinone^{71,72}.

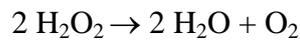
Il radicale superossido che ne risulta può dare origine al perossido di idrogeno attraverso una reazione di dismutazione catalizzata dalla superossido dismutasi (equazione 1). Si ritiene comunemente che la generazione mitocondriale di O_2^{\bullet} rappresenti la maggior fonte intracellulare di radicali dell’ossigeno in condizioni fisiologiche.

L’organismo possiede meccanismi biochimici per la difesa contro i danni da radicali liberi. Si definisce antiossidante qualsiasi sostanza che, presente a concentrazioni basse rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ritarda o inibisce significativamente l’ossidazione di tale substrato. La difesa antiossidante si esplica attraverso sistemi enzimatici, quali:

- la superossido dismutasi (SOD);
- la catalasi (CAT);
- la glutatione perossidasi (GPX);

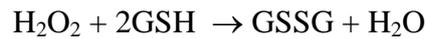
La SOD catalizza la conversione di O_2^{\bullet} in H_2O_2 ⁷³, tramite l’equazione 1 in modo da prevenirne l’azione tossica di O_2^{\bullet} sui tessuti. Vi sono due tipi di superossido dismutasi, una Mn-dipendente localizzata nei mitocondri, l’altra Cu- e Zn-dipendente localizzata nel citoplasma. L’ H_2O_2

prodotta dalla SOD deve essere convertita in H₂O per impedire che i complessi degli ioni metallici la convertano in •OH ; l'enzima deputato a questa funzione è la CAT⁷⁴ :



L'attività di questo enzima aumenta all'aumentare della produzione di H₂O₂.

La GPX rimuove l' H₂O₂ utilizzando come donatore di idrogeno il glutatione (GSH) :



La glutatione perossidasi è costituita da quattro subunità proteiche, ciascuna delle quali contiene nel sito attivo un atomo di selenio come selenocisteina⁷⁵, per cui tracce di Se sono essenziali nella dieta. Questo enzima è presente in tutti i tessuti, particolarmente in quelli a basso contenuto di CAT (muscolo e regioni del cervello). Il fegato invece contiene alte concentrazioni di entrambi gli enzimi. L'efficienza del sistema GPX-GSH richiede la riconversione del GSSG (glutatione ossidato) a GSH catalizzata dalla glutatione riduttasi (GR), la quale mantiene il rapporto GSH/GSSG ad un livello alto (> 10:1).



La reazione richiede NADPH che è prodotto nel ciclo dei pentosi-fosfato, mediante l'intervento sia della glucosio-6-fosfato deidrogenasi che della 6-fosfogluconato deidrogenasi.

Il meccanismo di difesa contro i radicali liberi può essere attuato non solo dall'azione degli enzimi antiossidanti ma anche attraverso antiossidanti esogeni che provengono dall'alimentazione come l'acido ascorbico (o vitamina C) e il tocoferolo (o vitamina E).

3.3 β-ossidazione mitocondriale

La β-ossidazione mitocondriale è un processo coinvolto nella degradazione di acidi grassi a corta, a media, a lunga catena, i cui enzimi coinvolti sono localizzati a livello della matrice mitocondriale. Mentre gli acidi grassi a corta e media catena entrano liberamente nei mitocondri, quelli a lunga catena, per passare dal citoplasma cellulare alla matrice mitocondriale, necessitano di un trasporto regolato dall'attività dell'enzima CPT1. Questo trasporto è essenziale per il metabolismo energetico della cellula, in quanto è nella matrice mitocondriale che gli acidi grassi vengono β-ossidati⁷⁶. In particolare, gli acidi grassi una volta entrati devono subire una reazione ATP dipendente che porta alla formazione di un legame tioestere tra il gruppo carbossilico

dell'acido grasso ed il gruppo tiolico del coenzima A, formando così acil-CoA. L'acil-CoA ottenuto non può attraversare la membrana mitocondriale interna. Il gruppo acilico deve essere trasferito alla carnitina e questo avviene, appunto, ad opera della CPT1, localizzata sulla membrana mitocondriale esterna. Sulla membrana interna del mitocondrio, invece, è localizzato l'enzima carnitina-palmitoil transferasi II (CPT2), che catalizza la reazione di transesterificazione degli acidi grassi con CoA mitocondriale, rilasciando carnitina libera. A questo punto l'acil-CoA può andare incontro a successive reazioni enzimatiche caratteristiche della β -ossidazione. Gli elettroni, liberati durante l'ossidazione degli acidi grassi, passano attraverso la catena respiratoria dei mitocondri e, attraverso questa via, arrivano all'ossigeno con la concomitante fosforilazione di ADP ad ATP. (Figura 6).

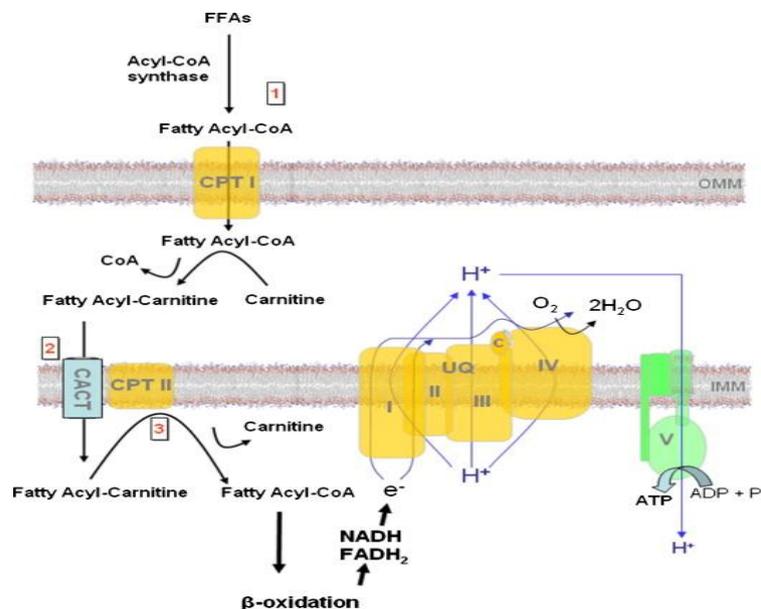


Figura 6. Trasporto degli acidi grassi a livello mitocondriale e β -ossidazione

La disfunzione della catena respiratoria mitocondriale può direttamente portare alla produzione di ROS. Se il trasporto degli elettroni viene interrotto in qualche punto della catena respiratoria, il complesso respiratorio precedente all'interruzione può trasferire elettroni all'ossigeno molecolare con produzione, come visto in precedenza, di anione superossido e perossido d'idrogeno⁷⁷.

CAPITOLO 4

LA FLORA BATTERICA INTESTINALE

Un insieme diversificato di microrganismi vive nel nostro corpo beneficiando dell'ambiente ricco di nutrienti fornito dall'ospite. La maggior parte di essi risiede nel nostro intestino. Alla nascita il tratto digestivo umano è rapidamente colonizzato da un vasto numero di microbi intestinali tanto che dopo lo svezzamento esso contiene circa 100 trilioni di microrganismi (batteri, virus, funghi, lieviti, archea e protozoi, che costituiscono il microbiota intestinale⁷⁸. Le cellule microbiche sono presenti in una misura 10 volte superiore rispetto alla comunità cellulare che compone l'intero organismo umano ed il loro pool genico (microbioma) è 150 volte più ampio del genoma umano⁷⁹. Tutte le funzioni codificate da questi geni microbici sono essenziali per la loro sopravvivenza, ma essi assumono anche funzioni biologiche e metaboliche che non possono essere svolte dall'ospite⁸⁰. Inoltre, gran parte dell'attività microbica è fondamentale per la fisiologia umana includendo attività di controllo dell'omeostasi energetica, di regolazione del sistema immunitario, di sintesi delle vitamine e di digestione dei nutrienti^{81,82-85}. Dunque il microbiota intestinale può essere considerato un organo a tutti gli effetti, coinvolto in una relazione simbiotica con l'ospite. Una caratteristica fondamentale di questa relazione è il dinamismo dell'interazione. A differenza del genoma dell'ospite, il microbioma può cambiare molto rapidamente (o per modifiche nella composizione della comunità microbica o per cambiamenti nel genoma microbico individuale) ed è influenzato da vari componenti⁸⁶. Le caratteristiche intrinseche dell'ospite, dieta ed altri fattori ambientali influenzano sia il microbioma che le attività metaboliche della flora batterica intestinale (Fig.7). Tuttavia, definire il contributo di ogni singolo fattore nel modificare il microbiota intestinale resta ancora materia di dibattito⁸⁷.

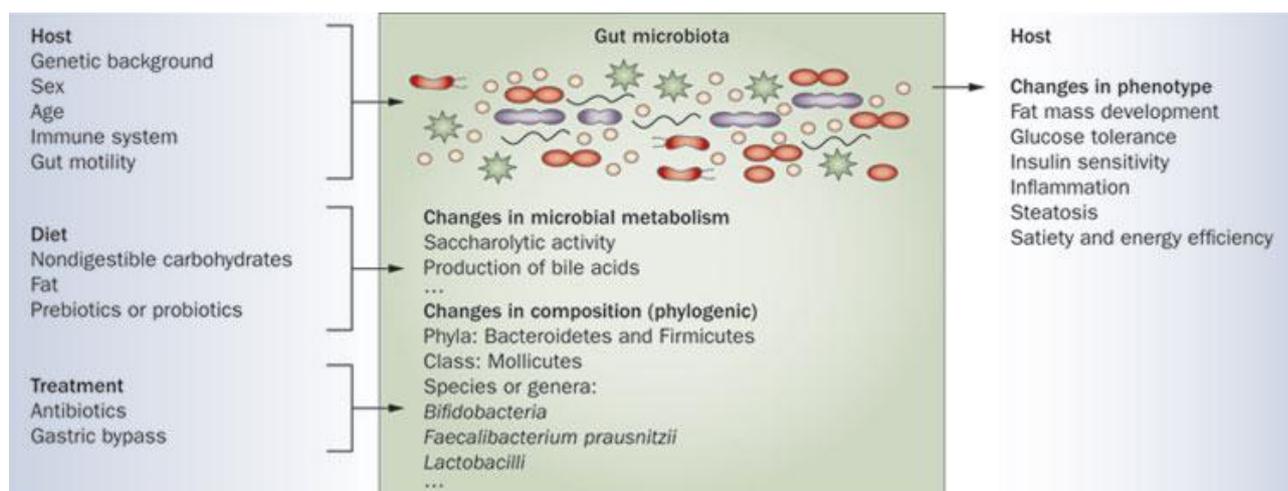


Figura 7. Le caratteristiche intrinseche dell'ospite e la dieta influenzano la composizione e l'attività metabolica del microbiota intestinale. (Delzenne NM e Cani PD, Nature Reviews Endocrinology,2011).

Il microbiota intestinale consiste di circa 1000-1150 differenti specie batteriche classificate in base ad una classificazione a diversi livelli. Il primo grado tassonomico per i batteri è il phylum. Ogni phylum è suddiviso in classe, ordine, famiglia, genere e specie. Sorprendentemente più del 90% dei batteri presenti nel microbiota intestinale appartiene a soli 3 phyla: Firmicutes (60-80% di tutti i taxa batterici), Bacteroidetes (20-40% dei totali taxa batterici) e Actinobacteria (fig.4). Il 10% dei batteri rimanenti appartiene ad altri phyla come: Proteobacteria, Verrucomicrobia e Cyanobacteria (fig.4). Alcune delle specie batteriche si riscontrano nella maggior parte della popolazione ma l'abbondanza relativa di ogni specie può variare enormemente ed ogni persona possiede una specifica discendenza batterica presente nella propria comunità microbica intestinale⁸⁸.

4.1 Genesi della microflora

La colonizzazione del tratto gastrointestinale ha inizio dalla nascita e continua con l'avanzare dell'età fino a formare una microflora peculiare per ciascun individuo. I fattori che influiscono sulla qualità della microflora sono numerosi; in pratica, la qualità della flora intestinale è la risultante di processi di selezione che si verificano nei confronti di batteri materni o ambientali che vengono a contatto con l'intestino del neonato. Un fattore determinante è rappresentato dall'alimentazione. Nei neonati allattati al seno predominano Bifidobatteri e, in minor misura, Lattobacilli, rispetto ad altre specie potenzialmente pericolose, mentre i neonati allattati artificialmente presentano, oltre che Bifidobatteri, *Bacteroides* e, in minor misura, *Escherichia*

coli, Stafilococchi e Clostridi⁸⁹; inoltre, tale flora si insedia più precocemente. I fattori alla base di queste differenze possono essere diversi:

- la presenza di IgA secretorie e di lisozima nel latte di donna possono inibire la crescita di alcuni batteri ed inibirne la traslocazione⁹⁰;
- la presenza nel latte di donna di alcuni composti secondari (prebiotici naturali) può favorire lo sviluppo di alcuni Bifidobatteri. Sono costituiti prevalentemente da oligosaccaridi non assorbibili (lattosio con acetilglucosamina, galattosio, fucosio ed acido sialico), ma anche gangliosidi e nucleotidi possono avere un effetto favorente la colonizzazione da parte di Bifidobatteri;
- la presenza, nel latte di donna, di N-acetil-glucosamina e di oligosaccaridi rende il pH delle feci più acido nei neonati allattati al seno; ciò favorisce la crescita di flora lattica e bifida, che tollera maggiormente l'acidità⁹¹;
- è stato proposto che la presenza di lattoferrina faciliti l'assorbimento intestinale del poco ferro contenuto nel latte, rendendolo non disponibile per i batteri che ne necessitano, in particolare *Bacteroides* ed Enterobatteri⁹¹; ciò favorisce la crescita di Bifidobatteri e Lattobacilli che non necessitano di ferro; con l'alimentazione artificiale, la lattoferrina bovina viene denaturata dal calore, pertanto *Bacteroides* ed Enterobatteri hanno una maggiore disponibilità di ferro. Secondo alcuni autori, l'attività della lattoferrina di favorire la crescita di Bifidobatteri non è in relazione con la sua capacità di legare il ferro, ma è dovuta ad una sua intrinseca attività antibatterica;
- un basso rapporto caseina/proteine del siero favorisce la crescita di Bifidobatteri e Lattobacilli; nel latte di donna tale rapporto è 2:3, mentre nel latte di mucca è 4:1.

Con lo svezzamento, si assiste ad un cambiamento della flora intestinale. In pratica, l'aggiunta di alimenti diversi dal latte in un apparato digerente le cui funzioni non sono ancora pienamente sviluppate fornisce substrati diversi utilizzabili dai batteri. Ciò è alla base del radicale cambiamento qualitativo della flora intestinale in questo periodo della vita, che si arricchisce di specie presenti anche in età adulta, in particolare di *Bacteroidetes* e di *Firmicutes*. Al primo anno di vita i livelli di *Escherichia Coli* ed Enterococchi oscillano tra 10^6 e 10^8 CFU/g di feci, mentre si verifica una diminuzione dei Clostridi ed un aumento della flora anaerobica che va via via a diversificarsi. L'iniziale colonizzazione risulta importante per definire la flora batterica definitiva in età adulta, infatti, una volta costituitasi, essa rimane stabile ad eccezioni di possibili variazioni a seguito di fattori di varia natura come ad esempio un cambiamento delle abitudini alimentari o l'insorgenza di patologie.

4.2 Distribuzione della microflora nel tratto intestinale dell'adulto

Su una superficie di circa 250 m² di intestino la flora batterica intestinale costituisce un ecosistema complesso, formato da oltre 400 specie batteriche, sia aerobiche che anaerobiche, variamente distribuite lungo l'intero tratto intestinale. In particolare la densità cresce in maniera esponenziale dalla porzione superiore a quella inferiore dell'intestino.

Notoriamente, l'ambiente gastrico, col suo pH acido (intorno a 2), costituisce una vera e propria barriera chimica che si oppone all'ingresso di batteri estranei provenienti dalla cavità orale all'interno del tratto intestinale. Lo stomaco umano è privo di una vera e propria flora normale, ma sono stati rinvenuti nel lume Streptococchi e Lattobacilli⁹² e la sua parete può essere colonizzata da microrganismi particolarmente adattati, come *Helicobacter pylori*, responsabile delle ulcere gastriche. L'importanza della barriera gastrica è dimostrata dal fatto che l'acloridria o la gastrectomia determinano un incremento del contenuto batterico intestinale, sia di specie aerobiche che anaerobiche. Nel tenue, il numero dei batteri aumenta progressivamente dal duodeno all'ileo. Nel duodeno, la flora riflette quella dello stomaco sia quantitativamente che qualitativamente, mentre la densità batterica nel digiuno è 10⁵ CFU/ml. Nell'ileo distale, il numero e il tipo di specie batteriche tendono ad avvicinarsi a quello del colon; la densità batterica è 10⁶ CFU/ml⁹². Nel crasso, la concentrazione e la composizione batterica non sono uguali in tutte le parti. Nel cieco, la concentrazione batterica è 10⁸ CFU/ml, mentre nel colon di sinistra e nelle feci all'emissione è 10¹⁰ CFU/ml. Ciò dimostra che, anche tenendo in conto l'assorbimento idrico (dai 500 ml che entrano nel cieco dall'ileo ai 50-100 ml di acqua contenuta nelle feci), la proliferazione batterica nel crasso è notevole. Gli anaerobi facoltativi (Lattobacilli ed *Escherichia coli*) rappresentano una percentuale importante (circa il 25%) della microflora del cieco, mentre nelle feci all'espulsione prevalgono nettamente gli anaerobi obbligati (Bifidobatteri, *Bacterioides* e Clostridi)⁹³. Nel colon il rapporto anaerobi/ aerobi è di 103:1 ed il 99% dei batteri presenti sono bacilli anaerobi non sporigeni. Le specie batteriche reperibili nelle feci variano notevolmente tra i diversi individui; volendo trovare un denominatore comune, si può dire che i generi più rappresentati sono, tra gli anaerobi obbligati, *Bacteroides* (*fragilis* come specie frequente), *Bifidobacterium* (come specie frequenti: *adulescentis* e *longum* negli adulti; *infantis*, *breve* e *longum* nei bambini), *Eubacterium* (*narofaciens* come specie frequente); ma anche i generi *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus*. Gli anaerobi facoltativi sono in quantità minore; i più rappresentativi sono: *Escherichia coli*, Streptococchi (*viridans* e *salivarius*), Klebsielle, Lattobacilli (*L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*).

È noto da tempo che la composizione della microflora è abbastanza stabile. I fattori che limitano la colonizzazione sono rappresentati principalmente dalla normale peristalsi, che determina la regolare eliminazione di quote di batteri con le feci e dalla presenza del tessuto linfoide intestinale.

A tutt'oggi, le conoscenze sulle specie batteriche che costituiscono la microflora intestinale non sono complete. Classicamente, l'identificazione dei batteri si basa su tecniche fenotipiche, biochimiche o sierologiche che necessitano della disponibilità del microrganismo sotto forma di coltura pura ottenuta dal materiale fecale utilizzando opportuni terreni di crescita. Tuttavia, molti batteri non sono coltivabili utilizzando le tecniche correnti a causa di particolari esigenze nutrizionali, della tossicità di sostanze contenute nei terreni di crescita, della necessità di atmosfere gassose controllate o della necessità di interagire con altre specie batteriche o con le cellule dell'ospite. Per evitare questi limiti bisogna ricorrere a tecniche di analisi non-colturali. Oggi, l'analisi genomica consente di esplorare il mondo microbico includendo anche specie finora mai osservate⁹⁴. L'identificazione microbica basata sullo studio del rRNA batterico è uno degli strumenti più potenti e versatili per lo studio delle comunità microbiche complesse. La sua applicazione allo studio delle popolazioni microbiche intestinali ha permesso di raggiungere conoscenze più approfondite sulla loro composizione⁹⁵.

4.3 Analisi del microbiota intestinale

Un'analisi approfondita e globale del microbiota intestinale è fondamentale per comprendere le eventuali correlazioni tra le comunità microbica residenti e le loro interazioni con l'ospite. Per questo scopo ci sono due importanti categorie di approcci metodologici; le tecniche coltura-dipendenti e coltura-indipendenti. Da sempre, l'analisi del microbiota intestinale è stata effettuata con tecniche basate sui mezzi di coltura. Tuttavia, tale approccio non consente una visione globale della comunità microbica intestinale, dunque la descrizione di tali tecniche non verrà approfondita in questo capitolo⁹⁶. Durante gli ultimi anni, sono sorte numerose e rivoluzionarie tecniche coltura-indipendenti. Innanzitutto, la composizione microbica dell'intestino è stata delucidata grazie a saggi molecolari che implicano l'analisi dell'RNA ribosomale 16S (16S RNA). Esempi di queste tecniche sono l'ibridazione fluorescente in situ (FISH), fingerprinting genetico, DNA microarrays e la PCR quantitativa. Sebbene queste tecniche sono state ampiamente utilizzate per decifrare le relazioni tra composizione del microbiota intestinale e varie patologie, tale associazione è solo parziale in quanto la composizione del microbiota non è semplicemente tradotta in funzioni metaboliche⁹⁶. Solo delle ipotesi sulle capacità metaboliche del microbiota intestinale possono essere dedotte dalla

presenza di specifiche sottopopolazioni. Più recentemente le tecniche sono state sviluppate allo scopo di decifrare le funzioni metaboliche della flora batterica intestinale. Esse sono basate sull'analisi della totalità dei geni che costituiscono l'intero microbioma. Ogni tecnica possiede i suoi vantaggi e svantaggi e differenti tecniche possono essere utilizzate in parallelo allo scopo di ottenere informazioni complementari.

4.3.1 Sequencing

La tecnica consiste nel sequenziare ampliconi del gene 16S rRNA precedentemente generati tramite PCR su regioni variabili specifiche all'interno del gene 16S rRNA. Per anni è stato ampiamente utilizzato il metodo di sequenziamento Sanger, ma oggi vengono preferite le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (454 Pyrosequencing, Illumina o Solid) in quanto presentano un più alto rendimento. Questi metodi permettono un sequenziamento parallelo massivo e generano gigabasi di dati con una singola corsa. Ulteriori vantaggi di queste tecniche includono l'identificazione filogenetica e la rivelazione e l'individuazione di specie batteriche ancora sconosciute. Tuttavia queste analisi di sequenziamento richiedono l'utilizzo di vaste analisi bioinformatiche. Per determinare la composizione batterica, i geni sequenziati del 16S rRNA sono assemblati in OTUs (operational taxonomic units) basate sulla loro percentuale di identità di sequenza. La percentuale di identità di sequenza utilizzata determina il livello di tassonomia: OTUs che contengono sequenze con più del 99% di identità sono classificate come taxa, ceppi batterici con più del 97% di identità sono considerati appartenenti alla stessa specie, differenti specie dello stesso genere hanno OTUs con più del 95% di identità mentre OTUs che superano il 90% di identità designano la famiglia⁹⁷. È importante ricordare che l'analisi del microbiota intestinale richiedendo l'estrazione del DNA ed utilizzando lo step di amplificazione tramite PCR presenta altri limiti. Ogni step delle estrazioni di DNA e delle successive elaborazioni rappresenta una potenziale fonte di errore. Inoltre, le tecniche che coinvolgono un passaggio con amplificazione tramite PCR contengono sempre un errore dovuto al fatto che il gene target che deve essere amplificato in ogni specie non sarà amplificato con la stessa efficienza.

4.4 Funzioni della microflora

- Attività metaboliche e nutrizionali: la microflora è in grado di influenzare il bilancio energetico dell'organismo ospite come dimostrato da diversi studi su animali germ-free in cui è richiesto un 30% in più di energia nella normale dieta per mantenere il peso ideale. I batteri intestinali traggono l'energia necessaria attraverso il metabolismo di zuccheri e

proteine (processo noto col termine di fermentazione). La trasformazione di polisaccaridi non digeribili della dieta (cellulosa, emicellulosa, pectine, gomme, amido non digeribile) avviene ad opera di enzimi batterici che trasformano il materiale derivante dagli alimenti in sostanze volatili (anidride carbonica, idrogeno solforato etc.) e acidi grassi a corta catena (SCFA - Short Chain Fatty Acids). Tra questi: l'acido acetico (viene riassorbito dalla parete intestinale, riversato nel circolo periferico e utilizzato come substrato energetico dai vari tessuti tra cui il tessuto adiposo per la lipogenesi); l'acido butirrico (fonte energetica per le stesse cellule intestinali)⁹⁸ e l'acido propionico (riassorbito a livello intestinale, viene utilizzato dal fegato come substrato gluconeogenico). Questi acidi grassi, se, da un lato, rappresentano una trascurabile fonte energetica nell'uomo (ma fondamentale nei ruminanti, che formano acidi grassi dall'acido acetico e carboidrati dall'acido propionico per gluconeogenesi), dall'altro, modulano il turnover e la differenziazione dei colociti. In particolare, l'acido butirrico, secondo alcuni autori, ha attività antineoplastica, in quanto, in vitro, facilita l'apoptosi ed inibisce alcune fasi della cancerogenesi. In età neonatale, gli acidi grassi volatili, in quanto osmoticamente attivi, svolgono anche un ruolo importante nell'equilibrio idro-elettrolitico; la loro produzione ed il loro assorbimento inducono assorbimento idrico nel colon. La sintesi degli acidi grassi (definita fermentazione saccarolitica) determina un'acidificazione del pH intestinale, ciò rappresenta un'efficiente sistema di difesa contro microrganismi patogeni. La produzione di SCFA, inoltre, consente la crescita delle cellule intestinali epiteliali, favorendone la proliferazione e la differenziazione⁹⁹;

- Sviluppo, stimolazione e modulazione del sistema immunitario: durante la vita di un individuo, la mucosa intestinale viene a contatto con un numero incalcolabile di antigeni (batteri, virus, parassiti, antigeni alimentari, farmaci e diverse altri composti chimici); pertanto, è fondamentale la presenza di difese che assicurino una adeguata protezione immunitaria. Tale compito viene svolto dal tessuto linfoide nell'intestino (Gut-Associated Lymphoid Tissue: GALT). Tale tessuto è costituito da linfociti presenti tra le cellule epiteliali, da linfociti e plasmacellule presenti nel connettivo della lamina propria, da follicoli linfatici isolati (più frequenti nel colon) o aggregati (placche del Peyer, nell'ileo). Il ruolo fisiologico della microflora intestinale si evidenzia dagli studi sugli animali "germ free". Istologicamente, in questi animali, l'epitelio intestinale ed i villi sono più sottili e con poche cellule cubiche (anziché colonnari); le cripte sono poco profonde. Il turnover cellulare è ridotto. La lamina propria è rappresentata da uno strato connettivale poco compatto, con pochi linfociti e macrofagi; assenti sono le plasmacellule. Le placche del Peyer sono più

piccole e con pochi centri germinativi. Il numero delle immunoglobuline circolanti è inferiore. Funzionalmente, ridotti lo svuotamento gastrico, la motilità ed il transito intestinale; il cieco è notevolmente slargato e inefficiente, pertanto è notevolmente compromesso l'assorbimento idrico. Queste alterazioni regrediscono con la colonizzazione intestinale¹⁰⁰. La colonizzazione intestinale è di fondamentale importanza per lo sviluppo del sistema immunitario¹⁰¹. Questo concetto è facilmente comprensibile se si pensa alla enorme quantità di antigeni che raggiunge l'apparato digerente. La concentrazione più rilevante di cellule immunitarie dell'organismo si trova nell'apparato digerente. L'esempio più tipico dell'importanza della colonizzazione intestinale sullo sviluppo di una corretta risposta immunitaria è rappresentato dallo sviluppo della tolleranza orale. Nel soggetto normale, non si sviluppa una risposta sistemica mediata da IgE all'ingestione di un antigene¹⁰². Ciò avviene invece negli animali germ-free; la colonizzazione di questi ultimi, effettuata nei neonati, ma non negli adulti, corregge tale anomalia. Questi dati sottolineano l'importanza della flora intestinale in età neonatale. Infatti, lo stabilirsi di una flora appropriata in tempi fisiologici, quale quella che si sviluppa con l'alimentazione al seno, favorisce l'evoluzione di una risposta immunitaria adeguata¹⁰³. Esiste un equilibrio tra stimolazione antigenica e risposta immunitaria. Una risposta immunitaria particolarmente aggressiva, indotta da componenti antigeniche della microflora, in soggetti geneticamente predisposti, è alla base delle malattie infiammatorie intestinali, così come una risposta debole relativamente all'aggressività batterica induce iperproliferazione e diffusione dei batteri nell'organismo (translocazione).

- Difesa contro batteri esogeni: i batteri della microflora intestinale rappresentano essi stessi una difesa contro le infezioni da parte di batteri esogeni introdotti con gli alimenti, in quanto inibiscono la loro adesione ai colocoliti, competono con essi per i substrati metabolici, producono sostanze ad attività antibatterica¹⁰⁴. *Bifidobatteri* e *Lattobacilli* aderiscono alle cellule intestinali; alcuni ceppi inibiscono l'adesione da parte di diverse specie patogene (*Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*). L'adesione avviene tramite proteine specie-specifiche. Diverse specie batteriche producono sostanze ad attività antibiotica, le batteriocine, che inibiscono la crescita di altre specie. Anche gli acidi grassi volatili prodotti da diverse specie batteriche anaerobiche della microflora sono tossiche per altre specie batteriche, come *Enterobatteri* ed *Enterococchi*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*.
- Sintesi di vitamine: la flora batterica intestinale è in grado di sintetizzare alcune vitamine, in particolare del gruppo B e la vitamina K¹⁰⁵. L'entità di tale sintesi è variabile e, di solito,

nutrizionalmente non rilevante; inoltre, l'assorbimento vitaminico nella mucosa del colon non è elevato.

4.5 Omeostasi metabolica e flora batterica intestinale

Ad oggi è stato ampiamente accettato che la flora batterica intestinale regola importanti funzioni biologiche e metaboliche incidendo sul bilancio energetico, metabolismo glucidico ed infiammazione di basso grado⁴¹ associata all'obesità ed ai disordini ad essa correlati. Molti studi, infatti, hanno dimostrato che la flora intestinale di ciascun individuo possiede una propria efficienza metabolica. Quest'ultima sarebbe correlata ad una diversa composizione del microbiota stesso. Nel 2004 il gruppo di ricerca di Jeffrey Gordon (Washington University, USA), ha evidenziato una possibile relazione tra la composizione della flora microbica intestinale e l'obesità, focalizzando l'attenzione sulle proporzioni delle due principali divisioni batteriche componenti il microbiota: i *Firmicutes* e i *Bacteroidetes*. Da questi studi emerge una prevalenza dei primi rispetto ai secondi nel soggetto obeso. Questo fenotipo obeso è incredibilmente trasmissibile in quanto la colonizzazione di topi germ-free con una flora batterica di derivazione obesa determina un aumento del grasso totale pari al 60% in più rispetto a topi colonizzati con la flora batterica di un topo normopeso. L'aumento di tessuto adiposo, inoltre, si verifica indipendentemente dalla quantità di flora batterica acquisita o dalla diminuzione nel dispendio energetico. La grande varietà di specie batteriche presenti in questi phylum contribuisce ad una diversa efficienza nell'estrazione di energia a livello intestinale. I meccanismi ipotizzati attraverso i quali il microbiota intestinale influenzerebbe l'estrazione di calorie dagli alimenti sono diversi:

- la flora batterica è in grado di produrre molte idrolasi di glucosidi che si occupano della digestione di polisaccaridi complessi derivanti dai vegetali, in questo modo i carboidrati complessi sono metabolizzati in monosaccaridi e acidi grassi a corta catena (SCFAs), importante fonte energetica per l'organismo;
- la colonizzazione dei topi germ-free con il fenotipo batterico obeso sopprime l'espressione di un inibitore della Lipoproteina Lipasi circolante (LPL), il Fasting-induced adipose factor (Fiaf). L'aumento dei livelli di LPL porta ad un aumentato uptake cellulare di acidi grassi dai triacilgliceroli associati alle lipoproteine;
- l'Adenosine Monophosphate (AMP)-activated Protein Kinase (AMPK) è un enzima ereditato dai lieviti in grado di proteggere il topo dall'obesità indotta da alimentazione ricca di zuccheri e grassi, tipica della dieta occidentale. L'enzima, che controlla lo stato energetico cellulare, tramite fosforilazione, si attiva in risposta a condizioni di stress e monitora lo stato energetico cellulare. I

topi germ-free rimangono magri nonostante l'alto introito calorico introdotto: gli alti livelli di AMPK fosforilata nel fegato e nel muscolo scheletrico determinano un aumento dell'ossidazione degli acidi grassi nei tessuti periferici, una diminuzione dei livelli di glicogeno e un'umentata sensibilità all'insulina nel fegato.

Il lipopolisaccaride (LPS) di batteri Gram negativi è stato indicato come uno dei fattori maggiormente coinvolti nell'insorgenza e nella progressione dell'infiammazione e dei disordini metabolici correlati all'obesità. L'LPS viene continuamente prodotto, a livello intestinale, attraverso la lisi dei batteri e successivamente assorbito e trasportato dall'intestino ai tessuti da un meccanismo lipoproteina dipendente. L'LPS induce la secrezione di citochine proinfiammatorie (IL-1, IL-6, TNF α) quando si lega al complesso CD14/TLR4 sulla superficie delle cellule del sistema immunitario. E' stato dimostrato che l'introduzione di grassi nella dieta facilita lo sviluppo di endotossiemia metabolica (per esempio aumentati livelli plasmatici di LPS) ed è stato ipotizzato che tale endotossiemia potrebbe essere direttamente correlata alla composizione e all'attività del microbiota intestinale⁴¹. Endotossiemia e tossine di origine intestinale sembrano avere un ruolo causativo nell'insorgenza e nella progressione dell'infiammazione epatica e dei danni causati da malattie croniche del fegato¹⁰⁶.

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è una delle complicanze maggiormente riscontrate in caso di obesità e sindrome metabolica. Questa componente epatica della sindrome metabolica include un complesso spettro di cambiamenti patologici che vanno dalla steatosi alla steatoepatite non alcolica (NASH), fibrosi e cirrosi¹⁰⁷. Un aumento eccessivo di batteri intestinali indotto dalla dieta, l'assottigliamento della barriera mucosale intestinale e l'aumentato assorbimento di endotossine sono stati associati con l'instaurarsi di NAFLD/NASH sia in studi su roditori che su pazienti umani¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Un'ulteriore conferma della stretta correlazione tra flora batterica intestinale e fegato deriva da studi su topi con steatoepatite non alcolica nei quali l'uso di probiotici migliorava la patologia epatica e la sindrome metabolica. Inoltre, Li et al. hanno dimostrato che il trattamento con probiotici portava ad un miglioramento dell'insulino resistenza, del quadro istologico epatico e del contenuto totale di acidi grassi in topi affetti da NASH¹¹¹.

Numerose evidenze supportano il concetto che il microbiota intestinale partecipa nello sviluppo della massa grassa, dell'insulino resistenza e dell'infiammazione di basso grado associata all'obesità. La flora batterica intestinale sembra essere coinvolta in modificazioni a seguito di specifici trattamenti dietetici e gioca un ruolo cruciale in numerose condizioni associate all'obesità e a diabete di tipo 2 che vanno dall'endotossemia alla funzionalità della barriera intestinale e ai disordini epatici. Tuttavia i numerosi meccanismi grazie ai quali il microbiota

intestinale interagisce con l'ospite, includendo il coinvolgimento diretto di specifici batteri e di metaboliti microbici, resta ancora da chiarire.

CAPITOLO 5

SCOPO DELLA TESI

Sovrappeso ed obesità sono le epidemie del ventunesimo secolo nei paesi sviluppati. Le conoscenze scientifiche e cliniche acquisite negli ultimi anni hanno evidenziato come l'obesità possa essere considerata uno dei fattori che contribuiscono allo sviluppo di una patologia, molto più complessa e grave, che viene individuata comunemente con il termine di "Sindrome Metabolica". Essa deriva da condizioni di metabolismo alterato, come l'incremento dei livelli di colesterolo LDL e di trigliceridi nel sangue ed iperglicemia. Questi fattori di rischio metabolico che caratterizzano la patologia sembrano promuovere in modo diretto lo sviluppo di diabete di tipo II e di malattie cardiovascolari. Nello specifico, per una patologia quale l'obesità, il grasso corporeo accumulato fa sì che si instauri un processo di infiammazione cronica di basso grado che può essere riscontrato sia a livello sistemico che a livello di specifici tessuti. L'aumento esponenziale di tali problematiche ha portato sia ad una rinascita dell'interesse e della consapevolezza dell'alimentazione in relazione a stati di malattia da parte della popolazione in generale, sia ad espandere l'ambito della ricerca scientifica verso nuove ed importanti direzioni.

E' noto che una corretta distribuzione di macronutrienti dall'infanzia all'adolescenza favorisce una crescita corretta e risulta utile a prevenire l'insorgenza dei determinanti di rischio di sindrome metabolica in età adulta, confermando l'importanza di condurre scelte alimentari consapevoli in ogni fase della vita. L'interesse di questa ricerca di dottorato, dedicata appunto a tale ambito, ha come cardine sia la nota importanza dell'allattamento al seno, come primo comportamento nutrizionale, sia la riscoperta dell'utilizzo del latte di asina come prodotto alimentare. Il latte umano è considerato alimento d'elezione per la nutrizione pediatrica. L'unicità della sua composizione garantisce l'assunzione di una vasta gamma di composti benefici per la salute che promuovono un'ottimale crescita, sviluppo neuro cognitivo, resistenza alle infezioni e salute cardiovascolare. Il latte di asina rappresenta l'alimento naturale di origine animale con le caratteristiche fisico-chimiche e le qualità organolettiche e composizionali più vicine a quelle del latte umano. Il ridotto contenuto lipidico ed il basso rapporto omega-6/omega-3 suggeriscono l'utilizzo del latte d'asina sia nelle applicazioni dietetiche sia come alimento funzionale nella prevenzione delle allergie, delle malattie cardiovascolari e nella regolazione del metabolismo lipidico.

A fronte di ciò, lo scopo di questa tesi si focalizza sul confronto degli effetti metabolici dovuti ad una somministrazione di latte bovino, la cui commercializzazione è maggiormente diffusa, con

quelli ottenuti in seguito all'assunzione di latte di asina e latte umano in quantità equicaloriche. In particolare, in un primo disegno sperimentale è stato confrontato l'effetto della somministrazione del latte di asina a quello del latte bovino sull'efficienza energetica corporea, funzionalità mitocondriale epatica e stato infiammatorio. In seguito agli incoraggianti risultati ottenuti, che hanno rimarcato il valore nutritivo del latte di asina evidenziando aspetti di grande significato funzionale e addirittura di prevenzione per molte patologie umane, è stato condotto un secondo disegno sperimentale fondato sull'esigenza di confrontare gli stessi effetti valutati in seguito all'assunzione di latte bovino e latte di asina a quelli ottenuti in caso di somministrazione di latte umano. I dati ottenuti dai due disegni sperimentali sono risultati pienamente equiparabili; per una maggiore chiarezza di esposizione verranno presentati quelli relativi al confronto di tutti e tre differenti tipi di latte.

Infine, è dato acquisito che diete specifiche inducono modificazioni della flora batterica intestinale. Un'interazione complicata tra fattori dietetici, microbiota intestinale e sistema immunitario innato potrebbe essere coinvolta nell'induzione di uno squilibrio metabolico influenzando la funzionalità della barriera intestinale e la risposta infiammatoria. Dunque, un ulteriore obiettivo di questo progetto di ricerca è stato quello di valutare gli effetti della somministrazione di latte di vacca, latte di asina e latte umano sulla composizione del microbiota intestinale e di investigare ed approfondire il ruolo svolto dalla flora batterica intestinale nella regolazione di diverse funzioni metaboliche. Tali dati sono stati ottenuti, durante un periodo di studio all'estero, in collaborazione con il gruppo di ricerca in "Metabolism and Nutrition" del professore Patrice Cani presso l'Université Catholique de Louvain (Bruxelles, Belgio), che da anni focalizza le sue attività scientifiche sulla fisiologia integrativa, il metabolismo e gli approcci nutrizionali al fine di indagare il ruolo del microbiota intestinale nello sviluppo dell'infiammazione e dei disturbi metabolici associati all'obesità.

CAPITOLO 6

PARTE SPERIMENTALE

Negli esperimenti condotti in questa tesi sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Wistar, ottenuti dalla Charles River (Calco, Como, Italia) di 60 giorni d'età.

Gli animali sono stati stabulati singolarmente ad una temperatura di $24^{\circ}\text{C}\pm 1$, sono stati sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce-buio (12 ore di luce/12 ore di buio) ed è stato consentito libero accesso a cibo (mangime standard di laboratorio) ed acqua. Un gruppo di ratti ($n=8$) è stato sacrificato all'inizio del periodo sperimentale per determinare i parametri basali di riferimento utili per la valutazione del bilancio energetico. I rimanenti animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali. Tre gruppi hanno ricevuto un supplemento isoenergetico (82kJ) di latte di vacca (cow milk, CM), latte di asina (donkey milk, DM) e latte umano (human milk, HM) (corrispondente rispettivamente a volumi di 21, 48 e 22 ml/giorno) per 4 settimane. Gli animali che non hanno ricevuto la supplementazione di latte sono stati utilizzati come gruppo controllo.

Peso corporeo ed assunzione di cibo sono stati monitorati ogni giorno per permettere il calcolo del guadagno di peso corporeo e dell'energia assunta sottoforma di cibo. Le feci e il cibo sversato sono stati raccolti quotidianamente durante l'intero periodo di trattamento per ottenere una stima esatta dell'energia metabolizzabile assunta.

Alla fine del periodo sperimentale gli animali sono stati anestetizzati tramite iniezione intraperitoneale di cloralio idrato (40mg/100g peso corporeo) e successivamente sacrificati mediante decapitazione. Il sangue è stato prelevato dalla vena cava inferiore e dalla vena porta. Il fegato è stato rimosso, le sezioni non utilizzate per l'estrazione della frazione mitocondriale sono state immediatamente divise in aliquote, immerse in azoto liquido e conservate a -80°C . Il contenuto intestinale del cieco è stato prelevato e conservato a -80°C per le successive analisi genomiche volte a valutare la composizione del microbiota intestinale.

Trattamento, stabulazione e sacrificio degli animali sono stati eseguiti in conformità alle linee guida del Ministero della Sanità Italiano.

In seguito al sacrificio dei ratti le carcasse sono state pesate, autoclavate per 50 minuti, sminuzzate ed infine omogeneizzate (con una diluizione 1:2 p/v) con un omogeneizzatore

Polytron (circa 15000 rpm per 5 minuti/100 g di carcassa). Aliquote dell'omogenato così ottenute sono state congelate e in seguito utilizzate per le misure del contenuto energetico e della composizione corporea.

Dai campioni di sangue che sono stati prelevati durante il sacrificio dalla vena cava inferiore dei ratti sono stati misurati i livelli serici di parametri specifici indicatori dell'omeostasi lipidica e dello stato infiammatorio. Dai campioni di sangue prelevati dalla vena porta è stato effettuato il dosaggio del lipopolisaccaride (LPS).

Dal momento che il fegato costituisce uno degli organi a maggiore tasso metabolico, appare evidente che la determinazione dell'efficienza metabolica e della massa proteica mitocondriale epatica consentirebbe di acquisire nuove conoscenze sul ruolo svolto da tale tessuto nella regolazione della spesa energetica. In seguito all'isolamento della frazione mitocondriale, ho determinato quindi la massa proteica, la capacità ossidativa e la conduttanza protonica basale e quella mediata dagli acidi grassi a livello epatico.

Inoltre, è noto che l'entità della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) dipende dal grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa, e perciò dall'efficienza. Pertanto un leggero disaccoppiamento, mantenendo il potenziale protonico mitocondriale sotto il livello soglia richiesto per produrre i radicali dell'ossigeno, è funzionale nell'ostacolare l'eccesso di produzione dei ROS. Quindi, per capire se i trattamenti effettuati, agendo sull'efficienza mitocondriale, comportassero anche variazioni della formazione di radicali liberi e quindi un aumento del danno ossidativo cellulare e o delle difese antiossidanti, ho determinato l'attività dell'aconitasi mitocondriale, un enzima del ciclo di Krebs sensibile all'esposizione ai radicali liberi, l'attività di specifici enzimi ad azione disintossicante quali il glutathione-S-transferasi (GST) e il NA(P)H quinone oxidoreductase (NQO1) e il rilascio mitocondriale di H₂O₂.

METODICHE

6.1 Misura del bilancio energetico

Durante tutto il periodo del trattamento dietetico è stato giornalmente controllato sia il peso corporeo sia la quantità di cibo e di latte introdotta dai ratti, per poter così calcolare l'energia introdotta sotto forma di cibo durante l'intero periodo sperimentale, cioè l'introito calorico lordo, considerando il valore energetico della dieta standard di laboratorio (15,88KJ/g) e dei differenti tipi di latte (CM:14,04 kJ/g, DM:13,79 kJ/g, HM:14,01 kJ/g) con cui sono stati nutriti gli animali. Tali valori sono stati ottenuti mediante l'utilizzo della bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico di Parr, esaminato in dettaglio nel paragrafo successivo). L'utilizzo di tale strumento ha consentito la determinazione del contenuto energetico anche delle feci, raccolte durante l'intero periodo sperimentale, e della carcassa da aliquote di omogenato dell'animale essiccato in stufa 60°C per 48 ore.

Partendo da queste misure sono stati calcolati:

- ◆ il *guadagno di peso corporeo*, per differenza tra il peso corporeo misurato alla fine del trattamento e quello misurato all'inizio del periodo sperimentale;
- ◆ il *guadagno lipidico (o quello proteico)*, espresso in kJ, per differenza tra l'energia depositata sotto forma di lipidi (o proteine) misurata nei ratti alla fine del trattamento e quella determinata nei ratti all'inizio del periodo sperimentale;
- ◆ il *guadagno energetico* per differenza tra il contenuto energetico corporeo finale e il contenuto energetico corporeo iniziale;
- ◆ l'*energia metabolizzabile (ME)* introdotta, sottraendo all'introito calorico lordo sia il contenuto energetico delle feci che il 4% dell'energia lorda che si assume essere persa con le urine;
- ◆ l'*efficienza energetica*, ottenuta dal rapporto percentuale tra il guadagno energetico e l'energia metabolizzabile assunta;
- ◆ l'*efficienza di deposito dei lipidi*, ottenuta dal rapporto tra guadagno lipidico ed energia metabolizzabile assunta;
- ◆ la *spesa energetica* in base all'equazione del bilancio energetico, è stata calcolata come differenza tra l'energia introdotta e quella guadagnata.

6.2 Misure dei contenuti energetici – La bomba calorimetrica

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

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

Attraverso il registratore della temperatura collegato al termometro immerso in acqua, viene misurato l'innalzamento termico (ΔT), come differenza tra la temperatura massima alla fine della combustione (T_f) e quella prima della combustione (T_i). La capacità termica C dell'apparecchio è stata determinata utilizzando come standard l'acido benzoico, di cui è noto il calore specifico di combustione (26.4 kJ/g). La variazione di calore (Q) viene calcolata moltiplicando la variazione di temperatura (ΔT) per la capacità termica (C) della bomba calorimetrica, $Q = \Delta T \times C$, così è stato possibile poi calcolare il calore di combustione del campione ΔH espresso come kJ prodotti per grammo di campione secco., il $\Delta H = (Q - f) / m$ dove, m = massa del campione di carcassa in esame, f = correzione per il filo fusibile in calorie.

6.3 Misure della composizione corporea

Dall'omogenato di carcassa sono state prelevate delle aliquote per la determinazione del contenuto di acqua e lipidi. Il contenuto di acqua è stato ottenuto per differenza tra il peso delle aliquote di omogenato prima e dopo dell'essiccamento a 60°C per 48 ore. Il contenuto lipidico è stato calcolato mediante il metodo di Folch¹¹², che consiste in una estrazione iniziale dei lipidi dall'omogenato di carcassa, diluito 20 volte in una miscela cloroformio/metanolo (2:1), seguita da filtrazione; al filtrato ottenuto vengono aggiunti 0.2 volumi di NaCl 0.29% e dopo un'agitazione vigorosa di 30 minuti e una centrifugazione a 1000 g per 20 minuti (21°C), si osserva la separazione di una fase acquosa superiore ed una fase lipidica inferiore. A questo

punto la fase acquosa viene aspirata con una pompa e l'interfaccia viene lavata con una soluzione contenente cloroformio/metanolo/NaCl (3:48:47), con lo scopo di eliminare i contaminanti non lipidici dall'estratto; nel passaggio successivo la fase lipidica viene versata in palloni di vetro di cui è noto il peso, per ottenere l'evaporazione dei solventi organici, mediante l'utilizzo dell'evaporatore rotante Heidolph. Si risale così al peso dei lipidi per grammo di carcassa e, attraverso il coefficiente 39.2 kJ/g viene convertito il contenuto lipidico in kJ di energia corporea depositata sotto forma di lipidi. Il contenuto proteico della carcassa è stato calcolato per differenza tra il contenuto energetico totale e quello dovuto ai lipidi utilizzando il coefficiente di 23.5 kJ/g per convertire il contenuto di proteine in energia corporea depositata sottoforma di proteine.

6.4 Determinazione dei livelli plasmatici di glucosio, insulina e dell'indice Homa

Trascorsi 30 minuti dal prelievo, il sangue è stato posto in apposite provette addizionate con EDTA e centrifugato alla velocità di 5000 rpm per 10 minuti, alla temperatura di 20°C. Applicando questa procedura è stato possibile separare il plasma, rappresentato dal surnatante, dalla parte corpuscolata del sangue, cioè il pellet. I campioni di plasma sono stati conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento in cui sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse. In particolare si è provveduto alla misura dei livelli plasmatici di glucosio, di insulina ed al calcolo dell'indice Homa. I livelli plasmatici di glucosio sono stati valutati mediante un metodo enzimatico colorimetrico usando un kit commerciale (Poker, Italia). I livelli di insulina sono stati, invece, determinati mediante il dosaggio ELISA che sfrutta il metodo del doppio anticorpo (sandwich) ed utilizza come enzima coniugato la perossidasi di rafano. In seguito all'aggiunta del substrato della perossidasi, si sviluppa un composto colorato la cui intensità è proporzionale alla quantità di enzima presente. L'indice Homa (Homeostasis Model Assesment), che è un indice derivato di insulino resistenza, è una particolare trattazione matematica che ci permette di valutare eventuali cambiamenti della sensibilità all'insulina in funzione dei livelli circolanti di glucosio e dell'ormone. Nello specifico rappresenta il rapporto fra il prodotto delle concentrazioni di glucosio e di insulina nel sangue ed una costante, il numero 405, quindi: $HOMA = [\text{insulinemia (mU/L)} \times \text{glicemia (mg/dL)}] / 405$.

6.5 Determinazione dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi ALT

Durante il sacrificio degli animali sono stati prelevati dei campioni di sangue dalla vena cava inferiore; tali campioni posti in apposite provette sono stati centrifugati alla velocità di 5000 rpm per 10 minuti e alla temperatura di 20°C, per poter separare il siero (surnatante) dalla parte

corpuscolata del sangue (pellet). In seguito i campioni di siero sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse. In particolare si è effettuata la misura dei livelli serici di trigliceridi, colesterolo e ALT utilizzando dei kit colorimetrici commerciali.

6.6 Determinazione dei livelli serici di TNF- α , MCP1, IL-1 α , IL-10 e LPS

Le concentrazioni seriche di TNF- α ^{*}, MCP1^{*}, IL-1 α [#] e IL-10[#] sono state misurate tramite dosaggio ELISA (*Biovendor R&D, Brno Czech Republic, # Thermo Scientific, Rockford). I livelli di LPS sono stati dosati su campioni di siero prelevati dalla vena porta e determinati sempre tramite l'utilizzo di un kit commerciale ELISA (Limus Amebocyte Lysate QCL-1000, Lonza Group LTD).

6.7 Analisi delle proteine mediante Western Blot.

Il Western blot, o immunorivelazione, è una tecnica immunochimica che permette di valutare l'espressione quantitativa di una determinata proteina e la sua localizzazione in una miscela di proteine precedentemente sottoposte ad una elettroforesi su gel di poliacrilammide che è stata eseguita secondo il metodo di Laemmli per la realizzazione di gel discontinui¹¹³. Questa metodica prevede la preparazione di due tipi di gel:

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

La preparazione dello stacking gel è eseguita utilizzando:

- TRIS 0.125M
- SDS 0,1% pH 6.8
- miscela di acrilammide 4%, TEMED 0,1%, ammonio persolfato 0.05%.

Il separating gel è preparato utilizzando:

- TRIS 0.375 M
- SDS 0,1% pH 8.8
- miscela di acrilammide 13%, TEMED 0,1%, ammonio persolfato 0.05%.

La preparazione di questi gel prevede che venga versata prima la miscela di separating gel per la separazione delle proteine, e, dopo la sua polimerizzazione, si effettua il versamento della miscela di stacking gel per il caricamento dei campioni.

I campioni proteici (costituiti da 30 µg di lisato mitocondriale) che sono caricati nei pozzetti, sono stati precedentemente diluiti nella soluzione costituita da:

- TRIS 50 mM
- DTT 10 mM
- Glicerolo 10%
- SDS 2 %
- Blu di bromofenolo 0.001% pH 6.8

Prima di essere caricati sul gel i campioni sono riscaldati a 95° C per 5 minuti. La corsa è effettuata a 200V per 1h, utilizzando come tampone una soluzione costituita da:

- TRIS 25 mM
- Glicina 192 mM
- SDS 0.1 % pH 8.6

Dopo la corsa elettroforetica, il materiale proteico è stato trasferito su una membrana di nitrocellulosa in un tampone di trasferimento contenente: TRIS 16.5mM, glicina 150 mM pH 8.3, metanolo 20% utilizzando un voltaggio di 100 V per 45 minuti. Al termine del trasferimento, la membrana è stata asciugata all'aria per 15 minuti al fine di rimuovere il metanolo. La membrana viene, in seguito, lavata per 5 minuti nel tampone TBS-tween composto da PBS 1x, %. (che si ottiene diluendo 1:10 il PBS 10X: NaCl 1.37M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 0.1 M, KH₂PO₄ 18mM), tween 20.

Per ottenere il blocco di siti aspecifici tra la nitrocellulosa e le proteine, la membrana viene incubata a temperatura ambiente per 1 ora in una soluzione di TBS-tween e agente bloccante (latte 5%). Successivamente il filtro viene incubato tutta la notte a 4°C con 1µg/ml di anticorpo primario (UCP2 - goat polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology) nel tampone che contiene TBS-tween-latte 2%. In seguito, per allontanare l'anticorpo legato in modo aspecifico. Terminati i lavaggi, il filtro viene incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (Rb pAB to Goat) coniugato con l'enzima perossidasi (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:4000 in TBS-tween e latte al 2%. Anche questa volta, per allontanare l'anticorpo secondario legato in modo aspecifico, vengono effettuati gli stessi lavaggi indicati in precedenza. Per rilevare il segnale della proteina viene utilizzata la reazione di chemiluminescenza effettuata con un mix di incubazione composto da 5 ml di luminolo 1,25 mM, 50 µl di acido cumarico 6.8.mM, 15 µl di H₂O₂ 3%.

La membrana viene, quindi, incubata con questo mix per 1 minuto e successivamente viene esposta con una lastra per autoradiografia in cassette radiografiche a temperatura ambiente per 45-50 minuti. Dopo di ciò è stato possibile sviluppare la lastra sulla quale si osservano delle bande corrispondenti alla proteina di interesse che viene quantizzata mediante un software di densitometria.

6.8 Determinazione del contenuto epatico di lipidi

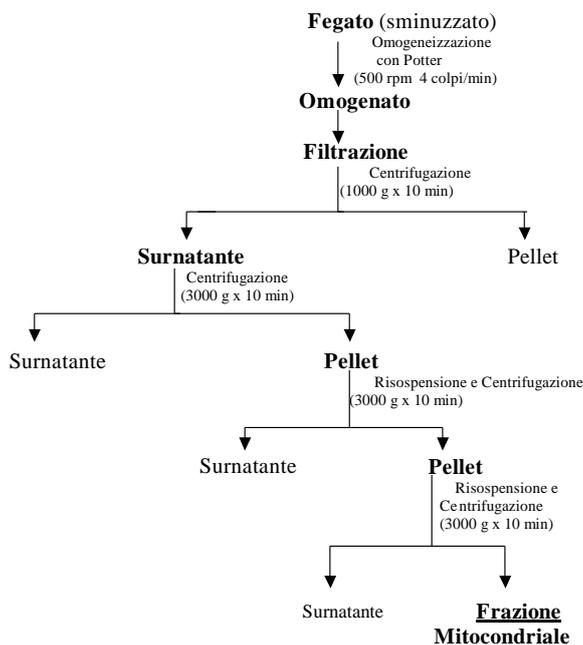
L'estrazione dei lipidi dal fegato è stata effettuata in accordo con il metodo di Folch¹¹², precedentemente descritto.

ANALISI DEI PARAMETRI MITOCONDRIALI

6.9 Preparazione dei mitocondri.

Subito dopo il sacrificio, il fegato è stato prelevato, finemente sminuzzato ed omogeneizzato in una soluzione contenente mannitolo 220mM, saccarosio 70 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM e 0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi (BSA) a pH 7.4 (diluizione 1:10), in un omogeneizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) settato a 500 rpm (4 colpi / min). L'omogenato è stato, poi, filtrato attraverso delle garze sterili e privato di cellule intatte e nuclei attraverso una centrifugazione a 1000g per 10 minuti; i surnatanti ottenuti sono stati di nuovo centrifugati a 3000g per 10 minuti (Fig.8). Il pellet mitocondriale così ottenuto è stato lavato due volte ed infine risospeso in un tampone contenente LiCl 80 mM, HEPES 50 mM, Tris P 5 mM, EGTA 1 mM, 0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi a pH 7.0. Caratterizzazioni microscopiche ed enzimatiche hanno mostrato che la nostra procedura di isolamento (centrifugazione a 3000 g per 10 minuti) fornisce una frazione cellulare che è costituita essenzialmente da mitocondri¹¹⁴.

FIGURA 8. Metodica di isolamento dei mitocondri di fegato



6.10 Dosaggio proteico

Aliquote delle due frazioni mitocondriali, diluite 1:100, sono state sottoposte ad un dosaggio proteico, condotto secondo il metodo di Hartree, una modifica del metodo di Lowry¹¹⁵, per determinare la concentrazione proteica dei mitocondri isolati. Tale dosaggio è di tipo colorimetrico, per cui determina la formazione di un colore la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica nel campione. Tale metodo combina la reazione del biureto con quella del Folin-Ciocalteu, ed il colore che si sviluppa proviene dalla riduzione degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico a blu di tungsteno e di molibdeno, operata dal complesso Cu-proteina e dal triptofano e dalla tirosina delle proteine in ambiente alcalino. La modifica rispetto al metodo di Lowry sta in un aumento della concentrazione di tartrato di sodio-potassio e nell'impiego di temperature più elevate (50°C). Tali variazioni rendono la metodica più sensibile e consentono una correlazione lineare tra assorbanza e concentrazione proteica per un più ampio intervallo di valori di concentrazione. Lo standard utilizzato è la BSA.

6.11 Determinazione della massa proteica mitocondriale

La misura della massa proteica mitocondriale è stata determinata dalla misura dell'attività di un enzima marker mitocondriale, la citrato sintasi, determinata sia negli omogenati, sia nei

mitocondri isolati dal muscolo scheletrico La citrato sintasi è stata determinata in accordo con Srere¹¹⁶. La misura si realizza incubando, alla temperatura di 30°C, i mitocondri o l'omogenato, diluiti 1:10 in Triton 0,5%, in un buffer costituito da DTNB (1 mM), Acetil-CoA (10 mM), Ossalacetato (10 mM). Inoltre la misura è realizzata in presenza del Triton 0,5%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare. La determinazione dell'attività della citrato sintasi è stata effettuata spettrofotometricamente monitorando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 412 nm ogni 30 secondi per tre minuti. L'attività della citrato sintasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}$. Quindi, dalla media dei $\Delta A \text{ min}^{-1}$ per ogni campione, si calcola la molarità del CoA formatosi al minuto, corrispondente all'attività della citrato sintasi, per i mg di proteine mitocondriali o i g di tessuto incubati.

6.12 Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati.

I mitocondri epatici sono stati utilizzati per valutare il consumo d'ossigeno polarograficamente, mediante l'utilizzo dell'elettrodo di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Oh, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e da un anodo d'argento, entrambi immersi in una soluzione di KCl (0,1M) e separati dalla soluzione in esame, tramite una membrana. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. In tal modo, l'ossigeno al catodo si riduce e origina una corrente proporzionale all'attività dell'ossigeno presente in soluzione, nel momento in cui è applicato agli elettrodi un voltaggio di 0.5 – 0.8 volts. All'anodo, infatti, sono prodotti quattro elettroni a loro volta utilizzati per ridurre una molecola di ossigeno al catodo. La tensione di ossigeno al catodo, quindi, tende ad azzerarsi promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. L'elettrodo di Clark consente, quindi, di misurare i rapidi cambiamenti che si riscontrano nell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari.

Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando, per il fegato, un mezzo di incubazione contenente KCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, K_2HPO_4 5 mM, PH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA.

Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri sono indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori per la β -ossidazione, quali la palmitoil-carnitina (40 μM) e malato (2,5 mM).

Le misure sono state effettuate in assenza (Stato 4 o stato non fosforilante della respirazione) o in presenza (Stato 3 o stato fosforilante della respirazione) di 0,6 mM di ADP. In tal modo è stato possibile misurare il Rapporto del Controllo Respiratorio (RCR, velocità dello stato3 diviso velocità stato 4) in accordo con il metodo di Estabrook¹¹⁷, e pertanto verificare l'integrità dei mitocondri isolati. Il consumo di ossigeno è espresso in ng di atomi di O al minuto per mg di proteine mitocondriali.

6.13 Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato utilizzando la lettura spettrofotometrica, ottenuta mediante uno spettrofotometro (JASCO) a doppia lunghezza d'onda, della safranina, un colorante che in virtù della sua carica elettrica si lega alla membrana mitocondriale in maniera proporzionale al potenziale¹¹⁸. Lo spettrofotometro adoperato è programmato in modo tale che la lunghezza d'onda di riferimento (533 nm) coincida con il punto isosbastico della safranina, cioè quel punto dello spettro di assorbimento in cui la molecola di colorante mostra la stessa assorbanza sia nello stato legato che in quello non legato alla membrana mitocondriale. La lunghezza d'onda di lettura è invece 511nm. Per risalire al potenziale di membrana dai valori dell'assorbanza, si effettuano misure dell'assorbanza della safranina in presenza di valinomicina 3 μ M, un trasportatore specifico del potassio, e di quantità crescenti di KCl necessarie ad alterare la concentrazione esterna di potassio nel range 0.1 - 20 mM. A questo punto si costruisce una retta di taratura che mette in relazione le variazioni di assorbanza al logaritmo della concentrazione di potassio esterna, e che, quindi, consente di risalire alla concentrazione extra ed intramitocondriale di tale ione. Per estrapolazione da tale retta, infatti, si ricava la concentrazione interna di potassio, considerando che quando la variazione di assorbanza della safranina è nulla anche il potenziale di membrana è pari a zero e quindi, in base all'equazione di Nernst, le concentrazioni di potassio esterna ed interna si equivalgono. Ottenute le concentrazioni di potassio esterna ed interna alla membrana mitocondriale, mediante l'equazione di Nernst ($\Delta\Psi = 61 \text{ mV} \times \log ([K^+]_{in} / [K^+]_{out})$), si può calcolare il potenziale di membrana dei mitocondri e realizzare un grafico per mettere in relazione i valori di potenziale di membrana con l'assorbanza della safranina. A questo punto dalla curva si potranno ottenere i valori del potenziale di membrana mitocondriale nelle varie condizioni sperimentali utilizzate.

6.14 Misura della conduttanza protonica basale

L'applicazione del metodo di Brand ha consentito la valutazione della conduttanza protonica basale dei mitocondri isolati. Questa metodica consiste in una titolazione della respirazione con il succinato a partire dallo Stato 4 della respirazione, in presenza di oligomicina, con quantità crescenti di malonato, un inibitore competitivo del secondo complesso della catena respiratoria, la succinico deidrogenasi, e permette di determinare le variazioni del potenziale di membrana associate alle variazioni del consumo di ossigeno ottenute in queste condizioni.

Per poter determinare sperimentalmente la conduttanza protonica basale si adopera l'oligomicina, un antibiotico capace di abolire il flusso di protoni attraverso l'ATP sintetasi, prevenendo il passaggio dei protoni attraverso la subunità Fo. In questo modo si fa sì che il flusso protonico valutato dipenda solo dalla conduttanza protonica basale.

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

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

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

aggiunto succinato 10 mM, rotenone 3.75 μ M, oligomicina 2 μ g/ml, safranina (83.3 nmol/mg) e nigericina (80 ng/ml).

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

6.15 Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi

Per avere informazioni sul disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stata anche effettuata la determinazione della cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi in analogia a quella effettuata per la conduttanza protonica basale. Tale determinazione è stata ottenuta titolando la respirazione ed il potenziale di membrana in presenza di oligomicina, succinato e palmitato con quantità crescenti di malonato fino a 0.6 mM per i mitocondri epatici. Le concentrazioni di palmitato da aggiungere sono state calcolate tenendo conto dell'interazione tra gli acidi a lunga catena e l'albumina¹¹⁹. Le concentrazioni di acido grasso che effettivamente si aggiungono nella camera di misura sono di 85 μ M per le misure effettuate sui mitocondri di fegato.

6.16 Determinazione dell'attività totale della Carnitina-Palmitoil-Transferasi.

L'attività totale della Carnitina-Palmitoil-Transferasi (CPT) è stata misurata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 412 nm, seguendo la cinetica della produzione di CoA-SH carnitina-dipendente in presenza di acido 5,5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB) usando palmitoil-CoA come substrato.

Il metodo spettrofotometrico è basato sul rilascio di CoA dai tioesteri dell'Acil-CoA. Ciò induce la riduzione del DTNB ad acido 5-tio-2-nitrobenzoico che determinerà lo sviluppo di un colore giallo. La reazione è stata misurata seguendo la metodica di Alexon e Nedergard¹²⁰, incubando i mitocondri in: 75 mM di Hepes (pH 7.5), 10 mM di EDTA, 10 mg/ml di BSA, 2.5 ml di Palmitoil-CoA, 3 mM di DTNB. Tutte le provette contenenti le soluzioni sono state incubate per 3 minuti a 35°C prima di aggiungere Palmitoil-CoA e carnitina. La concentrazione dei tioli rilasciati è stata calcolata dal coefficiente di estinzione molare, $E_{412nm} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dopo aver corretto per la reazione aspecifica dei gruppi sulfidrilici dell'enzima con DTNB e per l'idrolisi non specifica della Palmitoil-CoA.

6.17 Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale.

Il dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare “in vivo” i danni prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche¹²¹. Infatti l'aconitasi è un enzima particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali dell'ossigeno¹²², per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi nel suo sito attivo, un cluster [4Fe-4S], che è il principale bersaglio dei radicali liberi. Il meccanismo di inattivazione dell'aconitasi da parte dei radicali liberi è il rilascio di ferro dal cluster [4Fe-4S]. L'aconitasi è un enzima del ciclo di Krebs, che catalizza la conversione reversibile di acido citrico in isocitrico, che viene poi ossidato dalla isocitrico deidrogenasi ad α -chetoglutarato, con formazione di NADP ridotto (NADPH).

Il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm dovuto alla formazione di NADPH. I campioni sono stati incubati a 25°C in un buffer costituito da Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 e MnCl₂ 0,6 mM, NADP⁺ 0,2 mM, sodio-citrato 30 mM e 2 U/ml di isocitrico deidrogenasi e la formazione di NADPH è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm a 25°C. La misura è stata realizzata in presenza di Triton 1%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare. L'attività dell'aconitasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare ϵ del NADPH, $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Il livello dell'attività di questo enzima, misurata nell'estratto mitocondriale, eguaglia l'aconitasi attiva (livello basale). L'aconitasi inibita dai ROS è stata riattivata affinché l'attività totale potesse essere misurata mediante l'incubazione degli estratti mitocondriali in un mezzo contenente ditiotreitolo (DTT) 50 mM, Na₂S 0,2 mM e solfato ammonio ferroso 0,2 mM.

6.18 Determinazione del rilascio mitocondriale di H₂O₂

È stato considerato come indicativo della produzione mitocondriale di ROS il rilascio di H₂O₂, che si forma dalla trasformazione dei radicali liberi dell'ossigeno ad opera della SOD. La velocità del rilascio mitocondriale di H₂O₂ è stata determinata misurando l'incremento della fluorescenza (eccitazione a 312 nm, emissione a 420 nm) provocato dall'ossidazione dell'acido omovanillinico ad opera dell' H₂O₂ in presenza della perossidasi di rafano. Il buffer di incubazione, pH 7,4, è composto da: KCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, K₂HPO₄ 5 mM, MgCl₂ 2 mM, BSA 0,3% a 37°C in un volume totale di 1,5 ml. In tale buffer sono state incubate:

- Proteine mitocondriali 0,25 mg/ml
- Perossidasi di rafano 12 U/ml

- Acido omovanillinico 0,1 mM
- SOD 50 U/ml

Dopo 10 secondi dall'incubazione sono stati aggiunti 20µl di succinato. La fluorescenza è stata letta al fluorimetro, dotato di una cella termostaticamente controllata ed interfacciato con un PC IBM-compatibile. La curva standard è stata ottenuta aggiungendo quantità note di H₂O₂ per tarare lo strumento in presenza di acido omovanillinico e perossidasi di rafano.

6.19 Misurazione del GSH

La concentrazione di GSH totale, ridotto e ossidato (GSSG), negli estratti citosolici è stata misurata mediante un saggio che si basa sul principio secondo cui l'acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-bis-benzoico (DTNB) interagisce con i gruppi tiolici del GSH assumendo una colorazione giallastra rilevata mediante lettura spettrofotometrica a 405 nm. Le proteine contenute negli estratti citoplasmatici sono state rimosse mediante l'aggiunta di una soluzione composta da 10% TCA, 0.2 mM HCl, 20 mM EDTA, incubazione (10 minuti a 4°C) e successiva centrifugazione. Il sovrinatante è stato aliquotato in triplicato in piastre da 96. A ciascun pozzetto sono stati aggiunti l'enzima glutatione reduttasi (GSR) che catalizza la conversione del GSSG in GSH, il suo cofattore NADPH e in seguito 20 µL di NaOH 3% per portare il pH a condizioni ottimali per il funzionamento della GSR (pH 8.0). Successivamente, in ciascun pozzetto, sono stati aggiunti 100 µL di buffer sodio-fosfato 125 mM pH 7.5 contenente EDTA 6.3 mM e, alla fine, 50 µL di DNTB (2.5 mM in PBS). L'assorbanza a 405 nm è stata misurata al tempo 0 min e dopo 4 min e la variazione di colore è stata calcolata mediante la formula (mean V= (OD a 10 min- OD a 0 min)). La concentrazione di GSH totale è stata calcolata mediante l'utilizzo di una retta di calibrazione ed espressa, dopo normalizzazione del contenuto proteico, come nmoli GSH/ mg proteine/ min. Utilizzando la stessa procedura, ma aggiungendo oltre al NADPH e alla GSR, anche la metilvinilpiridina trifluorometilsulfonato (MVP), che blocca rapidamente ed irreversibilmente i siti di cisteina sul GSH, è stata calcolata la concentrazione di GSSG. La concentrazione di GSH è stata calcolata sottraendo la concentrazione di GSSG a quella del GSH totale e normalizzata al contenuto di proteine (nmoli/mg prot/min). Le concentrazioni di GSH e GSSG sono state adoperate per calcolare l'indice di stato RedOx GSH/GSSG.

6.20 Attività della glutatione S-transferasi (GST)

Per la determinazione dell'attività della GST è stato impiegato un saggio enzimatico che utilizza come substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), in grado di interagire con la maggior parte

degli isoenzimi GST. La coniugazione del gruppo tiolico del GSH al CDNB, produce un incremento di assorbanza a 340 nm che viene monitorato per calcolare l'attività della GST. Per eseguire il saggio sono state preparate le seguenti soluzioni:

- 0.1 M tampone fosfato pH 6.5 (P buffer) -1 ml 200 mM 1-choro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) in ETOH
- 1 ml 50 mM GSH (in P buffer)
- 5% BSA in P buffer

È stata preparata una miscela (reaction mix) contenente: 1.2 mM CDNB e 0.12 % BSA

Sono stati aliquotati 30 μ L di proteina in 2.4 ml di Reaction Mix e di questi 0.8 ml sono stati aliquotati in cuvetta. In seguito sono stati aggiunti 0.2 ml di soluzione GSH nella cuvetta ed è stata letta l'assorbanza a 340 nm a tempo zero immediatamente dopo l'aggiunta del GSH e dopo 10-20 minuti. L'attività enzimatica è calcolata come nmoli di CDNB coniugato prodotto / min / mg proteina adoperando il coefficiente di estinzione molare (9.6×10^3 / M/ cm). Conoscendo la concentrazione proteica adoperata in ciascun saggio la concentrazione è stata espressa come nmoli/mg prot/min.

6.21 Attività della NADPH-chinone ossido reduttasi (NQO1)

Per la determinazione dell'attività della NQO1 è stato impiegato un saggio che prevede l'utilizzo di NADPH come substrato e l'attività dell'enzima viene calcolata misurando la diminuzione del NADPH a 340 nm. Per eseguire il saggio sono state preparate le seguenti soluzioni:

- 40 mM Menadione (1:10 in etanolo e alla fine 1:10 in ASSAY Buffer)
- 1 mM FAD 120 mM
- β NADPH
- 1 mM Dicumarolo in DMSO
- ASSAY Buffer (25 ml) : 24.5 ml 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.35 ml 5% BSA, 15 μ M FAD, 200 μ M β NADPH
- NADH 0.01% Tween-20
- CONTROL Buffer (10 ml) : preparato aggiungendo 200 μ l of 10mM dicumarolo a 10 ml di Assay Buffer. A 15 μ g di estratto cellulare sono stati aggiunti a 0.8 mL di Assay oppure di

Control Buffer e la miscela è stata incubata per 10 min a 25 °C. La reazione è stata attivata dall'aggiunta di menadione (0.2 ml 200 µM) e l'assorbanza a 340 nm è stata misurata al tempo zero ed ogni 10 minuti per 30 minuti. Ogni campione è stato analizzato in duplicato e la concentrazione di NADPH è stata calcolata mediante l'utilizzo del suo coefficiente di estinzione molare ($6.27 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Conoscendo la concentrazione proteica adoperata in ciascun saggio la concentrazione è stata espressa come nmoli/mg prot/min.

6.22 Analisi del microbiota intestinale

Il DNA è stato estratto dal contenuto cecale, raccolto al momento del sacrificio e conservato a -80°C, utilizzando il mini-kit "QIAamp - DNA (Qiagen, Hilden, Germania)" secondo le istruzioni del fabbricante e la procedura adattata descritta in "Dewulf et al 2013"¹²³.

a) Sequencing; PCR primers e condizioni

L'analisi metagenomica dei campioni è stata eseguita con un sequenziamento ad alta velocità tramite "DNA Vision" (Gosselies, Belgium). La regione V1-V3 del gene 16S rRNA batterico è stata amplificata utilizzando i primer 27f (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG-3') e 534r(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')¹²⁴ e gli ampliconi purificati sono stati analizzati tramite un "Roche FLX Genome Sequencer" utilizzando la chimica Titanium. L'elaborazione è avvenuta mediante QIIME v1.7.0¹²⁵. Le unità tassonomiche operazionali (OTUs) sono state definite da raggruppamenti al 3% divergenza (97% di somiglianza). Le OTU sono state poi classificate tassonomicamente utilizzando un BLASTn contro un accurato database GreenGenes.

b) Le analisi statistiche

I dati sono espressi come media \pm DS. Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando il test t di Student a due code. Nel caso della presenza di valori non rilevabili per alcuni campioni, è stato richiesto l'utilizzo di un test non parametrico, come il test di Fisher per confrontare due gruppi contemporaneamente. Siccome la maggior parte dei parametri ha avuto una distribuzione anomala (valutata mediante il test di normalità Shapiro-Wilk), le correlazioni sono state analizzate utilizzando la correlazione di Spearman. I dati sono stati analizzati utilizzando i programmi JMP 8.0.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC), R 3.0.2 (R Foundation) e RStudio 0.97.310. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi con $p < 0,05$.

6.23 Analisi statistiche

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

CAPITOLO 7

RISULTATI

I dati relativi alla composizione delle diete ed ai contenuti energetici assunti sono riportati in tabella 1. Al termine delle quattro settimane di trattamento i risultati ottenuti mostrano che i ratti trattati con supplemento di latte mostrano una energia metabolizzabile assunta simile e significativamente più elevata rispetto ai ratti controllo (Fig.1A), ma i ratti che hanno ricevuto latte di asina o latte umano mostrano sia un più basso guadagno di peso corporeo rispetto ai ratti supplementati con latte vaccino (Fig.1B) sia un' aumentata spesa energetica se confrontati al gruppo CM o controllo (Fig.1C). Inoltre, l'efficienza energetica, calcolata come rapporto percentuale tra guadagno energetico ed energia metabolizzabile assunta, risulta significativamente più alta nel gruppo CM e significativamente ridotta nei ratti DM rispetto agli altri gruppi (Fig.1D). L' aumentata efficienza energetica riscontrata negli animali che hanno ricevuto il supplemento di latte bovino è associata ad un più alto guadagno lipidico che, al contrario, risulta ridotto nei gruppi DM e HM (Fig.1E). Tale dato è confermato dall'analisi della composizione corporea della carcassa. I risultati mostrano infatti un' aumentata percentuale lipidica a livello corporeo nei ratti supplementati con latte di vacca mentre nessuna alterazione significativa è stata trovata tra i ratti trattati con latte di asina o umano rispetto ai controlli (Fig.2A). Sorprendentemente, il trattamento con latte umano ha portato ad un significativo incremento del contenuto proteico corporeo in tali ratti (Fig.2B). Dalle analisi biochimiche condotte a livello plasmatico non si riscontrano differenze nella concentrazione di colesterolo tra i diversi gruppi, mentre si osservano più bassi livelli di trigliceridi nel gruppo DM ed una significativa riduzione dell'ALT nel gruppo HM. Inoltre, ai livelli serici di glucosio significativamente più bassi nei gruppi trattati con latte di asina e latte umano e alla più bassa concentrazione di insulina rilevata in quest'ultimo gruppo segue una significativa riduzione dell'indice HOMA nei ratti DM ulteriormente evidenziata nel gruppo HM (Tab.2A). I ratti che hanno ricevuto il supplemento di latte di asina e latte umano mostrano anche livelli serici di citochine pro infiammatorie (TNF- α , IL-1 e LPS) significativamente più bassi rispetto al gruppo controllo o trattato con latte bovino, mentre le concentrazioni di MCP-1 non variano in seguito ai trattamenti effettuati (Tab.2B). Gli effetti delle somministrazioni dei differenti tipi di latte sui parametri mitocondriali epatici sono riportati in figura 3. La massa proteica mitocondriale, espressa come rapporto dell'attività dell'enzima citrato sintasi valutata nell'omogenato su quella misurata nella frazione mitocondriale, risulta significativamente più alta nei ratti DM rispetto ai

CM ed al controllo ed ulteriormente incrementata nei ratti trattati con latte umano (Fig.3A). I risultati relativi alle misure della respirazione mitocondriale, in presenza di un substrato FAD dipendente quale il succinato, di un substrato NAD dipendente quale il glutammato ed un substrato lipidico quale il palmitoil-CoA sulla frazione mitocondriale epatica sono riportati nelle figure 3B, 3C e 3D. In particolare, lo Stato 3 e lo stato 4 dell'attività respiratoria dei mitocondri epatici in presenza di succinato o di palmitoil-carnitina come substrato è più alto nei ratti che hanno ricevuto un supplemento di latte rispetto ai ratti controllo, con un significativo incremento dello stato 3 nei ratti DM e HM anche rispetto al gruppo CM (Fig.3B, 3D). In presenza di glutammato come substrato, i ratti trattati con latte di asina e latte umano mostrano lo stato 3 dell'attività respiratoria più alto degli altri due gruppi, mentre nessuna differenza significativa dello stato 4 della respirazione è stata trovata nei ratti trattati rispetto ai controlli (Fig.3C). Nei ratti che hanno ricevuto latte di asina e latte umano, rispetto agli altri due gruppi, all'aumento della velocità di ossidazione degli acidi grassi si associano valori significativamente più alti relativi all'attività della CPT (Fig.3E), enzima responsabile del trasferimento degli acidi grassi a livello mitocondriale, ed un più basso deposito di lipidi a livello epatico rispetto ai ratti trattati con latte bovino (Fig.3F). Nella figura 4A sono riportati i risultati della conduttanza protonica basale, intesa come cinetica della variazione del potenziale di membrana in funzione della velocità di consumo di ossigeno. I dati indicano che i mitocondri dei ratti DM e HM consumano più ossigeno per mantenere un potenziale di membrana costante rispetto a quelli dei ratti CM o ai ratti controllo; di conseguenza, per produrre la stessa quantità di ATP dei ratti CM essi devono ossidare una maggiore quantità di substrati, che verranno sottratti al deposito. La conduttanza protonica indotta dal palmitato (Fig.4B) è più elevata nei ratti trattati rispetto ai controlli, in particolare, il gruppo trattato con latte umano mostra il più alto "proton leakage" indotto dagli acidi grassi. Inoltre, il grafico riportato in figura 4C mostra un aumento dei livelli di espressione della proteina disaccoppiante UCP2 nei mitocondri epatici dei ratti trattati rispetto ai controlli, con un valore più alto nei ratti DM rispetto agli altri gruppi. Dal momento che il potenziale di membrana correla con la produzione di radicali liberi, sono stati ricercati gli effetti della variazione dell'efficienza energetica mitocondriale indotta dal trattamento con diversi tipi di latte sullo stato antiossidante degli animali trattati. A livello mitocondriale epatico è stato riscontrato un rilascio di H_2O_2 significativamente più alto nei ratti trattati con latte bovino e significativamente ridotto nei ratti trattati con latte di asina e latte umano rispetto ai controlli (Fig.5A) e, similmente, una più alta attività dell'aconitasi, enzima sensibile alla presenza di radicali liberi, è stata riscontrata nei ratti DM e HM rispetto agli altri due gruppi (Fig.5B). Inoltre, gli effetti benefici osservati in seguito al supplemento dietetico con latte di asina e latte

umano sullo stato antiossidante e detossificante epatico sono chiaramente indicati anche dalla misura delle concentrazioni di GSH e GSSG (Fig.6A, 6B) e delle attività di enzimi ad azione disintossicante (NQO1 e GST) (Fig.7A,7B). Il rapporto GSH/GSSG (Fig.6C) e le suddette attività enzimatiche risultano infatti essere significativamente più alti nei gruppi DM e HM indicando un miglioramento delle difese citoprotettive.

L'assunzione di una quantità isoenergetica di latte di vacca, latte di asina e latte umano influenza diversamente la composizione del microbiota intestinale. I dati ottenuti dal pirosequenziamento mostrano significative variazioni nella composizione a livello di "phylum" in: Bacteroidetes, la cui abbondanza relativa è significativamente più alta nel gruppo CM (+22%) rispetto ai controlli; Verrucomicrobia, presente in una percentuale minore nel gruppo DM (-58%) rispetto al gruppo controllo e TM7, la cui concentrazione è significativamente più elevata nel gruppo trattato con latte di asina (+575%) rispetto a quello trattato con latte bovino (Fig.8, Tab.3). In aggiunta, sono stati identificati 10 "generi" la cui abbondanza varia significativamente tra i gruppi di ratti diversamente trattati (Fig.9). Le massime differenze nelle percentuali relative dei differenti generi batterici sono state riscontrate tra il gruppo trattato con latte di asina e il gruppo controllo, mentre nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra il gruppo trattato con latte di asina e quello trattato con latte umano. In particolare, la concentrazione di *Bacteroides* risulta significativamente più elevata nel gruppo trattato con latte umano rispetto ai controlli, mentre le percentuali di *Parabacteroides* variano significativamente tra i diversi gruppi sperimentali tranne tra i ratti DM e HM. Nel gruppo trattato con latte di asina rispetto al gruppo di controllo l'abbondanza relativa di *Streptococcus* e *Lactococcus* è significativamente più elevata, al contrario, la concentrazione di *Akkermansia* è significativamente ridotta (Tab.4). Infine, nella figura 10 è riportata l'analisi di correlazione di Spearman volta ad evidenziare le correlazioni tra i cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale e i parametri metabolici ed infiammatori precedentemente valutati.

Tabella 1

1.A Energia introdotta

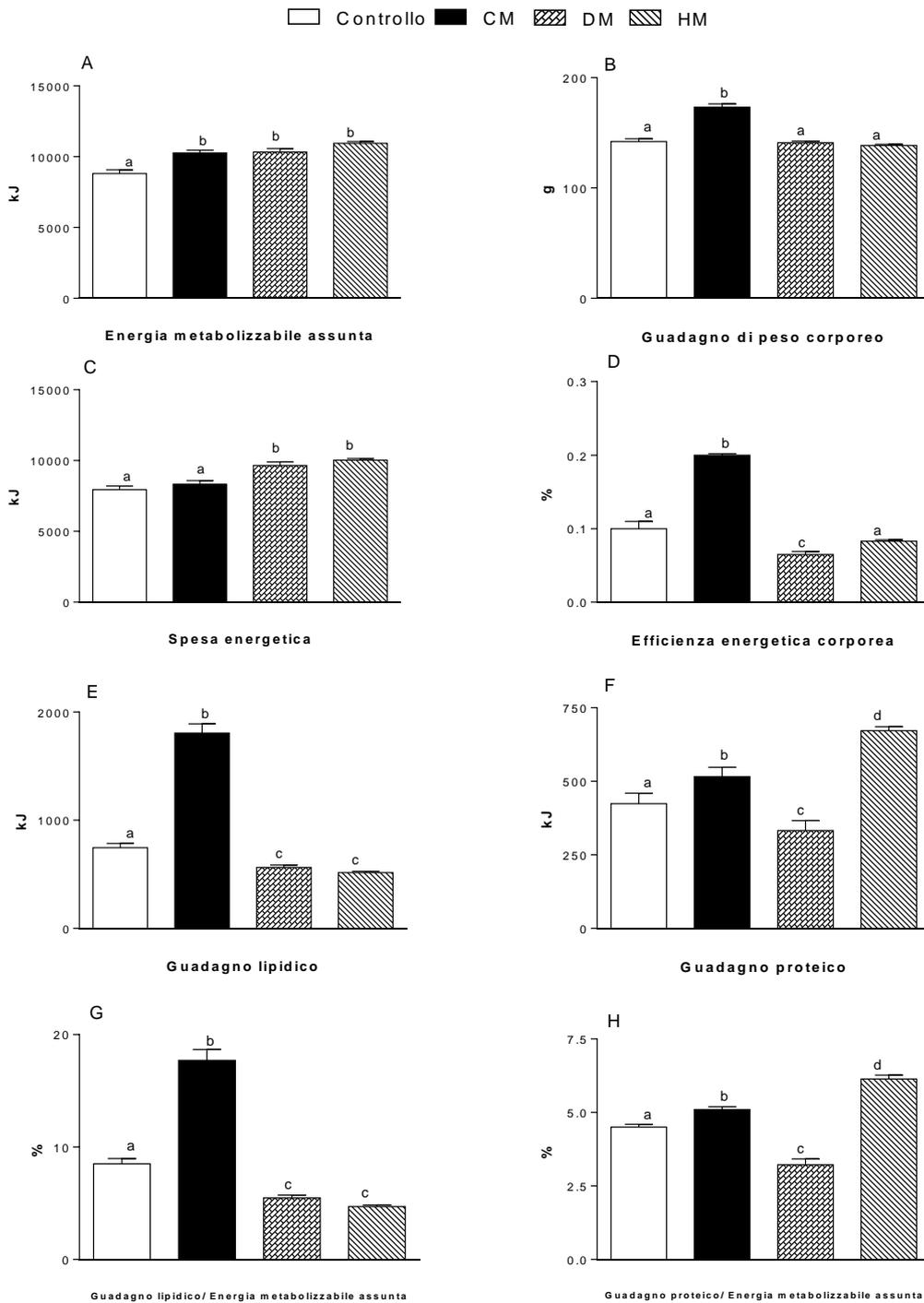
Energia introdotta	Controllo	CM	DM	HM
<i>Energia totale, kJ</i>	12432	14071	14288	14095
• <i>Dieta standard, kJ</i>	12432	12064 (85,74%)	12280 (85,95%)	12091 (85,78%)
• <i>Latte, kJ</i>		2007 (14,26%)	2008 (14,05%)	2004 (14,22%)

1.B Composizione diete

Composizione	Dieta standard	CM	DM	HM	Dieta standard + CM	Dieta standard + DM	Dieta standard + HM
<i>Proteine, %</i>	29	30,7	18	12,5	29,2	27,5	26,7
<i>Lipidi, %</i>	10,6	34	4,7	35	13,9	9,8	14,1
<i>Carboidrati, %</i>	60	35,5	77,3	52,5	56,5	62,4	58,9
<i>Densità energetica, kJ/g</i>	15,8	3,46	1,48	3,24	14,0	13,8	14,0

Figura 1

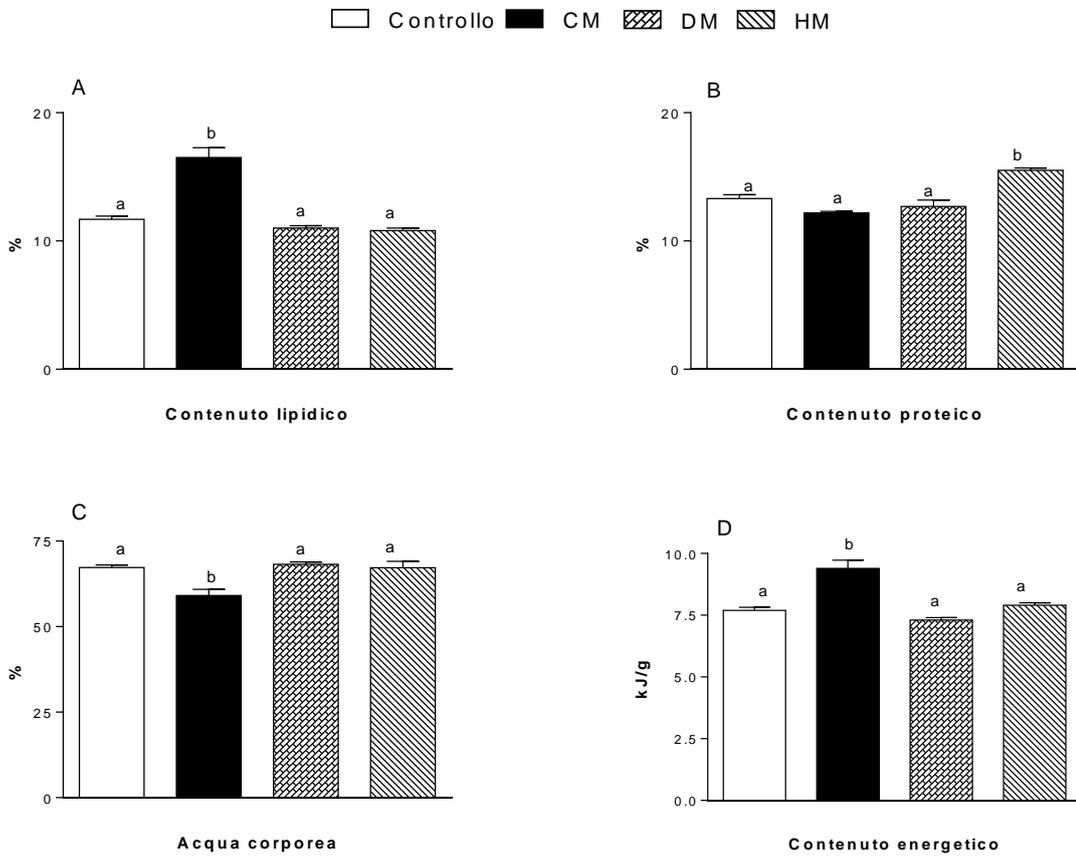
Bilancio energetico



I valori sono le medie \pm ES di 8 differenti esperimenti in ogni gruppo sperimentale. Le lettere differenti agli apici indicano variazioni statisticamente significative ($p < 0.05$).

Figura 2

Composizione corporea



I valori sono le medie \pm ES di 8 differenti esperimenti in ogni gruppo sperimentale.
Le lettere differenti agli apici indicano variazioni statisticamente significative ($p < 0.05$).

Tabella 2

2.A Parametri sierici

	Controllo	CM	DM	HM
<i>Glucosio, mg/dL</i>	138.6±2.1 ^a	130.1±5.7 ^a	112.1±2.7 ^b	112.7±3.7 ^b
<i>Insulina, µg/L</i>	0.273±0.018 ^a	0.274±0.019 ^a	0.271±0.019 ^a	0.201±0.013 ^b
<i>Indice HOMA</i>	2.19±0.12 ^a	2.09±0.13 ^a	1.75±0.12 ^b	1.314±0.10 ^c
<i>Trigliceridi, mg/dL</i>	116±5.3 ^a	132±7.5 ^a	90±4.1 ^b	120±5.2 ^a
<i>Colesterolo totale, mg/dL</i>	61±1.6 ^a	63±1.1 ^a	58±1.2 ^a	59±1.5 ^a
<i>ALT, U/l</i>	67±2.0 ^a	71±3.2 ^a	62±2.0 ^a	44±2.6 ^b

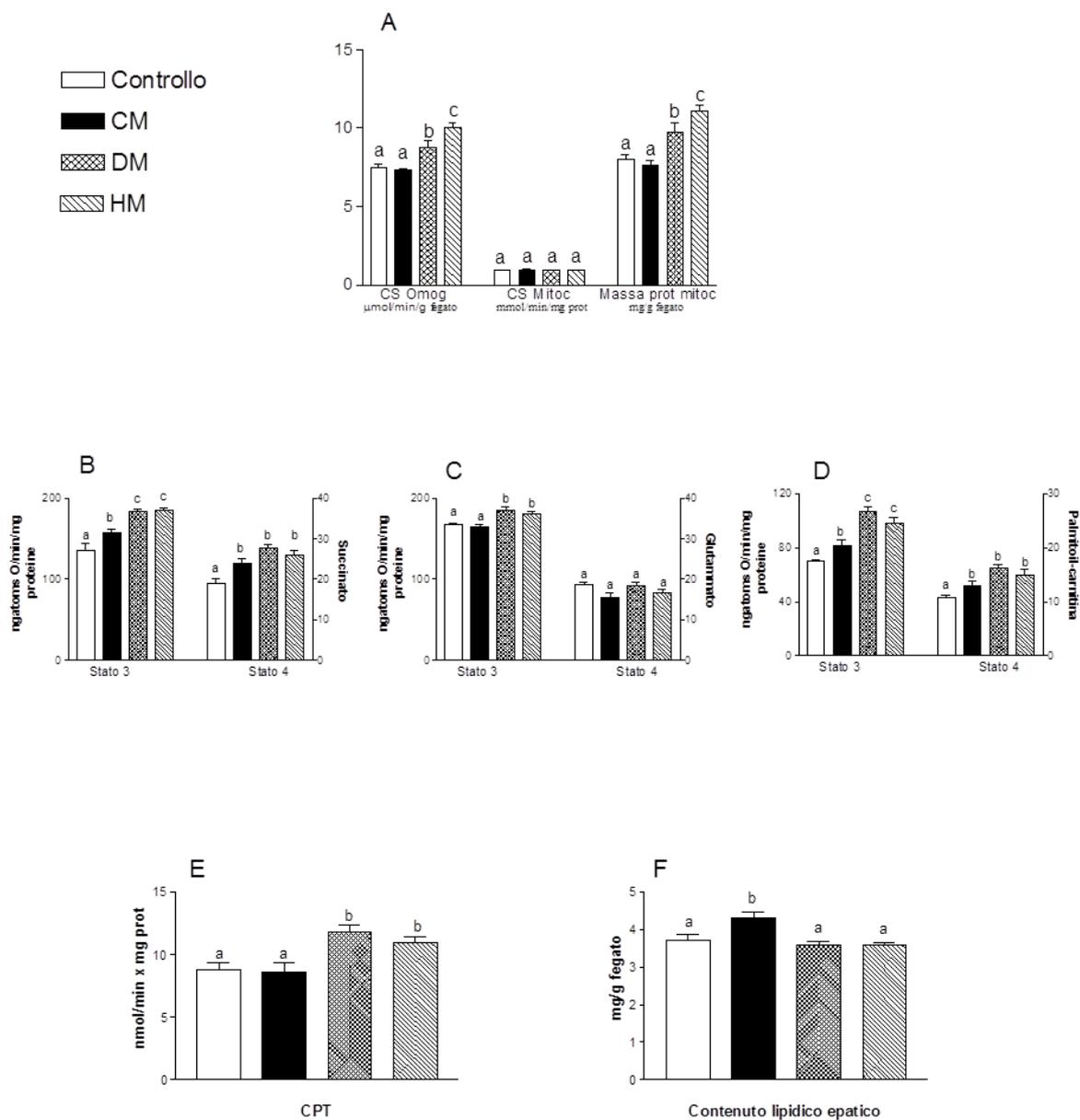
2.B Markers infiammatori sierici

	Controllo	CM	DM	HM
<i>TNFα, ng/mL</i>	0.092±0.006 ^a	0.090±0.005 ^a	0.055±0.05 ^b	0.058±0.05 ^b
<i>MCPI, ng/mL</i>	3.62±0.15 ^a	3.82±0.22 ^a	3.29±0.22 ^a	3.87±0.32 ^a
<i>IL1, pg/mL</i>	56.4±3.3 ^a	64.0±2.1 ^a	42.9±3.4 ^b	42.2±3.9 ^b
<i>IL10, ng/mL</i>	0.061±0.003 ^a	0.134±0.008 ^b	0.177±0.012 ^c	0.200±0.005 ^d
<i>LPS, EU/mL</i>	0.704±0.028 ^a	0.668±0.025 ^a	0.584±0.014 ^b	0.580±0.015 ^b

I valori sono le medie ± ES di 8 differenti esperimenti in ogni gruppo sperimentale.
Le lettere differenti agli apici indicano variazioni statisticamente significative (p<0.05).

Figura 3

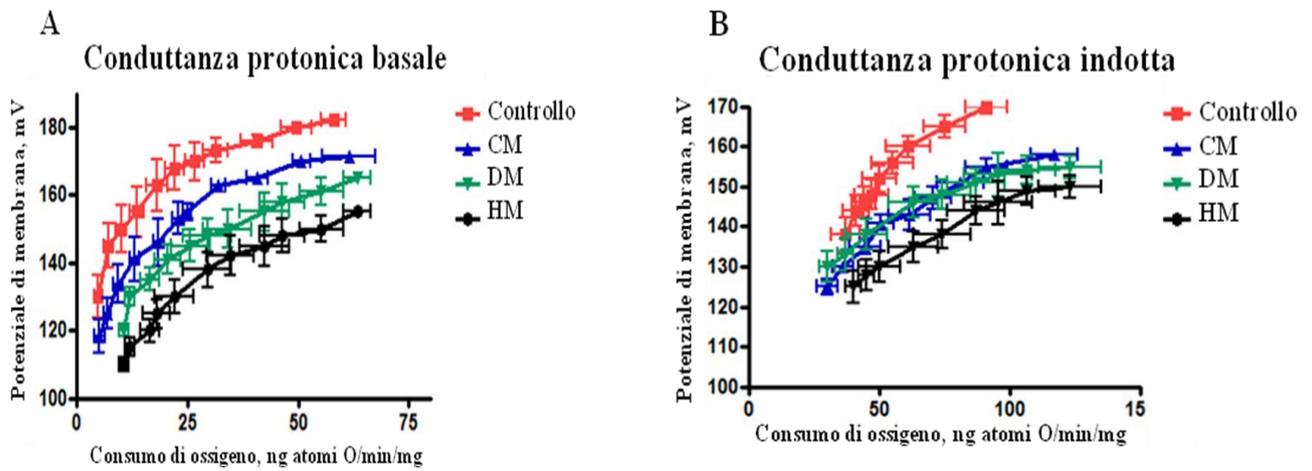
Parametri epatici



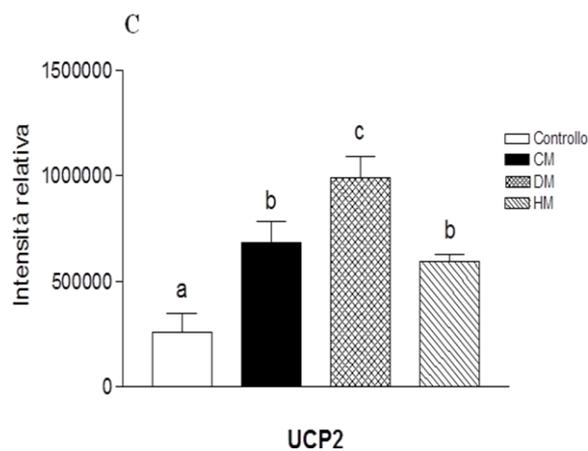
I valori sono le medie \pm ES di 8 differenti esperimenti in ogni gruppo sperimentale.
 Le lettere differenti agli apici indicano variazioni statisticamente significative ($p < 0.05$).

Figura 4

Cinetica della conduttanza protonica basale ed indotta dagli acidi grassi nei mitocondri epatici dei diversi gruppi sperimentali



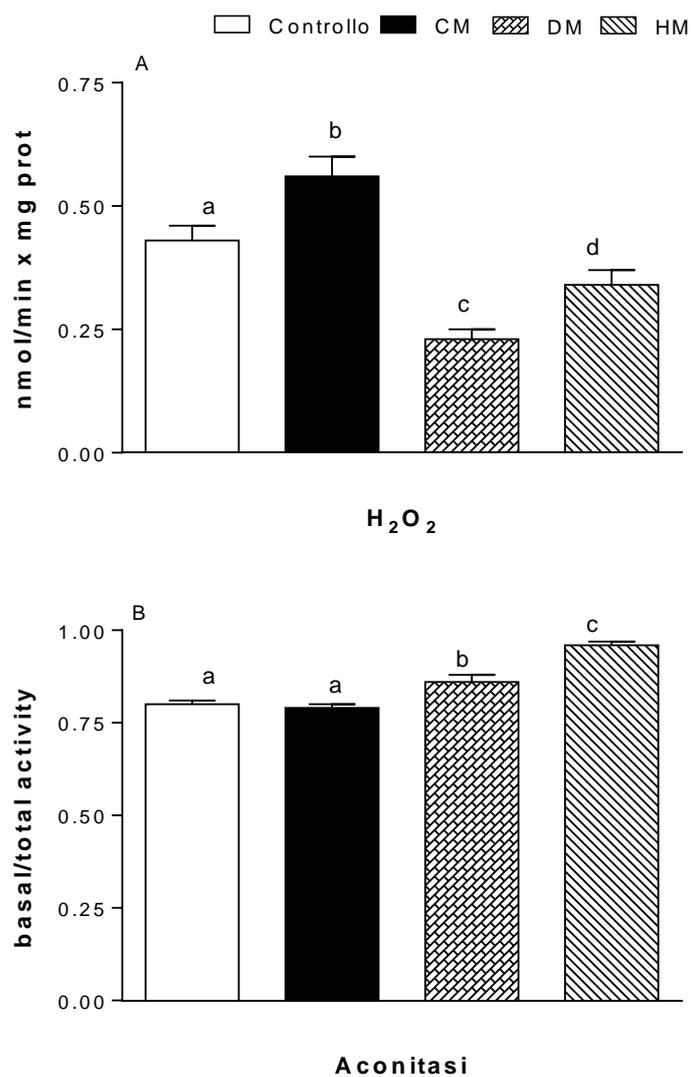
Livelli di espressione mitocondriale epatica di UCP2



I valori sono le medie \pm ES di 8 differenti esperimenti in ogni gruppo sperimentale. Le lettere differenti agli apici indicano variazioni statisticamente significative ($p < 0.05$).

Figura 5

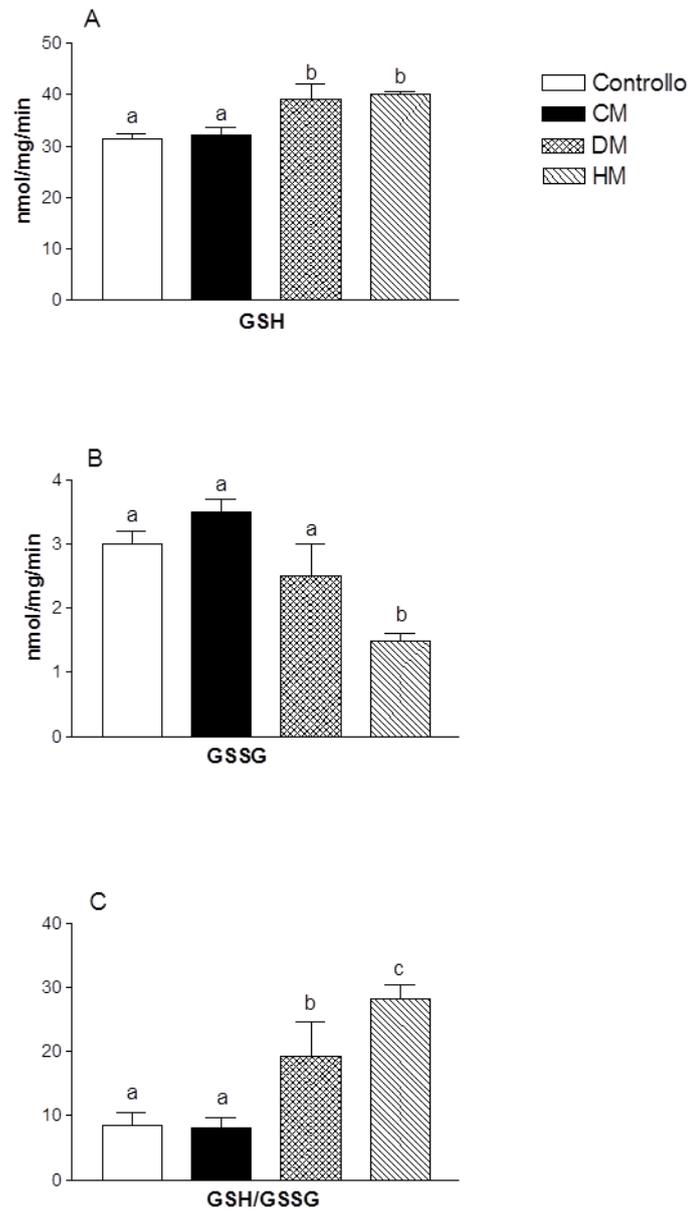
Rilascio di H_2O_2 e misura dell'attività dell'aconitasi nei mitocondri epatici dei diversi gruppi sperimentali



I valori sono le medie \pm ES di 8 differenti esperimenti in ogni gruppo sperimentale. Le lettere differenti agli apici indicano variazioni statisticamente significative ($p < 0.05$).

Figura 6

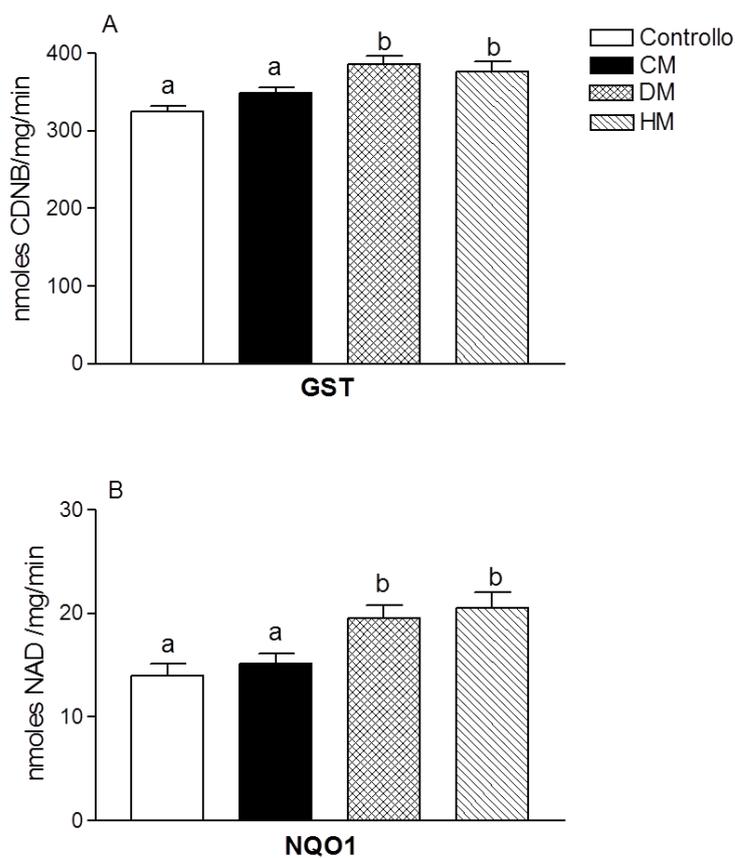
Stato redox



I valori sono le medie \pm ES di 8 differenti esperimenti in ogni gruppo sperimentale.
Le lettere differenti agli apici indicano variazioni statisticamente significative ($p < 0.05$).

Figura 7

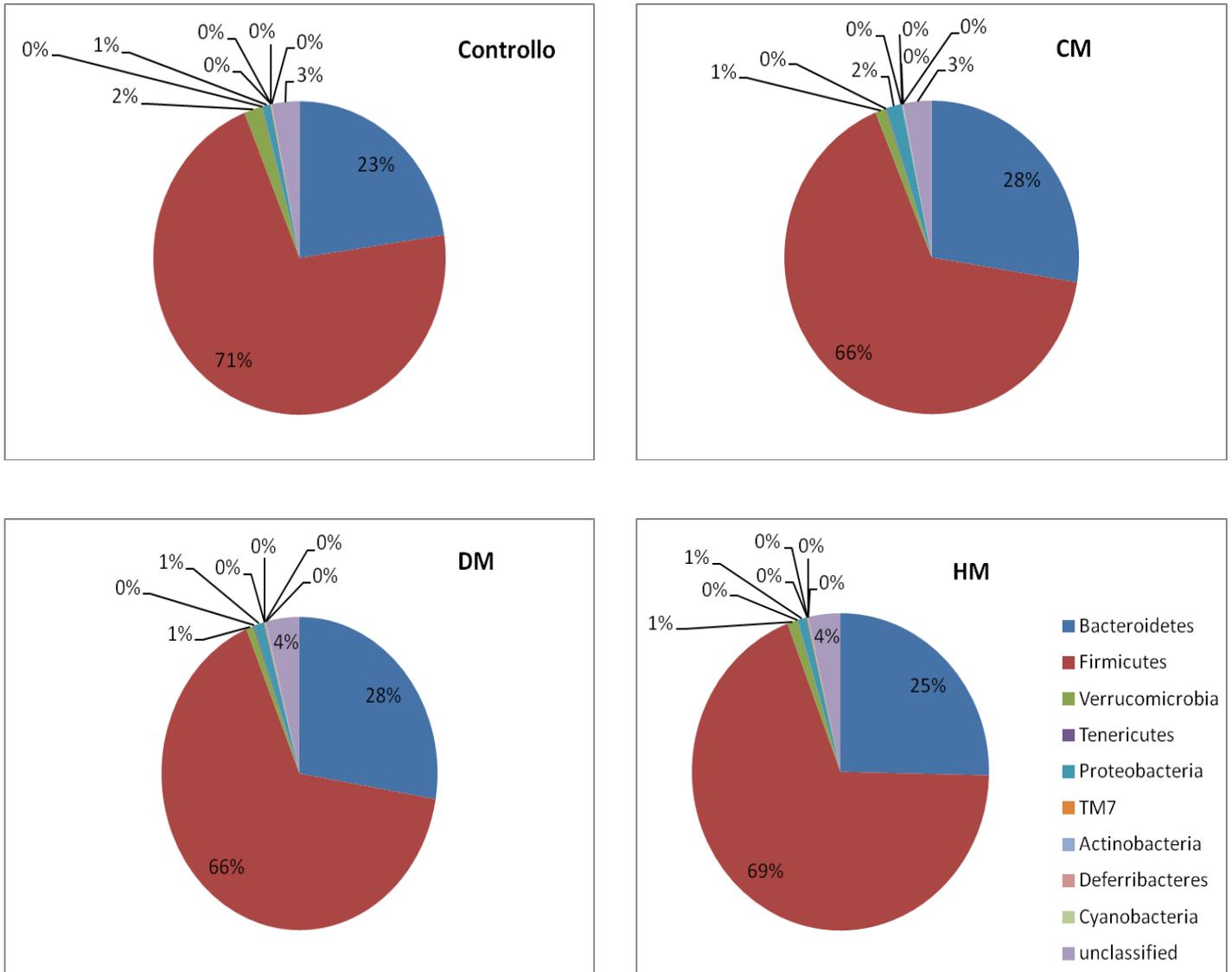
Attività enzimatiche antiossidanti/detossificanti



I valori sono le medie \pm ES di 8 differenti esperimenti in ogni gruppo sperimentale. Le lettere differenti agli apici indicano variazioni statisticamente significative ($p < 0.05$).

Figura 8

Composizione del microbiota - "Phyla"



Composizione in percentuale dei diversi "phyla batterici identificati nel microbiota intestinale dei ratti controllo e dei ratti trattati. I "phyla" che non sono stati rilevati non sono rappresentati nel grafico. Le differenze significative tra i diversi gruppi sono mostrate in tabella 3.

Tabella 3

Percentuale relativa dei diversi “phyla” batterici intestinali in relazione ai diversi trattamenti con latte

Phyla	Controllo		CM		CM vs Controllo	Student's test
	Media	DS	Media	DS	Ratio (%)	P value
Bacteroidetes	22,6567	1,1270	27,5487	1,9308	22	0,044
Firmicutes	71,1897	1,7548	66,2141	2,3567	-7	0,113
Verrucomicrobia	2,0072	0,4585	1,1679	0,2119	-42	0,145
Tenericutes	0,0759	0,0244	0,0895	0,0454	18	0,787
Proteobacteria	0,8658	0,1334	1,7016	0,6329	97	0,191
TM7	0,0641	0,0379	0,0117	0,0044	-82	0,231
Actinobacteria	0,0203	0,0101	0,0933	0,0495	360	0,147
Deferribacteres	0,0733	0,0294	0,0445	0,0208	-39	0,456
Cyanobacteria	0,0066	0,0031	0,0150	0,0121	127	0,485

Phyla	Controllo		DM		DM vs Controllo	Student's test
	Media	DS	Media	DS	Ratio (%)	P value
Bacteroidetes	22,6567	1,1270	27,6190	2,0400	22	0,055
Firmicutes	71,1897	1,7548	66,0782	2,5318	-7	0,123
Verrucomicrobia	2,0072	0,4585	0,8467	0,1317	-58	0,032
Tenericutes	0,0759	0,0244	0,1306	0,0610	72	0,422
Proteobacteria	0,8658	0,1334	1,1620	0,1205	34	0,125
TM7	0,0641	0,0379	0,0787	0,0204	23	0,742
Actinobacteria	0,0203	0,0101	0,0799	0,0361	294	0,138
Deferribacteres	0,0733	0,0294	0,0878	0,0175	20	0,679
Cyanobacteria	0,0066	0,0031	0,0018	0,0012	-72	0,169

<i>Phyla</i>	Controllo		HM		HM vs Controllo	Student's test
	Media	<i>DS</i>	Media	<i>DS</i>	<i>Ratio (%)</i>	<i>P value</i>
Bacteroidetes	22,6567	1,1270	25,3439	2,4933	9	0,490
Firmicutes	71,1897	1,7548	68,8673	2,9887	-4	0,488
Verrucomicrobia	2,0072	0,4585	1,1072	0,2096	-24	0,301
Tenericutes	0,0759	0,0244	0,0316	0,0200	313	0,179
Proteobacteria	0,8658	0,1334	0,9955	0,1524	17	0,404
TM7	0,0641	0,0379	0,1018	0,0468	-23	0,642
Actinobacteria	0,0203	0,0101	0,0319	0,0091	150	0,257
Deferribacteres	0,0733	0,0294	0,0391	0,0196	125	0,090
Cyanobacteria	0,0066	0,0031	0,0042	0,0042	-56	0,572

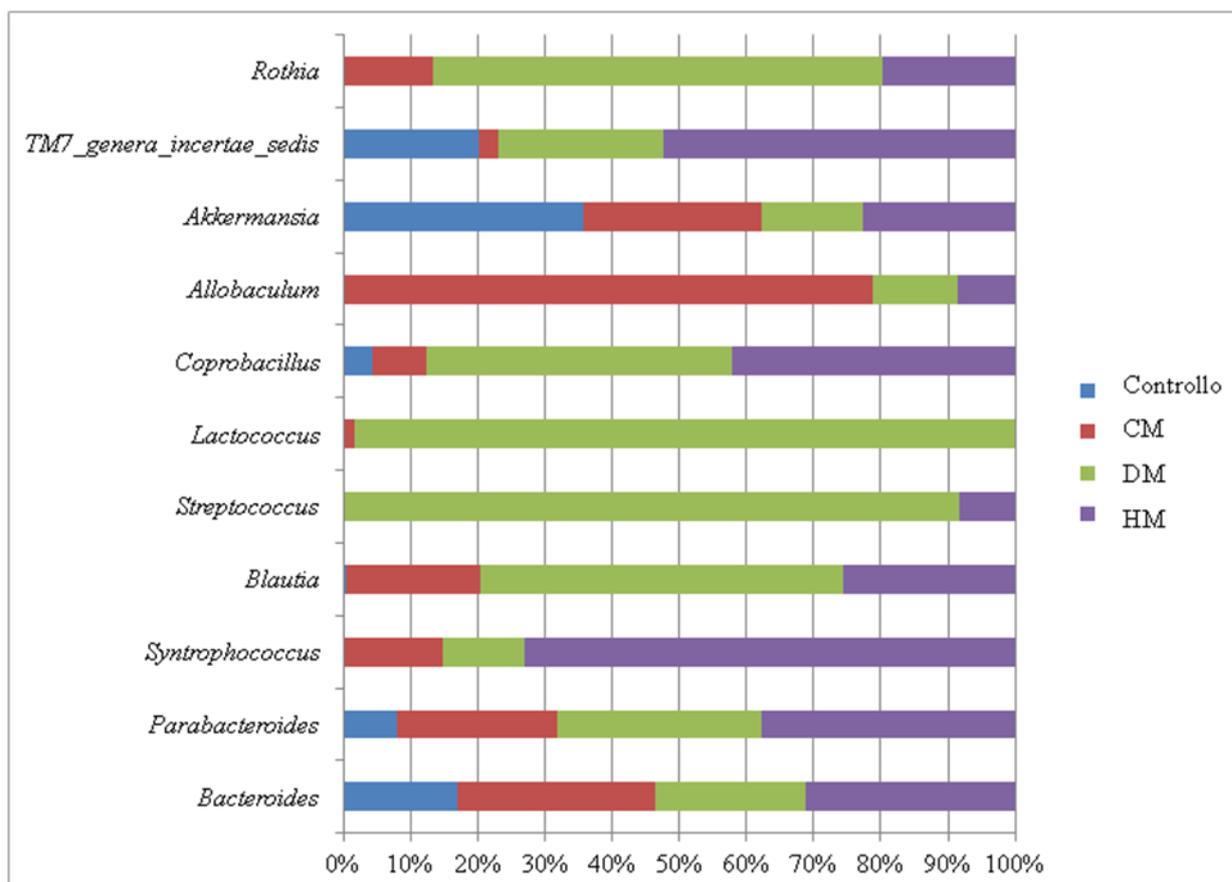
<i>Phyla</i>	CM		DM		HM vs CM	Student's test
	Media	<i>DS</i>	Media	<i>DS</i>	<i>Ratio (%)</i>	<i>P value</i>
Bacteroidetes	27,5487	1,9308	27,6190	2,0400	0	0,981
Firmicutes	66,2141	2,3567	66,0782	2,5318	0	0,970
Verrucomicrobia	1,1679	0,2119	0,8467	0,1317	-27	0,211
Tenericutes	0,0895	0,0454	0,1306	0,0610	46	0,611
Proteobacteria	1,7016	0,6329	1,1620	0,1205	-32	0,385
TM7	0,0117	0,0044	0,0787	0,0204	575	0,013
Actinobacteria	0,0933	0,0495	0,0799	0,0361	-14	0,828
Deferribacteres	0,0445	0,0208	0,0878	0,0175	97	0,137
Cyanobacteria	0,0150	0,0121	0,0018	0,0012	-88	0,264

<i>Phyla</i>	CM		HM		HM vs CM	Student's test
	Media	DS	Media	DS	Ratio (%)	P value
Bacteroidetes	27,5487	1,9308	25,3439	2,4933	-9	0,500
Firmicutes	66,2141	2,3567	68,8673	2,9887	4	0,502
Verrucomicrobia	1,1679	0,2119	1,1072	0,2096	-5	0,843
Tenericutes	0,0895	0,0454	0,0316	0,0200	-183	0,270
Proteobacteria	1,7016	0,6329	0,9955	0,1524	-71	0,304
TM7	0,0117	0,0044	0,1018	0,0468	89	0,084
Actinobacteria	0,0933	0,0495	0,0319	0,0091	-192	0,251
Deferribacteres	0,0445	0,0208	0,0391	0,0196	-14	0,853
Cyanobacteria	0,0150	0,0121	0,0042	0,0042	-258	0,418

<i>Phyla</i>	DM		HM		HM vs DM	Student's test
	Media	DS	Media	DS	Ratio (%)	P value
Bacteroidetes	27,6190	2,0400	25,3439	2,4933	-9	0,490
Firmicutes	66,0782	2,5318	68,8673	2,9887	4	0,488
Verrucomicrobia	0,8467	0,1317	1,1072	0,2096	24	0,301
Tenericutes	0,1306	0,0610	0,0316	0,0200	-313	0,179
Proteobacteria	1,1620	0,1205	0,9955	0,1524	-17	0,404
TM7	0,0787	0,0204	0,1018	0,0468	23	
Actinobacteria	0,0799	0,0361	0,0319	0,0091	-150	0,257
Deferribacteres	0,0878	0,0175	0,0391	0,0196	-125	0,090
Cyanobacteria	0,0018	0,0012	0,0042	0,0042	56	0,572

Figura 9

Composizione del microbiota – “Genera”



Il grafico mostra i “generi” batterici intestinali la cui variazione percentuale tra i diversi gruppi è statisticamente significativa. Ogni barra è settata al 100% per illustrare la proporzione relativa di ogni genere tra i gruppi sperimentali. L’assenza di colore indica che il “genere” non è stato rilevato nel gruppo in questione. Le variazioni statisticamente significative osservate tra i differenti gruppi sono mostrate in tabella 4.

Tabella 4

Differenze statisticamente significative delle percentuali relative dei diversi “generi” batterici intestinali in relazione ai diversi trattamenti con latte

	Controllo		CM		CM vs N	Student's test	Fisher's test
	Media	DS	Media	DS	Ratio (%)	P value	P value (CM vs Controllo)
<i>Parabacteroides</i>	0,1862	0,0262	0,3923	0,0561	111	0,005	1 (6 vs 7)
<i>Blautia</i>	0,00009	0,00009	0,0574	0,0224	6537	0,019	0,0291 (5 vs 1)

	Controllo		DM		DM vs N	Student's test	Fisher's test
	Media	DS	Media	DS	Ratio (%)	P value	P value (DM vs Controllo)
<i>Parabacteroides</i>	0,1862	0,0262	0,7194	0,1048	286	0,000	1 (7 vs 7)
<i>Blautia</i>	0,0009	0,0009	0,1443	0,0755	16587	0,082	0,0047 (7 vs 1)
<i>Streptococcus</i>	0	0	0,0164	0,0102	DM	0,132	0,021 (5 vs 0)
<i>Lactococcus</i>	0	0	0,0752	0,0318	DM	0,036	0,0047 (6 vs 0)
<i>Coprobacillus</i>	0,01	0,0041	0,1068	0,0427	966	0,043	1 (5 vs 4)
<i>Allobaculum</i>	0	0	0,0198	0,0082	DM	0,032	0,021 (5 vs 0)
<i>Akkermansia</i>	2	0,4585	0,8467	0,1317	-58	0,032	1 (7 vs 7)
<i>Rothia</i>	0	0	0,0197	0,006	DM	0,007	0,021 (5 vs 0)

	Controllo		HM		HM vs N	Student's test	Fisher's test
	Media	DS	Media	DS	Ratio (%)	P value	P value (HM vs Controllo)
<i>Bacteroides</i>	2,2973	0,3237	4,7243	1,0269	51	0,035	1 (6 vs 7)
<i>Parabacteroides</i>	0,1962	0,0262	0,9752	0,2354	81	0,005	1 (6 vs 7)
<i>Syntrophococcus</i>	0	0	0,0108	0,0049	100	0,034	0,021 (4 vs 0)
<i>Blautia</i>	0,0009	0,0009	0,043	0,0151	98	0,012	0,0291 (5 vs 1)
<i>Coprobacillus</i>	0,01	0,0041	0,0757	0,0228	87	0,011	0,1923 (6 vs 4)

	CM		DM		DM vs CM	Student's test	Fisher's test
	Media	DS	Media	DS	Ratio (%)	P value	P value (DM vs CM)
<i>Parabacteroides</i>	0,3923	0,0561	0,7194	0,1048	83	0,024	1 (7 vs 6)
<i>Streptococcus</i>	0,0000	0,0000	0,0164	0,0102	DM	0,165	0,021 (5 vs 0)
<i>Lactococcus</i>	0,0013	0,0013	0,0752	0,0318	5536	0,056	0,0291 (6vs 1)
<i>TM7</i>	0,0117	0,0044	0,0787	0,0204	575	0,013	0,1923 (7 vs 4)
<i>Rothia</i>	0,0029	0,0019	0,0197	0,006	570	0,031	0,2861 (5 vs 2)

	CM		HM		HM vs CM	Student's test	Fisher's test
	Media	DS	Media	DS	Ratio (%)	P value	P value (HM vs CM)
<i>Parabacteroides</i>	0,6923	0,0561	0,9572	0,2354	59	0,042	1 (6 vs 6)
<i>Coprobacillus</i>	0,0127	0,0081	0,0757	0,0228	83	0,026	0,0606 (6 vs 2)

CAPITOLO 8

DISCUSSIONE

L'uomo non è soltanto ciò che mangia, il suo stato di salute dipende però molto dagli effetti dell'alimentazione sulla regolazione di diverse funzioni fisiologiche. Squilibri nella nutrizione possono essere coinvolti nell'insorgenza di molte patologie, che vanno dalle malattie metaboliche, come diabete e obesità, alle patologie "killer" come il cancro e le malattie cardiovascolari. Sull'onda dell'interesse scientifico recentemente rivolto all'ipotesi dell'esistenza di una forte correlazione tra lo stato nutrizionale nella fase prenatale e postnatale e il rischio di sviluppare patologie metaboliche ed infiammatorie in età adulta, lo scopo di questa tesi è stato fondato sull'esigenza di confrontare gli effetti metabolici dovuti a somministrazioni isoenergetiche di differenti tipi di latte, alimento che da sempre rappresenta un pilastro fondamentale nell'alimentazione dell'uomo in tutte le fasce d'età. E' stato dunque condotto uno studio su un modello sperimentale animale a cui sono state somministrate quantità equicaloriche di latte bovino, latte di asina e latte umano per quattro settimane. Al termine del periodo sperimentale sono stati analizzati gli effetti di tali somministrazioni sulla regolazione dell'omeostasi metabolica, sull'insorgenza di uno stato infiammatorio e sulla composizione della flora batterica intestinale, che esercita una profonda influenza su numerose funzioni dell'ospite.

Durante l'intero periodo di trattamento sono stati monitorati il peso corporeo ed il cibo assunto per poter calcolare il guadagno di peso e l'energia introdotta sotto forma di cibo. A fine trattamento è stata analizzata la composizione corporea della carcassa in termini di contenuto lipidico, contenuto di acqua e contenuto proteico ed è stata effettuata l'analisi del bilancio energetico.

I risultati ottenuti mostrano che i ratti trattati con supplemento di latte mostrano una energia metabolizzabile assunta simile e significativamente più alta dei ratti controllo, ma gli animali che hanno ricevuto latte di asina o latte umano mostrano un più basso guadagno di peso corporeo e di accumulo lipidico se confrontati ai ratti supplementati con latte vaccino. Tali risultati evidenziano, dunque, nei ratti trattati con latte bovino una maggiore efficienza energetica (ottenuta dal rapporto percentuale tra il guadagno energetico e l'energia metabolizzabile assunta) rispetto agli altri gruppi sperimentali, indicando che in tali animali una maggiore quantità di energia introdotta viene depositata¹²⁷. Infatti, dall'analisi della composizione corporea è stata osservata un'aumentata percentuale lipidica nel gruppo CM mentre nessuna alterazione

significativa è stata trovata tra i ratti trattati con latte di asina e umano rispetto ai controlli. La ridotta efficienza energetica corporea riscontrata nei ratti DM e HM è conseguente ad un incremento dell'energia spesa che risulta significativamente più alta rispetto a quella degli altri due gruppi. Inoltre, il trattamento con latte umano ha portato ad un significativo incremento del contenuto proteico corporeo in tali ratti. Il contenuto relativamente basso di proteine associato ad un alto contenuto di grasso, presente nel latte umano, sembra essere in disaccordo con i risultati osservati dall'analisi della composizione corporea del gruppo trattato con questo latte, ma la qualità delle proteine presenti ed, in particolare, la presenza di aminoacidi essenziali potrebbero spiegare questa differenza¹²⁸. Inoltre, l'effetto della somministrazione di latte umano sul guadagno proteico potrebbe essere dovuto anche all'elevata concentrazione di fattori di crescita presenti in tale alimento che giocano un ruolo fondamentale nella proliferazione e differenziazione tissutale²⁰.

In accordo con il ridotto guadagno lipidico è stato riscontrato un livello serico significativamente più basso di trigliceridi nei ratti che hanno ricevuto latte di asina e di ALT nei ratti trattati con latte umano rispetto agli altri gruppi sperimentali. I livelli plasmatici di colesterolo e di MCP-1 non sono stati influenzati dal trattamento con i differenti tipi di latte, mentre concentrazioni significativamente più basse di citochine pro-infiammatorie e di glucosio sono state ritrovate nei gruppi trattati con latte di asina e umano se confrontate a quelle dei ratti controllo o trattati con latte bovino. Infine, i ratti trattati con latte umano mostrano il più basso livello serico di insulina ed una progressiva riduzione dell'indice HOMA è stata evidenziata negli animali differenzialmente trattati (CM>DM>HM), indicando una riduzione del rischio di insorgenza di insulino-resistenza. Il ruolo protettivo svolto dall'assunzione del latte umano contro l'intolleranza al glucosio e lo sviluppo di diabete di tipo 2 è stato dimostrato in diversi studi. Tali effetti possono essere attribuiti a specifici componenti del latte umano, in particolare alla presenza di ormoni come la leptina, l'adiponectina, la resistina e la grelina. In particolare, la leptina migliora la sensibilità all'insulina anche grazie alla sua capacità di ridurre i livelli di lipidi intracellulari nel fegato, nel muscolo scheletrico e nelle cellule β -pancreatiche¹²⁹.

Poiché le variazioni dell'efficienza energetica corporea sono legate alle variazioni dell'efficienza mitocondriale dei singoli organi nell'utilizzo dei substrati energetici ed il fegato rappresenta uno degli organi centrali del metabolismo corporeo ad elevato tasso metabolico, è stato ritenuto interessante analizzare l'effetto dei differenti tipi di latte su alcuni parametri epatici indicatori di dislipidemia e di infiammazione, sull'efficienza energetica mitocondriale epatica e sulla velocità di ossidazione degli acidi grassi, isolando i mitocondri mediante opportuni protocolli

sperimentali. I risultati relativi alla massa proteica mitocondriale indicano un aumento di tale massa riscontrato nei ratti DM ed HM rispetto ai gruppi controllo e CM, tale dato è in accordo con i risultati ottenuti dalla respirazione mitocondriale. La velocità di ossidazione degli acidi grassi risulta aumentata nei ratti trattati con latte bovino ed ulteriormente incrementata nei ratti che hanno ricevuto il supplemento di latte di asina o umano rispetto ai controlli. Tali dati sono ulteriormente rafforzati dalla misura dell'attività dell'enzima palmitoil-carnitina transferasi (CPT), responsabile del trasferimento degli acidi grassi nel compartimento mitocondriale, la cui attività è risultata significativamente più alta nei ratti trattati con latte di asina e umano rispetto agli altri due gruppi. Un aumento della velocità di ossidazione e dell'attività della CPT determina una riduzione dei depositi lipidici; dunque, una considerevole quantità di acidi grassi che arriva al fegato sarà diretta verso l'ossidazione anziché verso il deposito diminuendo il loro contenuto epatico e confermando l'attività ipo-lipidemica svolta dall'assunzione di questi due tipi di latte. Questi risultati dimostrano che il supplemento di latte di asina e di latte umano migliora, in tali animali, la capacità di utilizzare i grassi come substrato energetico e suggerisce che grande parte dell'energia introdotta viene dissipata attraverso un'aumentata attività metabolica.

Un altro meccanismo attraverso il quale il supplemento con latte d'asina e latte umano potrebbe contribuire a ridurre l'accumulo di grassi, può essere spiegato attraverso una diminuzione dell'efficienza metabolica. Quest'ultima può essere definita come una misura dell'entità con cui l'organismo ottiene energia sotto forma di composti ad elevato contenuto energetico (ATP), dai nutrienti che introduce con l'alimentazione. Essa consiste nell'accoppiamento tra l'ossidazione dei substrati e la sintesi di ATP e dipende quindi dall'entità della conduttanza protonica basale e della conduttanza protonica indotta, che sono vie di rientro di protoni nella matrice mitocondriale non associate a sintesi di ATP. La conduttanza protonica basale è una via di perdita protonica passiva dovuta a proprietà intrinseche della membrana mitocondriale interna. La conduttanza protonica indotta è dovuta alla presenza di agenti disaccoppianti quali gli acidi grassi che nello spazio intermembrana legano i protoni e nella forma protonata entrano nella matrice, dove cedono i protoni precedentemente legati.

I risultati della conduttanza protonica basale, intesa come cinetica della variazione del potenziale di membrana in funzione della velocità di consumo di ossigeno nei mitocondri epatici, asseriscono che una maggiore quantità di ossigeno viene consumata nei mitocondri dei ratti trattati con latte di asina e umano per mantenere un potenziale di membrana costante, rispetto a quella consumata dai ratti controllo o da quelli trattati con latte di vacca; di conseguenza, a parità di produzione di ATP, i ratti alimentati con latte di asina e latte umano, in confronto agli altri due gruppi, devono ossidare una maggiore quantità di substrato, che verrà sottratto al deposito.

L'aumentato "proton leakage" potrebbe essere dovuto sia alla differente quantità e qualità degli acidi grassi nei tre differenti tipi di latte, che determina modificazioni nella composizione lipidica della membrana mitocondriale interna, sia alla presenza di proteine disaccoppianti che, incrementando la permeabilità della membrana mitocondriale interna, permettono ai protoni presenti nello spazio intermembrana di tornare nella matrice mitocondriale, dissipando così, sottoforma di calore, il gradiente elettrochimico generato nella fosforilazione ossidativa e permettendo anche una veloce ossidazione dei substrati con esigua produzione di ATP. Sono stati determinati tramite western blot i livelli della proteina UCP2 (uncoupling protein 2) che sono maggiori in tutti i gruppi trattati rispetto ai controlli ed, in particolare, risultano significativamente più alti nei ratti trattati con latte di asina se confrontati agli altri tre gruppi. Nel caso della conduttanza protonica indotta i valori dei ratti che hanno ricevuto il supplemento di latte sono sovrapponibili e maggiori rispetto a quelli riscontrati nei ratti non trattati, in particolare i ratti trattati con latte umano tendono ad avere il più alto proton leak indotto dagli acidi grassi.

Dal momento che i mitocondri sono i principali produttori cellulari di radicali liberi e che tale produzione (presente anche in situazioni fisiologiche) aumenta quando il gradiente protonico ai lati della membrana mitocondriale si eleva raggiungendo un valore soglia⁵⁴, è stato ritenuto interessante ricercare gli effetti del proton leakage mitocondriale sullo stato antiossidante degli animali trattati valutando l'attività enzimatica dell'aconitasi (un enzima del ciclo di Krebs sensibile alle specie reattive dell'ossigeno in quanto danneggiato dalla presenza di radicali liberi) e il rilascio di acqua ossigenata nei mitocondri epatici. Gli effetti benefici finora riportati prodotti dal supplemento di latte di asina e di latte umano sono indicati da un'accentuata attività dell'aconitasi e da un ridotto rilascio di acqua ossigenata. Inoltre, il notevole miglioramento dello stato antiossidante (GSH/GSSG) ed il significativo aumento delle attività disintossicanti esercitate dagli enzimi NQO1 (NADPH chinone reduttasi) e GST (glutazione-S-transferasi) ritrovati nei gruppi DM e HM indicano una migliorata citoprotezione attribuibile, almeno in parte, all'attivazione del pathway Nrf2-ARE.

Sulla base di questi dati il latte di asina è considerato molto simile al latte umano non solo per la sua composizione e le sue proprietà nutrizionali, ma anche per i suoi effetti biologici. I risultati fin qui ottenuti hanno incoraggiato il proseguimento degli studi mirando ad una conoscenza sempre più approfondita circa gli effetti funzionali delle componenti alimentari dei tre differenti tipi di latte nella gestione del controllo metabolico. Dal momento che studi scientifici condotti su modelli sperimentali animali hanno indicato che notevoli cambiamenti delle funzioni

metaboliche si sviluppano dopo la nascita, cioè in seguito all'esposizione alla nutrizione per via gastrointestinale, e che la composizione della flora batterica intestinale influenza non solo i processi digestivi ma anche la composizione corporea e l'omeostasi metabolica, sono stati analizzati gli effetti della somministrazione del latte di vacca, latte di asina e latte umano sulla composizione del microbiota intestinale.

E' stato effettuato il pirosequenziamento del DNA genomico estratto dal contenuto cecale dei campioni e sono state valutate le variazioni dei differenti "taxa" batterici a diversi livelli di classificazione (phylum, famiglia e genere). La concentrazione di soli 3 phyla (Bacteroidetes, Verrucomicrobia e TM7) varia significativamente tra i differenti gruppi, mentre sono stati identificati 10 generi la cui percentuale relativa è influenzata dal supplemento dei diversi tipi di latte. La massima differenza in composizione è stata riscontrata tra il gruppo controllo e quello trattato con latte di asina, mentre nessuna differenza significativa è stata osservata tra quest'ultimo e quello trattato con latte umano. Il phylum Bacteroidetes risulta essere presente in maggiore concentrazione nei ratti che hanno ricevuto il supplemento di latte, con un significativo incremento nel gruppo trattato con latte bovino rispetto ai controlli. Tra i generi appartenenti a tale phylum, da studi su modelli murini affetti da colite, a *Parabacteroides* è stata associata un'importante funzione immunomodulatoria combinata a riduzione dello stato infiammatorio, inibizione della produzione di TNF- α da macrofagi in vitro e stabilizzazione del microbiota intestinale¹³⁰. E' interessante notare che l'incremento di *Parabacteroides* è stato osservato nei ratti trattati con latte di vacca ed è risultato ulteriormente accentuato nei ratti a cui è stato somministrato latte di asina e latte umano. L'analisi di Spearman, effettuata per evidenziare le potenziali correlazioni tra composizione del microbiota e gli altri parametri biologici analizzati in questo studio, ha confermato la correlazione negativa tra *Parabacteroides* e markers infiammatori (LPS, TNF- α).

Inoltre, nei ratti trattati con latte, è stata osservata un'aumentata concentrazione dei generi *Syntrophococcus* e *Blautia*, appartenenti al phylum Firmicutes. E' interessante notare come questi due generi sono differentemente correlati ai parametri biologici. Il genere *Syntrophococcus*, che è presente in una concentrazione significativamente più alta nel gruppo trattato con latte umano, è positivamente correlato con il contenuto proteico corporeo e il guadagno proteico, mentre il genere *Blautia* è positivamente correlato con la capacità respiratoria mitocondriale. In studi condotti su pazienti affetti da encefalopatia epatica, la presenza di *Blautia* è stata associata a migliori capacità cognitive, ridotta incidenza di patologie epatiche e diminuita

infiammazione¹³¹. Una più elevata concentrazione di *Blautia* è stata riscontrata nei ratti che hanno ricevuto il supplemento di latte di asina.

Nessuna differenza significativa tra i gruppi è stata osservata nella concentrazione del genere *Lactobacillus*, ma una più alta percentuale di *Streptococcus* e *Lactococcus* è stata riscontrata nel gruppo trattato con latte di asina. Studi precedenti hanno dimostrato che una miscela probiotica contenente il genere *Streptococcus thermophilus* protegge l'intestino e migliora l'infiammazione del colon in ratti con patologie infiammatorie intestinali sperimentalmente indotte¹³². Dal momento che grazie all'analisi di Spearman, è stato riscontrato che le concentrazioni di *Streptococcus* e *Lactococcus* sono negativamente correlate ad alcuni parametri infiammatori (TNF- α , LPS e rilascio di H₂O₂) che sono significativamente ridotti nei gruppi DM e HM, si potrebbe pensare che questi generi giocano un ruolo chiave in tale contesto.

Infine, nel gruppo trattato con latte di asina è stata osservata una riduzione dei livelli di *Akkermansia* (genere appartenente al phylum Verrucomicrobia), la cui funzione è associata alla capacità di usare efficientemente lo strato di muco della barriera intestinale come fonte di carbonio ed azoto. Studi precedenti hanno dimostrato che la somministrazione di *Akkermansia* è in grado di migliorare i disordini metabolici indotti da una dieta ad alto contenuto di grassi (aumento della massa grassa, stato infiammatorio ed insulino-resistenza) ripristinando la struttura e la funzione dello strato di muco intestinale¹³³. Probabilmente *Akkermansia* regola la funzione di barriera intestinale a livelli differenti. In condizioni basali, un'eccessiva degradazione dello strato di muco intestinale da parte dei batteri intestinali può contribuire all'instaurarsi di uno stato infiammatorio in quanto è facilitata l'interazione tra antigeni batterici e sistema immunitario. In questo studio nessun aumento della concentrazione di *Akkermansia* è stato riscontrato nei gruppi trattati, anzi, è stata osservata una riduzione significativa nel contenuto cecale dei ratti trattati con latte di asina ed una correlazione positiva con i livelli serici di glucosio, TNF- α e LPS è evidenziata dall'analisi di correlazione di Spearman. Tuttavia, l'esatto ruolo di *Akkermansia muciniphila* in tale contesto richiede ulteriori investigazioni.

Gli incoraggianti risultati ottenuti enfatizzano l'importanza di condurre ulteriori indagini sempre più finalizzate a dimostrare gli effetti funzionali dei componenti alimentari nella gestione dell'omeostasi metabolica ed a comprendere i meccanismi molecolari che collegano i batteri intestinali al metabolismo dell'ospite. Questo studio ha così confermato l'importanza di aprire la ricerca sulla nutrizione sperimentale verso nuove ed importanti prospettive al fine di indirizzare la popolazione verso scelte alimentari consapevoli, mirate a migliorare la salute e il benessere.

BIBLIOGRAFIA

1. Salimei E, Fantuz F. Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health, First Edition. Edited by Young W. Park and George F.W. Haenlein. 2013 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2013 by John Wiley & Sons, Ltd.
2. Gurr MI, Lipids: from intractable grease to oil for the wheels of life. *British journal of nutrition.* (1997) 77(6):827-31
3. Valentine RC, Valentie DL. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Prog Lipid Res* (2004) 43:383-402.
4. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Develop Neurosci* (2000) 18: 383-399.
5. Koletzko B, Lien E., Agostoni C., et al. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *Journal of perinatal medicine.* (2008) 36: 1-14.
6. Aksoy Y, Aksoy H, et al. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* (2006) 75: 75-79.
7. Smuts CM, Huang M, et al. A randomized trial of docosahexaenoic acid supplementation during the third trimester of pregnancy *Obstet Gynecol.* (2003) 101 (3): 469-479.
8. Olsen S F, Secher N J. Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study. *BMJ* (2002) 324: 447.
9. Kim HH, Cho S, et al. Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo. *J. Lipid Res.* (2006) 47: 921-930.
10. Vincenzetti S, Polidori P, Mariani P, Cammertoni N, Fantuz F, Vita A. Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chemistry.* 2008; 106: 640-9.
11. Malacarne, Martuzzi, Summer. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal* Volume 12, Issue 11, 2002, Pages 869–877
12. Kobayashi A , Kawai S , Obe Y , Y Nagashima Effects of dietary lactose and a lactase preparation on the intestinal absorption of calcium and magnesium in normal infants. *Am J Clin Nutr.* luglio 1975, 28 (7) :681-3.

13. Coppola R., Salimei E., Sorrentino E., Nanni M., Succi M., Belli Blanes R., Grazia L. Latte d'asina: un substrato ideale per la preparazione di bevande probiotiche, 36° Simp.Int. Zoot., Ancona 27 Aprile 2001, 57-61.
14. Salimei E., Fantuz F., Coppola R., Chiofalo B., Vincenzetti S., Polidori F., Varisco G.. Composition and characteristics of donkey milk. *Anim Res* 2004; 53: 67-78
15. Herrouin M, Molle D, Fauquant J, Ballestra F, Maubois JL, Leonoil J. New genetic variants identified in donkey's whey proteins. *J. Protein Chem.* 2000 Feb; 19(2):105-15.
16. G. Mandalari, K. Adel-Patient, V. Barkholt, Baro C, Bennett, L. Bublin M, Gaier S, Graser G, Ladics GS, Mierzejewska D, Vassilopoulou E, Vissers YM, Zuidmeer L, Rigby NM, Salt LJ, Defernez M, Mulholland F, Mackie AR, Wickham MS, Mills EN. In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: a multi-labotatory evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009 Dec;55:372-81. *Eup* 2009 Aug 2009
17. Liang L, Tajmir-Riahi HA, Subirade M. Interaction of beta-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Biomacromolecules.* 2008, 9:50-6.
18. Chiofalo B, Salimei E, Chiafalo L. Acidi grassi del latte d'asina: proprietà bio-nutrizionali e extranutrizionali. *Reprod Nutr Dev.* 2002 Jan-Feb;42(1):65-72
19. Domellöf M, Lönnerdal B, Dewey KG, Cohen RJ, Hernell O. Iron, zinc, and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status.. *Am J Clin Nutr.* 2004 Jan;79(1):111-5.
20. Ballard O , Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors *Pediatric clinics of North America*, 2013
21. Liao Y, Alvarado R, Phinney B, et al. Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period. *J Proteome Res* 2011;10(4):1746–54.
22. Gao X, McMahon RJ, Woo JG, et al. Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions. *J Proteome Res* 2012;11(7):3897–907.
23. Lonnerdal B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. *Adv Exp Med Biol* 2004;554:11–25.
24. Jensen RG. Handbook of milk composition. San Diego (CA): Academic Press, Inc; 1995.
25. Greer FR. Do breastfed infants need supplemental vitamins? *Pediatr Clin North Am* 2001;48(2):415–23.

26. Allen LH. B vitamins in breast milk: relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function. *Adv Nutr* 2012;3(3):362–9.
27. Egge H. 1993. The diversity of oligosaccharides in human milk. In *New Perspectives in Infant Nutrition*, ed. B Renner, G Sawatzki, pp. 12–26. Stuttgart: Thieme.
28. Kobata A, Yamashita K, Tachibana Y. 1978. Oligosaccharides from human milk. *Methods Enzymol.* 50:216–20.
29. Kunz C. et al.,2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 2000. 20:699–722.
30. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr* 2005;25:37–58.
31. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang X, et al. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J Nutr* 2005;135(5):1304–7.
32. Stahl B, Thurl S, Zeng J, Karas M, Hillenkamp F, et al. 1994. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 223:218–26
33. Tissier H. 1898. Recherches sur la flore intestinale de nourrissons. PhD thesis. Univ. Paris, Paris, France.
34. Schrotten H, Lethen A, Hanisch FG, Plogmann R, Hacker J, et al. 1992. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to epithelial cells by meconium and feces of breast-fed and formula-fed newborns: mucins are the major inhibitory component. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 15:150-58
35. Schwertmann A, Rudloff S, Kunz C. 1996. Potential ligands for cell adhesion molecules in human milk. *Ann. Nutr. Metab.* 40:252–62
36. Schwertmann A, Schrotten H, Hacker J, Kunz C. 1999. S-fimbriae from *Escherichia coli* bind to soluble glycoproteins from human milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 28:257–63
37. Carlson SE. 1985. N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 41:720–26
38. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):367-77. doi:10.1038/nrm2391.

39. Tilg Z, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):772-83. Epub 2006 Sep 22.
40. Wellen KE, Hotamisligil Inflammation, stress, and diabetes. *GSI Clin Invest*. 2005 May;115(5):1111-9.
41. Cani P, Osto M., Geurts L., Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*. 2012 Jul-Aug;3(4):279-88. Epub 2012 May 14. Review. PMID:22572877
42. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; 57:1470-81; PMID:18305141; <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1403>.
43. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009; 58:1091-103; PMID:19240062; <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.165886>.
44. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444:1027-31; PMID:17183312; [http:// dx.doi.org/10.1038/nature05414](http://dx.doi.org/10.1038/nature05414).
45. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1761-72; PMID:17456850; <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1491>.
46. Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res* 2005; 13:1000-7; PMID:15976142; <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2005.117>.
47. Cani PD, Dewever C, Delzenne NM. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br J Nutr* 2004; 92:521-6; PMID:15469657; <http://dx.doi.org/10.1079/BJN20041225>.
48. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gérard P, Harach T, Moser M, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J* 2010; 24:4948-59; PMID:20724524; <http://dx.doi.org/10.1096/fj.10-164921>.

49. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 2011; 60:2775-86; PMID:21933985; <http://dx.doi.org/10.2337/db11-0227>.
50. Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH, Mammalian mitochondrial complex I: Biogenesis, Regulation and Reactive Oxygen Species generation in "Antioxid Redox Signal."(2009).
51. Tamitsuka E, Kita K., Esumi H, Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit In "Proc jpn Acad ser B Phys Biol.Sci" 2009;85(7):258-65.
52. Carbajo R. J., Kellas F. A., Runswick M. J., Montgomery M. G., Walzer J. E., Neuhaus D. J. Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an alpha-subunit In "Mol. Biol." (2005); 351: pp. 824-838.
53. Brand M. D., The proton leak across the mitochondrial inner membrane In "Biochim. Biophys. Acta." (1990)1018: 128-133.
54. Brand M.D., Chien L. F., Ainscow E. K., Rolfe D.F., Porter R. K., The causes and functions of mitochondrial proton leak. In "Biochim. Biophys. Acta." (1994) 1187: 132-139.
55. Rolfe D.F., Brand M.D., Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. In "Am. J. Physiol." (1996)271: C1380-C1389.
56. Soboll S., Grundel S., Schwabe U., Scholtz R., Influence of fatty acids on energy metabolism. Kinetics of changes in metabolic rates and changes in subcellular adenine nucleotide contents and pH gradients following addition of octanoate and oleate in perfused rat liver. In "Eur J Biochem." (1984)141: 231-236.
57. Wojtczak L., Effect of long-chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport, and energy-coupling processes. In "J. Bioenerg. Biomembr."(1976) 8: 293-311.
58. Wojtczak L., Schönfeld P., Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. In "Biochim. Biophys. Acta." (1993)1183: 41-57.
59. Hulsmann W.C., Elliot W.B., Slater E.C., The nature and mechanism of action of uncoupling agents present in mitochondria preparations. In "Biochim. Biophys. Acta" (1960) 39: 267-276.

60. Zborowski J., Wojtczak L., Induction of swelling of liver mitochondria by fatty acids of various chain length. In "Biochim. Biophys. Acta." (1963) 70: 596-598.
61. Wrigglesworth J.M., Sharpe M.A., Cooper C.E., Regulation of electron flux through cytochrome c oxidase: pH, delta pH and fatty acids. In "Biochem. Soc. Trans." (1993)21: 781-784.
62. Dedukhova, V.I.,Mokhova,E.N., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., Arrigoni-Martelli, E.,Bobyleva, V.A. Uncoupling effect of fatty acids on heart muscle mitochondria and submitochondrial particles. In "FEBS Lett." (1991) 295: 51-54.
63. Schönfeld P., Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? In " FEBS Lett." (1990)264: 246-248.
64. Argiles J.M., Busquets S., Lopez-Soriano F.J., The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2002) 293: 1145-1152.
65. Fleury,C.,Nevrora,M.,Raimbault,S.,Champigny,O,LeviMeyrueis,C.,BoouillaudF.,Seldin, M.F., Surwit, R.F., Ricquier, D., Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. In "Nat. Genet. " (1997)15:269-272.
66. Boss,O.,Samec,S.,PaoliniGiacobino,A.,Rossier,C.,Dulloo,A.,Seydoux,J.,Muzzin,P.,Giacobino, J.P Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. In "FEBS Lett." (1997)408: 39-42.
67. Mao,W.,Yu,X.X.,Zhong,W.,Li,W.,Brush,J.,Sherwood,S.W.,Adams,S.H.,Pan,J., UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. In "FEBS Lett. " (1999) 443: 326-330.
68. Yu,X.X.,Mao,W.,ZhongW.,Schow,P.,Brush,J.,Sherwood,S.W.,Adams,S.H.,Pan Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation J. In "FASEB J." (2000) 14: 1611-1618.
69. Vasquez- Vivar, J., Kalyanaraman, B., Kennedy, MC., Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. In "J Biol Chem." (2000); 275: pp. 14064-14069.
70. Longo VD., Viola KL., Finch CE.,. Reversible inactivation of superoxide-sensitive aconitase in Abeta1-42-treated neuronal cell lines. In "J Neurochem" (2000); 75: pp. 1977-1985.

71. Wallace DC., Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases ? "In Science"(1992); 256: pp. 628-632.
72. Quant PA., Robin D., Robin P., Ferre P., Brand MD., Girard J., Control of hepatic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase during the foetal/neonatal transition, suckling and weaning in the rat. In "Eur J Biochem" (1991); 195 : pp. 149-154.
73. Perry JJ., Shin DS., Getzoff ED., Tainer JA., The Structural Biochemistry of the Superoxide Dismutases .In "Biochim Biophys Acta"(2009).
74. Kulinskii VI., Kolesnichenko LS., Glutathione system. I. Synthesis, transport, glutathione transferases, glutathione peroxidases In "Biomed Khim" (2009);55(3):255-77.
75. Battin EE., Brumaghim JL., Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. In "Cell Biochem Biophys"(2009);55(1):1-23.
76. Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux Prog Lipid. Res (2002) 41: 197-239.
77. Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. Mol. Pharmacol. (1995) 48: 825-834
78. Reinhardt C, Reigstad CS, & Backhed F (2009) Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 48(3):249-256
79. Qin J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature (2010) 464/7285:59-65
80. Rajilic-Stojanovic M Function of the microbiota. Best practice & research. Clinical gastroenterology (2013) 27(1):5-16
81. Cani PD & Delzenne NM The role of the gut microbiota in Energy metabolism and metabolic disease. Current pharmaceutical design (2009), 15 (13):1546-1558.
82. Round JL & Mazmanian SK The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature reviews Immunology(2009), 9(5):313-323.
83. Le Blanc JG, et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. Current opinion in biotechnology, (2013) 24(2):160-168

84. Flint HJ, Scott KP, Louis O, & Duncan SH The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* (2012), 9(10):577-589
85. Backhed F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2004), 101(44):15718-15723.
86. Sommer F & Backhed F The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature reviews Microbiology* (2013), 11(4):227-238
87. Spor A, Koren O, & Ley R Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature reviews Microbiology* (2011), 9(4):279-290
88. Turnbaugh PJ, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457(7228):480-484.
89. Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr.*, 2003; 91:48-55
90. Hanson L.A., Korotkova M. The role of breastfeeding. In *prevention of neonatal infection. Semin Neonatol.*, 2002; 7:275-81
91. Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77:1537S-1543S, 2003.
92. Hao W.L., Lee Y.K. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol. Biol.*, 2004; 268:491-502
93. Marteau P., Pochart P., Dore J., et al. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ. Microbiol.*, 67:4939-4942, 2001.
94. Giammanco G.M., Mammina C. Metodi molecolari e automazione dell'identificazione e della tipizzazione batterica. In Giammanco G. e De Flora S., *Metodi molecolari in Sanità Pubblica*. Centro Scientifico Editore, Torino, 2004, pp. 3-17.
95. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:167-173, 2004.
96. Cani PD (2013) Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome. *Briefings in functional genomics* 12(4):381-387.
97. Legendre, P. and E. Gallagher, Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 2001. 129(2): p. 271-280.

98. Jorgensen J., Mortensen P.B. Utilization of shortchain fatty acids by colonic mucosal tissue strips. A new method of assessing colonic mucosal metabolism. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2000; 35:659-566
99. Guarner F. The colon as an organ: habitat of bacterial fl ora. *Nutr. Hosp.*, 2002; 17 :7-10
100. Butler J.E., Sun J., Weber P., Navarro P., Francis D. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifi es the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology.* 2000; 100:119–30
101. Grönlund M.M., Arvilommi H., Kero P., Lehtonen O.P., Isolauri E. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch. Dis. Child Fetal. Neonatal. Ed.*, 2000; 83:F186-192
102. Tanaka K, Ishikawa H. Role of intestinal bacterial fl ora in oral tolerance induction. *Histol Histopathol.*2004; 19:907-14
103. Brandtzaeg P.E. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2002; 964:13-45
104. Guarner F., Malagelada J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 2003; 361:512-9
105. Tanaka K, Ishikawa H. Role of intestinal bacterial flora in oral tolerance induction. *Histol Histopathol.*2004; 19:907-14
106. Nolan JP, Leibowitz AI. Endotoxins in liver disease. *Gastroenterology* 1978; 75:765-6; PMID:710846. 85. Nolan JP. The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology* 1975; 69:1346-56; PMID:1104401.
107. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42:44-52; PMID:15895401; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20734>.
108. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palù G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:518-25; PMID:17023554; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00024.2006>
109. Farhadi A, Gundlapalli S, Shaikh M, Frantzides C, Harrell L, Kwasny MM, et al. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in nonalcoholic

steatohepatitis. *Liver Int* 2008; 28:1026-33; PMID:18397235; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01723.x>.

110. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48:206-11; PMID:11156641; <http://dx.doi.org/10.1136/gut.48.2.206>.

111. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37:343-50; PMID:12540784; <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2003.50048>.

112. Folch J., Lees M., Sloane Stanley GH.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. In "*Biol Chem*"(1957); 226: 497-509

113. Laemmli UK., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In "*Nature*"(1970);227(5259):680-5.

114. Liverini G., Iossa S., Barletta A., The effect of cold exposure on rat liver mitochondrial respiratory capacity in "*Comp. Biochem. Physiol. B.*" (1991); 98: pp. 583-585.

115. Hartree EF, Cambridge: molecular biology. *Science* 1968 Apr 19;160(3825):252.

116. Srere PA. Citrate synthase *Meth Enzymol* (1969) 13: 3-5

117. Estabrook RW, Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios in "*Methods Enzymol.*" (1967); 10: pp. 41-47.

118. Nedergaard, J. The relationship between extramitochondrial Ca²⁺ concentration, respiratory rate, and membrane potential in mitochondria from brown adipose tissue of the rat. *Eur. J. Biochem.* (1983)133:85-191

119. Richieri G.V., Anel A., Kleinfeld A.M. Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. In "*Biochemistry*"(1993) 32: 7574-7580.

120. Alexson SE, Nedergaard J. A novel type of short-and medium-chain acyl-CoA hydrolases in brown adipose tissue mitochondrial. In "*J.Biol:Chem*" (1988) 263 (27):13564-13571.

121. Gardner PR., Aconitase: sensitive target and measure of superoxide in "*Methods Enzymol.*" (2002); 349: pp. 9-23.

122. Drapier IC., Hibbs JB Jr., Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis in "*Methods Enzymol.*" (1996); 269: pp. 26-36.

- ^{123.} Dewulf J, Cani PD, Claus S et al. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women *Gut* 2013;62:1112-1121 doi:10.1136/gutjnl-2012-303304
- ^{124.} Wu, G.D., et al., Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol*, 2010. 10: p. 206.
- ^{125.} Caporaso, J.G., et al., QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 2010. 7(5): p. 335-6.
- ^{126.} Legendre, P. and E. Gallagher, Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 2001. 129(2): p. 271-280.
- ^{127.} Lionetti L, Cavaliere G, Bergamo P, Trinchese G, De Filippo C, Gifuni G, Gaita M, Pignalosa A, Donizzetti I, Putti R, Di Palo R, Barletta A, Mollica MP Diet supplementation with donkey milk upregulates liver mitochondrial uncoupling, reduces energy efficiency and improves antioxidant and antiinflammatory defences in rats. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Oct;56(10):1596-600. doi: 10.1002/mnfr.201200160. Epub 2012 Aug 29.
- ^{128.} Pengxiang She, Kristine C. Olson, Yoshihiro Kadota, Ayami Inukai, Yoshiharu Shimomura, Charles, L. Hoppel, Sean H. Adams Yasuko Kawamata Hideki Matsumoto Ryosei Sakai Charles H. Lang Christopher J. Lynch. Leucine and Protein Metabolism in Obese Zucker Rats Published: March 20, 2013 DOI: 10.1371/journal.pone.0059443
- ^{129.} Guardamagna O, Abello F, Cagliero P, Lughetti L. Impact of nutrition since early life on cardiovascular prevention. *Ital J Pediatr*. 2012 Dec 21;38:73. doi: 10.1186/1824-7288-38-73.
- ^{130.} Kverka M, Zakostelska Z, Klimesova K, Sokol D, Hudcovic T, Hrnčir T, Rossmann P, Mrazek J, Kopecny J, Verdu EF, Tlaskalova-Hogenova H. Oral administration of *Parabacteroides distasonis* antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clin Exp Immunol*. 2011 Feb;163(2):250-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04286.x. Epub 2010 Nov 19.
- ^{131.} Bajaj, Hylemon, Ridlon, Heuman, Daita, White, Monteith, Noble, Sikaroodi, M. Gillevet. Colonic mucosal microbiome differs from stool microbiome in cirrhosis and hepatic encephalopathy and is linked to cognition and inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012 Vol. 303no.G675-G685 DOI: 10.1152/ajpgi.00152.2012

- ^{132.} Tooley KL, Howarth GS, Lymn KA, Lawrence A, Butler RN. Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* does not affect mucositis severity or tumor progression in the tumor-bearing rat. *Cancer Biol Ther*. 2011 Jul 15;12(2):131-8. Epub 2011 Jul 15.
- ^{133.} Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, Cani PD. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 28;110(22):9066-71. doi: 10.1073/pnas.1219451110. Epub 2013 May 13.