

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



**SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE
AREA DIDATTICA SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI**

**XXXIII CICLO DOTTORATO
in
BIOLOGIA**

**“Effetti di diete ad elevato contenuto di grassi e fruttosio sullo stress ossidativo,
infiammazione e insulino – resistenza”**

**“Effects of lipid and fructose rich diets on oxidative stress, inflammation and
insulin-resistance”**

**TUTOR
Ch.ma Prof.ssa
Susanna Iossa**

**DOTTORANDA
Cristina Gatto**

**CORDINATORE
Ch.mo Prof.
Salvatore Cozzolino**

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

ABSTRACT	3
SOMMARIO	6
INTRODUZIONE	10
CAPITOLO 1: IL FEGATO	11
1.1 NAFLD	11
1.2 Patogenesi della NAFLD	14
1.3 Meccanismo di sviluppo della NAFLD	16
CAPITOLO 2: IL TESSUTO ADIPOSO	20
2.1 Obesità e tessuto adiposo	20
2.2 Tessuto adiposo bianco: accumulo di energia e secrezione di ormoni e adipochine	23
2.3 Pathways molecolari che collegano l'infiammazione riscontrata nell'obesità e l'insulino-resistenza	25
2.4 Crosstalk tra tessuto adiposo e sistema nervoso centrale (SNS)	28
CAPITOLO 3: IL CERVELLO	30
3.1 Western diet e aging	30
3.2 Western diet e funzionalità cognitiva	31
3.3 Basi neuronali dei deficit cognitivi causati da una western diet	35
SCOPO DELLA TESI	38
DISEGNO SPERIMENTALE	43
MATERIALE E METODI	45
Misura della composizione corporea	45
Misura del contenuto energetico della carcassa	45
Misura del contenuto lipidico, proteico e di acqua della carcassa	46
Misura del bilancio energetico	47
Profilo plasmatico	49
Test di tolleranza al glucosio	49
Markers infiammatori plasmatici	50
Attività mitocondriale in ippocampo, corteccia prefrontale e fegato	51

Composizione del fegato	52
Misura del danno ossidativo in omogenati di ippocampo, corteccia prefrontale e fegato	53
Lipogenesi nel fegato	55
WESTERN BLOT nel fegato, e-wat, ippocampo e corteccia prefrontale	57
Markers infiammatori in e-wat, fegato, ippocampo e corteccia prefrontale	60
Analisi statistiche	61
RISULTATI	62
Composizione corporea	62
Parametri plasmatici	63
Omeostasi glicemica e sensibilità all'insulina nel fegato	66
Composizione epatica	68
Lipogenesi de novo	70
Markers di danno ossidativo epatico	71
Markers di infiammazione epatica	73
Funzione epatica mitocondriale	75
Attività mitocondriale nel cervello	77
Markers di danno ossidativo in ippocampo e corteccia prefrontale	80
Espressione proteica di UCP2, PGC-1 α , PPAR α	82
Tessuto adiposo bianco (e-WAT)	84
Markers di infiammazione e-WAT, ippocampo e corteccia prefrontale	85
Segnalazione dell'insulina nel e-WAT, ippocampo e corteccia prefrontale	90
DISCUSSIONE	92
BIBLIOGRAFIA CITATA	104
BIBLIOGRAFIA CONSULTATA	133
ELENCO PUBBLICAZIONI	146

ABSTRACT

Obesity is one of the major problems of the 21st century as it contributes to the increasing prevalence of chronic diseases related to it, including insulin resistance, type 2 diabetes (Zatterale et al., 2020) and neurodegenerative diseases. Growing evidence suggests a critical role for overeating in the development of these diseases. In particular, fats and sugars have been identified as risk factors for overweight and neuro-degeneration, especially in middle age, which represents an early stage of the aging process in which animals are more prone to develop insulin resistance and liver damage (steatopatitis, fibrosis and cirrhosis) (Lohr et al., 2016). In addition, it has been observed that one of the factors that can mostly contribute to aging and alter brain function is the diet and in particular the consumption of high fats-high sugars diet (Granhholm et al. 2008). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to induce an impairment of cerebral functions. (Papa et al., 2008).

Obesity is accompanied by a chronic low-grade of inflammation in the adipose tissue, considered a crucial risk factor for the development of insulin resistance and type 2 diabetes in obese. The triggers of inflammation of the adipose tissue are still poorly defined. However, obesity-induced expansion of adipose tissue produces intrinsic signals (adipocytes death, hypoxia, and mechanical stress) capable to induce the inflammatory response (Zatterale et al., 2020). The increased risk for obese to develop brain diseases may be due to the ability of adipose tissue to communicate with the brain and affect its function. Therefore, the analysis of specific markers, whose adipose and / or brain levels are influenced by diet, could help to uncover the intersection between obesity and neuro-

degeneration. In particular, pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF α), are implicated in the development of neuronal insulin resistance (Lourenco et al., 2013). To this aim an experimental model of middle-aged rats (11 months) was used. The rats were fed with a high-fat-high-fructose diet (HFF rats), named "western diet" and compared with rats of the same age that were fed with a control diet (LF rats). The HFF rats showed a significant increase in body weight, energy and lipid gain compared to the LF rats. The HFF rats showed hepatic insulin resistance, along with an increase in plasma triglycerides, cholesterol and tumor necrosis factor alpha. Liver lipids, triglycerides and cholesterol were higher in HFF rats, while a significant decrease in stearoyl-CoA desaturase activity was found in this tissue. A marked increase in the amount of mitochondrial respiratory chain complex I protein was found in HFF rats, concomitant with a decrease in its contribution to mitochondrial respiration. Lipid peroxidation as a marker of oxidative stress, as well as the activity of NADPH oxidase, were significantly higher in HFF, while the antioxidant enzyme catalase decreased in these rats. Myeloperoxidase activity and lipocalin content increased, while peroxisome proliferator-activated gamma receptor decreased in HFF rats. On brain, mitochondrial function was analyzed by high resolution respirometry in the two areas mostly involved in neurodegenerative diseases: hippocampus and prefrontal cortex. Markers of oxidative stress were also evaluated, as well as the protein content of the uncoupling protein 2 (UCP2), peroxisome proliferator – activated receptor – gamma coactivator (PGC)-1 alpha and the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α). A decrease in the amount of complexes I and II, and an increase in the amount of complex IV in the hippocampus was found following dietary treatment, thus showing a greater

susceptibility than the cortex. Feeding an HFF diet induced a significant reduction in the amount of UCP2, PGC-1 α and PPAR α , in both brain areas.

In order to study the metabolic response of both the white adipose tissue and the brain in middle-aged rats fed a typical Western diet (rich in saturated fat and fructose, HFF) and to verify if there is a similarity between the two tissues, specific cyto / adipokines (tumor necrosis factor alpha (TNF- α), adiponectin), critical inflammatory markers of obesity (haptoglobin, lipocalin) and insulin signaling pathway (insulin receptor substrate 1 (IRS), Akt , Erk) were evaluated out in both epididymal white adipose tissue (e-WAT), hippocampus and frontal cortex. A significant increase in TNF- α was found both in the e-WAT and in the hippocampus of HFF rats, while the expression of haptoglobin and lipocalin was affected differently in the various tissues. Interestingly, the amount of adiponectin was found to be significantly reduced in the e-WAT, hippocampus and frontal cortex of HFF rats. Insulin signaling was impaired by the HFF diet in e-WAT but not in the brain. The obtained results, provide evidence that middle-aged rats show susceptibility to a short-term "western diet", showing impaired redox homeostasis, insulin resistance, early mitochondrial changes in the liver, impaired brain function with the hippocampus more susceptible to metabolic insults and the similarities in the response between the adipose tissue and the brain are highlighted to underline a possible "crosstalk" between the two areas.

SOMMARIO

L'obesità rappresenta uno dei principali problemi del 21° secolo in quanto contribuisce alla crescente prevalenza di malattie croniche ad essa correlate, tra cui la resistenza all'insulina, il diabete di tipo 2 (Zatterale et al.,2020) e malattie neurodegenerative. Prove crescenti suggeriscono un ruolo critico della sovralimentazione nello sviluppo di tali patologie. In particolare, grassi e zuccheri nella dieta sono stati identificati come fattori di rischio per il sovrappeso e la neuro-degenerazione, soprattutto nella mezza età, che rappresenta una fase precoce del processo di invecchiamento in cui gli animali sono maggiormente preposti a sviluppare insulino-resistenza e danni al fegato (steatopatiti, fibrosi e cirrosi) (Lohr et al.,2016). In più è stato osservato come uno dei fattori che può maggiormente contribuire all'invecchiamento e alterare la funzionalità celebrale è rappresentato dalla dieta ed in particolare dal consumo di diete ad elevato contenuto di grassi e zuccheri (Granhholm et al.2008). La disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo contribuiscono all'alterazione celebrare (Papa et al.,2008).

L'obesità è accompagnata da un'inflammatione cronica di basso grado nel tessuto adiposo, considerata un fattore di rischio cruciale per lo sviluppo dell'insulino-resistenza e del diabete di tipo 2 negli individui obesi. I fattori scatenanti dell'inflammatione del tessuto adiposo sono ancora scarsamente definiti. Tuttavia, l'espansione del tessuto adiposo indotta dall'obesità produce segnali intrinseci (ad es. morte degli adipociti, ipossia e stress meccanico) in grado di avviare la risposta infiammatoria (Zatterale et al.,2020). L'aumento del rischio per gli individui obesi di sviluppare malattie cerebrali potrebbe essere dovuto alla

capacità del tessuto adiposo di comunicare con il cervello e influire sulla sua funzione. Pertanto, l'analisi di markers specifici, i cui livelli adiposi e / o cerebrali sono influenzati dalla dieta, potrebbe contribuire a svelare l'intersezione tra obesità e neuro- degenerazione. In particolare, le citochine pro-infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α), sono implicate nello sviluppo dell'insulina-resistenza neuronale (Lourenco et al.,2013).

Per valutare l'effetto di 4 settimane con una dieta ad alto contenuto di grassi e fruttosio sulla composizione corporea, il bilancio energetico, i marcatori specifici di stress ossidativo, infiammazione e la sensibilità all'insulina nel fegato è stato utilizzato un modello sperimentale costituito da ratti di mezza età (11 mesi). Tali ratti sono stati alimentati con una dieta ricca di acidi grassi saturi e fruttosio (i ratti HFF), imitando la "western diet" e confrontati con ratti della stessa età che sono stati alimentati una dieta di controllo (ratti LF). I ratti HFF hanno mostrato un aumento significativo nell'aumento di peso corporeo, energia e lipidi rispetto ai ratti LF. I ratti HFF hanno mostrato resistenza all'insulina epatica, insieme ad un aumento dei trigliceridi plasmatici, del colesterolo e del fattore di necrosi tumorale alfa. I lipidi epatici, i trigliceridi e il colesterolo erano più elevati nei ratti HFF, mentre in questo tessuto è stata riscontrata una significativa diminuzione dell'attività della stearyl-CoA desaturasi. Nei ratti HFF è stato riscontrato un marcato aumento della quantità di proteine del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, concomitante a una diminuzione del suo contributo alla respirazione mitocondriale. La perossidazione lipidica come marcatore dello stress ossidativo, così come l'attività della NADPH ossidasi, erano significativamente più alta nei HFF, mentre l'enzima antiossidante catalasi diminuiva in questi ratti. L'attività della mieloperossidasi e il contenuto di

lipocalina sono aumentati, mentre il recettore gamma attivato dal proliferatore dei perossisomi è diminuito nei ratti HFF.

A livello celebrale la funzione mitocondriale è stata analizzata mediante respirometria ad alta risoluzione nelle due aree maggiormente coinvolte in patologie neurodegenerative: ippocampo e corteccia prefrontale. Sono stati valutati anche i marcatori dell'equilibrio ossidativo, nonché il contenuto proteico della proteina disaccoppiante 2 (UCP2), del coattivatore 1-alfa (PGC-1 α) del recettore gamma attivato da proliferatori dei perossisomi e del recettore alfa attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR α). Una diminuzione della quantità dei complessi I e II seguita da un aumento della quantità del complesso IV nell'ippocampo è stato riscontrata in seguito al trattamento dietetico mostrando pertanto una maggiore suscettibilità rispetto alla corteccia. L'alimentazione con una dieta HFF ha indotto una significativa riduzione della quantità di UCP2, PGC-1 α e PPAR α , in entrambe le aree cerebrali.

In fine per studiare la risposta metabolica sia del tessuto adiposo bianco che del cervello in ratti di mezza età alimentati con una tipica dieta occidentale (ricca di grassi saturi e fruttosio, HFF) e verificare se esiste una somiglianza tra i due tessuti. Cito / adipochine specifiche (fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), adiponectina), marcatori infiammatori critici dell'obesità (aptoglobina, lipocalina) e via di segnalazione dell'insulina (substrato 1 del recettore dell'insulina (IRS), Akt, Erk) sono state valutate sia nel tessuto adiposo bianco dell'epididimo (e-WAT), che nell'ippocampo e nella corteccia frontale. E' stato riscontrato un aumento significativo del TNF- α sia nell'e-WAT che nell'ippocampo dei ratti HFF, mentre l'espressione dell'aptoglobina e della lipocalina è stata influenzata in modo diverso nei vari tessuti. È interessante notare che la quantità di adiponectina

è stata trovata significativamente ridotta nell'e-WAT, nell'ippocampo e nella corteccia frontale dei ratti HFF. La segnalazione dell'insulina è stata compromessa dalla dieta HFF nell'e-WAT ma non nel cervello. I risultati ottenuti forniscono la prova che i ratti di mezza età mostrano suscettibilità a una "dieta western" a breve termine, mostrando omeostasi redox alterata, resistenza all'insulina, alterazioni mitocondriali precoci nel fegato, conseguenze marginali della funzionalità cerebrale con l'ippocampo maggiormente suscettibile agli insulti metabolici e vengono evidenziate le somiglianze nella risposta tra il tessuto adiposo e il cervello a sottolineare un possibile "crosstalk" tra i due compartimenti.

INTRODUZIONE

Negli ultimi 50 anni la popolazione ha cambiato drasticamente il proprio modo di vivere e le abitudini alimentari. Questi cambiamenti hanno portato ad un crescente aumento dell'incidenza di diabete e obesità (Ezquerro E. et al, 2008). Il tasso di obesità si è triplicato nei paesi in via di sviluppo, che hanno adottato una “western diet”, caratterizzata da un elevato consumo di cibi economici ad alta densità energetica, accoppiata ad un basso livello di attività fisica (Hassain P. et al, 2007). Numerosi studi epidemiologici hanno sottolineato una correlazione positiva tra la “western diet” e un'elevata incidenza di obesità, complicazioni cardiovascolari, cancro al colon, osteoporosi e malattie croniche dei reni (Heidemman C. et al, 2008). Oltre alla predisposizione genetica, all'inattività fisica e all'ambiente prenatale, le diete basate su alimenti ricchi di energia, grassi e/o zuccheri sono riconosciute come la principale causa dell'ambiente obesogenico nell'uomo (Nolan C.J. et al., 2011). Il consumo di grandi quantità di zucchero aggiunto, una fonte importante di calorie negli alimenti trasformati o preparati e nelle bevande caloriche (ad es. bibite analcoliche) è un fenomeno relativamente nuovo (Ludwig D.S., 2000). A metà del XIX secolo, questi dolcificanti divennero ampiamente disponibili e il loro consumo iniziò ad aumentare notevolmente (Tappy L. et al., 2010). Il fruttosio è usato commercialmente come sostituto dolcificante (sciroppo di mais ad alto contenuto di fruttosio) del glucosio o del saccarosio, nella preparazione di dolci e bevande gassate (Elliott SS. Et al., 2002). È stato recentemente confermato che il consumo di elevate quantità di carboidrati raffinati in cibi e bevande aumenta il rischio di dislipidemia (Welsh JA et al., 2010), obesità, resistenza all'insulina (Dekker MJ et al., 2010) e malattie cardiache

(Vasdev S. et al., 2004). Inoltre, è stato suggerito che il consumo cronico di una dieta occidentale, caratterizzata da cibi ricchi di zuccheri e grassi saturi, abbia un ruolo nello sviluppo del diabete di tipo 2 (T2DM) (Van Dam RM et al., 2002). Nell'ultimo decennio, i grassi e gli zuccheri della dieta sono stati identificati anche come fattori di rischio per il declino cognitivo e la neuro degenerazione, attraverso il metabolismo cerebrale alterato, l'infiammazione dei neuroni e la disfunzione neuronale (Luppino et al., 2010).

CAPITOLO 1: IL FEGATO

1.1 NAFLD

L'obesità è legata alla patogenesi della steatosi epatica non alcolica (NAFLD), dalla condizione apparentemente benigna della steatosi epatica alla steatoepatite non alcolica (NASH), che può portare a condizioni cliniche più gravi di cirrosi e cancro al fegato (epatocarcinoma). L'obesità è caratterizzata dall'espansione del tessuto adiposo. Un eccesso di molecole secrete (adipochine, citochine, acidi grassi liberi e altre porzioni lipidiche) dal tessuto adiposo può portare a uno stato metabolico alterato con infiammazione e resistenza all'insulina e contribuire alla progressione della NAFLD (Qureshi K et al., 2007). L'evidenza dell'insulino-resistenza del tessuto adiposo nei pazienti obesi con NAFLD suggerisce che l'espansione e / o la disfunzione del tessuto adiposo giochi un ruolo nello sviluppo e nella progressione della NAFLD (Gastaldelli A et al., 2009). Una stretta relazione tra l'espansione del tessuto adiposo bianco epididimale (eWAT) e lo sviluppo e la progressione della NAFLD nei topi altamente sensibili a una dieta ricca di grassi supporta questa teoria (Duval C et al., 2010). Per ottenere informazioni sulla patogenesi della NASH, sono stati sviluppati modelli di ipernutrizione legati all'obesità basati su una dieta occidentale ad alto contenuto di grassi saturi di origine animale e zuccheri aggiunti sotto forma di fruttosio e / o saccarosio, che imita il consumo di zucchero negli adulti (Welsh et al., 2010) e bambini (Reedy J et al., 2010). Il fruttosio, in presenza di una dieta ricca di grassi, può esacerbare il deposito di grasso, l'infiammazione, lo stress ossidativo e la fibrosi nel fegato ma forse non l'intolleranza sistemica al glucosio e l'insulino-resistenza (Charlton M et al., 2011). L'aumento dell'assunzione di fruttosio è stato

associato ad un aumento della fibrosi epatica nei pazienti con NAFLD (Abdelmalek MF et al., 2010). La presenza di fibrosi nel fegato è un importante predittore di esiti avversi a lungo termine, incluso il diabete e la progressione verso la cirrosi (Ekstedt M et al., 2006). Il modello di consumo di una dieta occidentale ad alto contenuto di grassi e zuccheri nei topi è stato originariamente sviluppato come modello di studio per la progressione della NAFLD (Kohli R et al., 2010) e sembra rispecchiare gli uomini obesi con NASH lieve, come recentemente riportato in un'analisi approfondita del fenotipo della fisiopatologia epatica (Machado MV et al., 2015). Tuttavia, potrebbe essere un buon modello per altre condizioni croniche associate all'obesità, come il diabete, le malattie cardiovascolari e il morbo di Alzheimer. Una maggiore comprensione dei fattori che portano alla disfunzione del tessuto epatico e adiposo nella NASH e in altre condizioni legate all'obesità rappresenta un'importante area di indagine, perché sono necessari nuovi bersagli terapeutici per il trattamento della NASH e di altre condizioni legate all'obesità. Data l'importanza del modello animale di obesità con consumo di una dieta occidentale ad alto contenuto di grassi e zuccheri, si sa poco sullo sviluppo della disfunzione metabolica in tale modello. In particolare, non è noto se i cambiamenti nel dispendio energetico, nell'attività o nell'assunzione di cibo siano alla base del fenotipo obeso. Inoltre, se il consumo di zucchero sottoforma di bevande esacerba lo sviluppo di intolleranza al glucosio, resistenza all'insulina e la disfunzione del tessuto adiposo nel modello animale è attualmente oggetto di studio (Yuwen L. et al., 2015)

1.2 Patogenesi della NAFLD

La NAFLD è una malattia complessa e i fattori che promuovono lo sviluppo della steatosi e quelli che innescano risposte infiammatorie epatiche e fibrogenesi possono entrare in gioco in parallelo o in maniera sequenziale con diverse gerarchie lungo l'intero spettro della malattia. Nel 1998, sono state fatte due ipotesi sull'origine di questa malattia (Buzzetti et al., 2016). Queste ipotesi consideravano la steatosi come un primo colpo per il fegato, che potrebbe in un secondo momento progredire in NASH / fibrosi. Questo concetto è cambiato dal momento che risulta essere troppo semplicistico poiché i fattori che influenzano lo sviluppo e la progressione della malattia sono molteplici. L'ipotesi attuale implica una miriade di fattori che agiscono in modo parallelo e sinergico negli individui con predisposizione genetica, il che spiegherebbe i diversi fenotipi osservati clinicamente. Sebbene la progressione dalla sola steatosi (chiamata anche NAFLD) alla NASH sia generalmente concepita come un processo sequenziale, la marcata eterogeneità che esiste in termini di risultati clinici di questi due sottogruppi ha portato al concetto che NAFLD e NASH possono corrispondere a due entità diverse. Quindi, la lesione agli epatociti che si verifica nella NASH, portando alla morte cellulare, infiammazione locale e fibrogenesi, si verificherebbe molto presto nella malattia innescata e sarebbe sostenuta da molti fattori diversi, come resistenza all'insulina, adipochine, fattori nutrizionali e microbiota intestinale, nonché fattori genetici ed epigenetici.

In alternativa, la lesione agli epatociti e morte cellulare non si verificherebbero nella NAFLD, forse a causa di una maggiore capacità delle cellule del fegato di affrontare il sovraccarico di acidi grassi (FA). In questo caso, l'analisi istologica

mostra una steatosi blanda a causa dell'assenza di lipotossicità (Buzzetti et al., 2016).

Pertanto, NAFLD e NASH possono anche essere viste come entità completamente separate. Sebbene plausibile, questa visione non è generalmente accettata perché la progressione dalla NAFLD alla NASH è stata documentata in una grande percentuale di pazienti (McPherson et al., 2015).

1.3 Meccanismo di sviluppo della NAFLD

Il fegato è un organo dinamico che svolge ruoli critici in molti processi fisiologici, compresa la regolazione sistemica del metabolismo del glucosio e dei lipidi. La disfunzione epatica del metabolismo lipidico è una causa della NAFLD, il disturbo epatico cronico più comune in tutto il mondo ed è strettamente associato alla resistenza all'insulina e al diabete di tipo 2 (Matthew et al., 2019). L'omeostasi lipidica epatica è strettamente regolata da un complesso sistema di vie di segnalazione/trascrizione gestite da ormoni, fattori di trascrizione e recettori nucleari con la segnalazione dell'insulina che gioca un ruolo fondamentale (Han et al, 2016). L'accumulo di trigliceridi (TG) è probabilmente il primo passo nella fisiopatologia della NAFLD e risulta da uno squilibrio tra la sintesi e l'utilizzo dei TG. Nei pazienti con obesità o diabete mellito di tipo 2, lo sviluppo di insulino-resistenza porta a una lipolisi non inibita nel tessuto adiposo, generando un flusso eccessivo di acidi grassi non esterificati (NEFA) nel fegato. I grassi introdotti con la dieta e la lipogenesi de novo (DNL), che è potenziata nella NAFLD (Lambert et al., 2014), sono le altre due fonti che contribuiscono all'accumulo di grasso epatico. La sintesi epatica di FA è un processo catalizzato principalmente da due enzimi, acetil-CoA carbossilasi (ACC) e acido grasso sintasi (FAS), e controllato a livello trascrizionale tramite l'attivazione della proteina 1c legante gli elementi regolatori degli steroli (SREBP-1c) mediante l'insulina e tramite l'attivazione della proteina legante gli elementi che rispondono ai carboidrati (ChREBP) dal glucosio. A sua volta, l'attività di entrambi i fattori di trascrizione è controllata da LXR (ChaJ et al., 2008). LXR regola entrambi gli elementi di risposta e induce direttamente la ACC e la FAS (Mitro et al, 2007). La DNL è marcatamente aumentata nella NAFLD principalmente a causa della coesistente iperinsulinemia

e dell'eccessiva assunzione di zuccheri semplici, come il fruttosio, che attivano rispettivamente SREBP-1c e ChREBP (Softic et al., 2016). E' interessante notare che nei pazienti con NAFLD, la DNL non è soppressa a digiuno, sottolineando il ruolo importante per questa via nella steatosi epatica. Sono stati effettuati studi per comprendere l'origine dei TG epatici nella NAFLD utilizzando isotopi stabili marcati, che hanno indicato che gli FA sierici (derivati dalla lipolisi nel tessuto adiposo) possono rappresentare fino al 60% dei TG epatici nei pazienti con NAFLD, mentre il contributo della DNL è stato dimostrato essere fino a tre volte superiore nei pazienti con NAFLD rispetto ai controlli, ed è stato stimato del 25% nei pazienti con NAFLD, mentre il contributo dietetico è di circa il 15% (Donnelly et al., 2005). Anche un utilizzo alterato dei TG correlato a ossidazione epatica alterata dei FA o alterata sintesi e/o secrezione di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) può contribuire all'accumulo di TG. L'ossidazione epatica dei FA si verifica nei mitocondri, nei perossisomi o nei microsomi, portando a una produzione di energia ad alto rendimento. Durante il digiuno, la principale fonte di energia è la β -ossidazione degli acidi grassi, dove gli acidi grassi liberi entrano nel ciclo citrico dopo essere stati scomposti in acetil-CoA. Per essere utilizzati per la β -ossidazione, gli acidi grassi a catena lunga (LCFA) devono essere trasportati ai mitocondri mediante la conversione da parte dell'acil-CoA-sintetasi ad acil-CoA nel citosol. Gli LCFA vengono trasportati nella membrana mitocondriale esterna dalla carnitina palmitoil transferasi 1 (CPT1). La CPT1 è inibita dal malonil-CoA (un intermedio chiave nella DNL) e dall'insulina (McGarry et al., 1997) e attivata dal recettore per i proliferatori perossisomiali alpha (PPAR α) (Rogue et al., 2011). Il ruolo della beta ossidazione mitocondriale nella NAFLD non è chiaro, perché sono stati

pubblicati studi che mostrano tassi sia ridotti che aumentati di ossidazione dei FA nella NAFLD, con alcuni studi che dimostrano una compromissione con la progressione alla NASH (Kawano et al., 2013). Per quanto riguarda l'esportazione delle VLDL, è stato dimostrato che il tasso di secrezione dei TG come delle VLDL nella NAFLD è aumentato, sebbene ciò non possa compensare l'aumento del tasso di sintesi dei TG. L'apporto calorico della dieta e di nutrienti specifici è fondamentale per lo sviluppo della steatosi epatica. Tra i fattori dietetici, il fruttosio è di fondamentale importanza poiché è sia un substrato che un potente induttore della DNL epatica attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione chiave come SREBP-1c e ChREBP. Da notare che gli epatociti sono esposti a concentrazioni più elevate di fruttosio rispetto alle cellule di altri tessuti poiché, dopo l'assorbimento, il fruttosio viene consegnato direttamente al fegato attraverso la vena porta (Softic et al., 2016).

La segnalazione dell'insulina gioca un ruolo centrale nella steatosi epatica. Obesità e alterazione della segnalazione dell'insulina negli adipociti portano ad una mancata soppressione della lipolisi, stress degli adipociti, reclutamento e infiltrazione da parte dei macrofagi nel tessuto adiposo, con un conseguente rilascio di adipocitochine proinfiammatorie, principalmente fattore di necrosi tumorale alfa ($TNF\alpha$), interleuchina 6 (IL-6), proteina chemiotattica monocitica 1 (MCP-1), resistina e inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI-1). Queste adipocitochine contribuiscono all'interruzione della segnalazione dell'insulina da parte del fattore nucleare $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e delle vie della chinasi c-Jun (JNK) (Sabio et al., 2008) che creano un circolo vizioso nel tessuto adiposo promuovendo l'insulino-resistenza in altri tessuti insulino-sensibili. In alternativa, adipochine protettive (quelle che riducono la resistenza all'insulina) come l'adiponectina

risultano ridotte nei pazienti con NAFLD e la somministrazione di adiponectina ricombinante ha mostrato un miglioramento della sensibilità all'insulina e della steatosi nei modelli murini di NAFLD, probabilmente attraverso le vie della protein chinasi attivata da AMP (AMPK) e PPAR α (Yamauchi et al., 2003).

Pertanto, lo sviluppo della resistenza all'insulina periferica e dell'iperinsulinemia contribuisce all'aumento dell'afflusso di FA al fegato. Nel fegato, l'attivazione della via di segnalazione dell'insulina aumenta la DNL senza sopprimere la gluconeogenesi. Inoltre, i diacilgliceridi contribuiscono ad aumentare la IR epatica aumentando la traslocazione dell'isoforma ϵ della protein chinasi C (PKC), che può inibire il dominio intracellulare del recettore dell'insulina, fornendo più meccanismi all'accumulo di TG nel fegato. Il contenuto di diacilgliceridi e PKC ϵ sono stati associati alla IR epatica in uno studio su pazienti obesi (Kumashiro et al., 2011).

CAPITOLO 2: IL TESSUTO ADIPOSO

2.1 Obesità e tessuto adiposo

L'obesità ha ormai raggiunto proporzioni epidemiche, con oltre il 60% della popolazione statunitense classificata come sovrappeso o obesa (definita da un indice di massa corporea ≥ 25 o 30 kg / m^2 , rispettivamente) (Flegal et al., 2012). Parallelamente all'epidemia di obesità è aumentata anche l'incidenza T2DM, che è quindi considerato una delle principali comorbilità associate all'obesità (Abdullah et al., 2010). Recenti prove epidemiologiche hanno dimostrato che l'85% degli adulti diabetici di tipo 2 sono anche obesi (CDC, 2004), ed è stato previsto che oltre 300 milioni di persone in tutto il mondo avranno il T2DM come conseguenza dell'obesità entro il 2025 (NCD-RisC, 2016). Sebbene molte ricerche recenti abbiano mirato a delineare le cause precise del T2DM associato all'obesità, si ritiene che il meccanismo principale sia la resistenza all'insulina che deriva dal tessuto adiposo bianco, dal fegato e/o dal muscolo scheletrico, accompagnata da una ridotta secrezione di insulina da parte delle cellule β del pancreas (DeFronzo et al., 2009). Inoltre, sia l'obesità che il T2DM aumentano il rischio di malattie cardiovascolari, aumentando la morbilità e la mortalità di più di 2 volte (Kondapally Seshasai et al, 2011). La distribuzione del tessuto adiposo è di grande importanza per quanto riguarda queste comorbilità. La resistenza all'insulina si verifica spesso quando il grasso si accumula nei depositi intra-addominali ed è associata a una costellazione di fattori di rischio per malattie cardiovascolari, in quella che è nota come sindrome metabolica (Lee et al., 2008). La semplice valutazione del peso corporeo, della circonferenza della vita o del calcolo dell'indice di massa corporea non mostra un'immagine chiara della

composizione corporea né della distribuzione del grasso corporeo. Un quadro chiaro della distribuzione del grasso corporeo nei soggetti obesi è fondamentale per determinare quanto siano o saranno suscettibili allo sviluppo di diabete e/o malattie cardiovascolari.

Il tessuto adiposo può essere classificato in base alla morfologia in tre sottogruppi bianco, marrone o beige. Inoltre, il tessuto adiposo bianco (WAT) può essere ampiamente classificato in base alla posizione, in gran parte definito come sottocutaneo (situato sotto la pelle) e viscerale/omentale (intra-addominale, adiacente agli organi interni). Il tessuto adiposo è composto da molti tipi di cellule differenti, che coordinatamente secernono numerose citochine, chemochine e ormoni. Circa un terzo delle cellule all'interno del tessuto adiposo sono adipociti, mentre il resto è rappresentato da fibroblasti, cellule endoteliali, macrofagi, cellule stromali, cellule immunitarie e pre-adipociti. Nella maggior parte degli individui magri e sani, il WAT è confinato a depositi definiti. Ma in alcune condizioni come l'obesità e la lipodistrofia, la massa WAT può aumentare ectopicamente in aree che possono influenzare la suscettibilità alle comorbidità come il diabete e l'aterosclerosi. Tali aree WAT ectopiche sono per lo più localizzate all'interno della cavità viscerale e includono WAT intraepatico, epicardico (epiWAT, tra il cuore e il pericardio), perivascolare (PVAT, vasi sanguigni maggiori circostanti), WAT mesenterico (MWAT, contiguo agli organi digerenti nel viscerale), WAT omentale (OWAT, che si estende sull'intestino, fegato e stomaco) e WAT retroperitoneale (RWAT, che circonda i reni). Gli ultimi tre depositi (MWAT, OWAT e RWAT) vengono classificati insieme come “grasso viscerale” (Chusyd et al., 2016). Oltre ai depositi di WAT, il tessuto adiposo bruno (BAT) rappresenta un tipo distinto di tessuto adiposo caratterizzato dalla sua morfologia e funzione,

con mitocondri concentrati che gli conferiscono un caratteristico aspetto bruno. Il grasso beige rappresenta una terza nuova classificazione del tessuto adiposo, in cui gli adipociti bruni compaiono all'interno dei classici depositi di WAT (Chait et al., 2020).

2.2 Tessuto adiposo bianco: accumulo di energia e secrezione di ormoni e adipochine

Il tessuto adiposo è un organo essenziale per la regolazione dell'omeostasi dell'energia. Principalmente incaricato di immagazzinare l'energia in eccesso sottoforma di trigliceridi, gli adipociti subiscono iperplasia aumentando in numero e ipertrofia aumentando le dimensioni, consentendo dunque al tessuto adiposo di espandersi in presenza di eccesso di nutrienti. Secondo le necessità, cioè durante il digiuno e l'esercizio fisico, i trigliceridi immagazzinati nel tessuto adiposo vengono mobilitati per fornire acidi grassi che saranno ossidati per ottenere energia da parte del resto del corpo.

Originariamente il tessuto adiposo era classificato come un semplice organo di accumulo dell'energia in eccesso, ma il tessuto adiposo è oggi noto per funzionare come un importante sistema endocrino; secerne adipochine, fattori di crescita, citochine e chemochine (Ahima et al., 2008). Il pattern di secrezione delle adipochine sembra variare in base al deposito di tessuto adiposo e dipende dallo stato energetico del deposito adiposo, che porta a effetti paracrini/autocrini variabili da parte delle adipochine all'interno dei depositi. Le adipochine sono importanti mediatori di vari processi metabolici come l'ossidazione degli acidi grassi, la lipogenesi de novo, la gluconeogenesi, l'assorbimento del glucosio, la segnalazione dell'insulina e il dispendio energetico nei tessuti metabolicamente attivi come il fegato, il muscolo scheletrico e il cervello (Ahima et al., 2008).

L'espansione del tessuto adiposo nell'obesità è accompagnata da cambiamenti infiammatori all'interno del tessuto adiposo, che contribuiscono a infiammazione sistemica cronica di basso grado, caratterizzata da livelli leggermente elevati di

citochine circolanti, chemochine, ed elementi della fase acuta. L'espansione di depositi del tessuto adiposo durante l'aumento di peso è accompagnata da un'infiltrazione di nuove cellule infiammatorie. Tali cellule possono rappresentare il ~5-10% delle cellule totali nel tessuto adiposo di soggetti magri, mentre i macrofagi negli obesi possono rappresentare fino al 60% di tutte le cellule presenti nel tessuto adiposo (Weisberg et al., 2003). L'accumulo di macrofagi si verifica in misura maggiore nei depositi adiposi viscerali rispetto a quelli sottocutanei sia nei roditori che nell' uomo (Murano et al. 2008).

2.3 Pathways molecolari che collegano l'infiammazione riscontrata nell'obesità e l'insulino-resistenza

L'insulina è un ormone anabolico secreto dalle cellule beta, che gioca un ruolo cruciale non solo nel metabolismo dei carboidrati ma anche nella regolazione anabolica delle proteine e dei lipidi, nella crescita cellulare e proliferazione (Fu et al., 2013). Concentrazioni elevate di glucosio nel sangue stimolano la sintesi e il rilascio dell'insulina; i suoi effetti sul metabolismo derivano dal suo legame al recettore della membrana cellulare, che viene attivato dall'autofosforilazione di residui di tirosina. Il recettore dell'insulina attivato fosforila e recluta proteine intracellulari, note anche come substrati del recettore dell'insulina (IRS). A valle delle proteine IRS, le vie di segnalazione della proteina chinasi C, stimolano l'assorbimento del glucosio, la sintesi del glicogeno e l'inibizione epatica della gluconeogenesi. La segnalazione dell'insulina esercita anche un'azione mitogenica, mediata dalla via delle MAP chinasi (MAPK) (Ramalingam et al., 2013). L'associazione dell'obesità con il T2DM è stata a lungo riconosciuta e il motivo principale è la capacità dell'obesità di promuovere l'insulino-resistenza, il principale aspetto fisiopatologico del T2D (Kahn et al., 2000). L'IR è una complicanza metabolica in cui i tre principali tessuti sensibili all'insulina (muscolo scheletrico, fegato e tessuto adiposo) diventano meno reattivi all'azione dell'insulina. L'IR è caratterizzata dal fallimento nell'assorbimento del glucosio, nella sintesi del glicogeno e, in misura minore, dell'ossidazione del glucosio (Ormazabal et al., 2018). In questo scenario, le cellule beta compensano l'IR aumentando la secrezione dell'insulina e il ripristino della concentrazione di

glucosio nel sangue all'interno dell'intervallo normale. Un ulteriore calo della sensibilità all'insulina rende le cellule beta inefficienti e questo si traduce in iperglicemia persistente e T2DM (Shulman, 2000).

Sono stati effettuati numerosi studi per identificare i fattori responsabili della IR indotta dall'obesità. Una delle teorie più accreditate considerano l'infiammazione sistemica cronica indotta dall'obesità come meccanismo preponderante (Luft et al., 2013). Questa teoria è fortemente supportata da molti risultati e prove cliniche; ad esempio, markers infiammatori come TNF- α e IL-6 sono elevati nei soggetti obesi e resistenti all'insulina (Uemura et al., 2017). La prima prova di un'associazione tra IR e infiammazione è stata ipotizzata quando, a seguito della somministrazione di agenti antinfiammatori, si è verificato un miglioramento dell'omeostasi del glucosio osservato in pazienti con T2DM (Hundal et al., 2002). Ulteriori studi verso la metà degli anni '90 hanno dimostrato che il WAT di roditori e umani obesi mostra cambiamenti nei livelli delle molecole proinfiammatorie (ad esempio, TNF- α) (Uysal et al., 1998). Tali mediatori infiammatori modulano l'IR direttamente tramite la segnalazione dell'insulina o indirettamente stimolando le vie infiammatorie (Tilg et al., 2008). Altri studi hanno dimostrato che l'ipossia, che si verifica nel tessuto durante l'obesità, è direttamente responsabile dell'induzione dell'IR in entrambi i modelli umani e murini (Regazzetti et al., 2009;). Studi su animali e sull'uomo hanno identificato il WAT come il sito principale in cui l'infiammazione cronica correlata all'obesità inizia e viene esacerbata (Weisberg et al., 2003). Il rimodellamento del tessuto adiposo durante l'obesità fornisce una grande quantità di segnali intrinseci ed estrinseci in grado di innescare una risposta infiammatoria (Reilly et al., 2017). Questi segnali convergono sull'attivazione delle vie di segnalazione JNK e NF-

kB (Lee et al., 2014). L'attivazione di queste vie di segnalazione aumenta la produzione di citochine proinfiammatorie, molecole di adesione endoteliale e mediatori chemiotattici che promuovono l'infiltrazione dei monociti nel tessuto adiposo e la loro conversione in macrofagi (Shoelson et al., 2006). I macrofagi infiltranti producono e secernono molti mediatori infiammatori che promuovono lo stato proinfiammatorio locale e sistemico e compromettono la segnalazione dell'insulina (Haase et al., 2014).

L'obesità è anche associata all'attivazione della via infiammatoria NF-kB, che culmina nell'aumentata espressione di diversi geni bersaglio di NF-kB per esempio, IL-6, TNF- α , interferone-gamma (IFN γ) e interleuchina -1b (IL-1b), che esacerbano ulteriormente la progressione dell'IR (Panahi et al., 2018).

2.4 Crosstalk tra tessuto adiposo e sistema nervoso centrale (SNS)

In risposta agli stati nutrizionali il tessuto adiposo svolge un ruolo endocrino sintetizzando e secernendo composti bioattivi chiamati adipochine. La secrezione di adipochine è essenziale per l'omeostasi energetica e metabolica (Choe et al., 2016). Adipsina e leptina sono le prime ad essere state identificate (Cook et al., 1997). Da allora, molte adipochine, come adiponectina, resistina e TNF- α , sono state ampiamente studiate nel metabolismo e nella sindrome metabolica (Rosen, et al., 2014). L'asse tessuto adiposo-cervello è stato stabilito per la prima volta con la scoperta della leptina come ormone endocrino mirato all'ipotalamo per regolare l'equilibrio energetico, la sazietà, il metabolismo e il peso corporeo (Flier et al., 2010). Successivamente è stato dimostrato che la segnalazione della leptina è coinvolta anche nella neuroplasticità ippocampale (Harvey et al., 2006). E' stato anche suggerito che il metabolismo energetico, l'utilizzo del glucosio e la sensibilizzazione all'insulina sono compromessi nei pazienti con malattia di Alzheimer (AD), mentre questi sintomi patologici possono contribuire alla neuropatologia dell'AD (Schioth et al., 2012). Poiché la neuropatologia dell'AD assomiglia molto alla patologia del diabete mellito, l'AD è ora riconosciuta come il "diabete di tipo 3". L'adiponectina promuove la sensibilità all'insulina (Ye, et al., 2013), mentre la carenza di adiponectina esacerba la resistenza all'insulina (Maeda et al., 2002) e la neuropatologia dell'AD (Ng et al., 2016). Vengono sollevate preoccupazioni riguardo a come la sindrome metabolica possa essere collegata a malattie neurodegenerative e disturbi dell'umore (Biessels et al., 2018), e per tale ragione, comprendere la funzione centrale delle adipochine nel cervello può illustrare come funziona il crosstalk cervello-tessuto adiposo per prevenire le malattie metaboliche e promuovere la salute del cervello.

La disfunzione metabolica potrebbe condividere meccanismi molecolari comuni con le malattie neurodegenerative (Stoeckel et al., 2016). Pertanto, gli studi emergenti mirano a indagare come il tessuto adiposo eserciti effetti neuroprotettivi e influenzi la neuroplasticità attraverso la secrezione di adipochine. In particolare, diverse adipochine possono attraversare la barriera emato-encefalica e agire direttamente sul cervello, mentre una barriera danneggiata impedirà ai composti rilasciati dal tessuto adiposo di entrare nel cervello (Gustafson et al., 2006). Allo stato attuale, è evidente che le adipochine possono modellare la neuro-plasticità. Studi hanno dimostrato che le vie dell'adiponectina possono regolare la proliferazione cellulare (Yau et al., 2015), la sopravvivenza (Song et al., 2015) e la plasticità sinaptica (Formolo et al., 2018) modulando il metabolismo cellulare (Wang et al., 2018) e sopprimendo la risposta infiammatoria (Nicolas et al., 2017) nel cervello. Inoltre, studi sul modello animale hanno dimostrato un possibile legame tra disordini metabolici con livelli di adipochine circolanti aberranti e deficit cognitivi comportamentali (Wang et al., 2019) e neuropatologie (Hayashi-Park et al., 2017).

CAPITOLO 3: IL CERVELLO

3.1 Western diet e aging

La ricerca gerontologica, negli ultimi anni, ha prodotto progressi impressionanti nella comprensione del controllo genetico dell'invecchiamento. Questo progresso e i cambiamenti demografici nei paesi industrializzati hanno stimolato l'interesse nello studio dell'invecchiamento e delle possibilità che i sintomi e le conseguenze funzionali dell'invecchiamento umano possano essere ritardati, ridotti o forse eliminati (Piper M.D.W et al., 2008). L'invecchiamento è un importante fattore di rischio per i disturbi cognitivi indotti dall'infiammazione, come dimostrato sia nella letteratura clinica che in quella preclinica (Murray C. et al, 2010). Poiché si prevede che la popolazione americana di età superiore ai 65 anni raggiungerà il 25% entro il 2030 (Alzheimer's Association, 2016), è probabile che qualsiasi rischio per la salute associato all'invecchiamento e alle diete malsane diventerà ancora maggiore in futuro.

La diversa suscettibilità all'ambiente nelle varie fasi della vita è un'area di crescente preoccupazione nella valutazione del rischio per la salute umana. I modelli animali hanno dimostrato risposte specifiche per età all'ambiente stressante (Mcphail RC et al, 2012), suggerendo così che l'ambiente può influenzare gli anziani in modo diverso dai giovani adulti (Royland JE et al., 2012). Un comune fattore dello stile di vita, che può interagire con l'invecchiamento e compromettere la funzione cerebrale, è il consumo di diete ad elevato contenuto di grassi e zuccheri.

3.2 Western diet e funzionalità cognitiva

C'è stato un rapido cambiamento globale nella composizione della dieta, da diete ricche di carboidrati complessi e fibre, a quella che è stata definita la dieta occidentale (western diet), con un'alta percentuale di grassi e zuccheri raffinati, ridotto apporto di carboidrati complessi e fibre e ridotto consumo di frutta e verdura (Nielsen et al., 2002). Mentre l'assunzione di grassi e zuccheri era precedentemente limitata a causa della scarsa disponibilità, la rivoluzione agricola e la rivoluzione industriale hanno introdotto profondi cambiamenti nella disponibilità di grassi e zuccheri. Le modifiche alla composizione alimentare di grassi e zuccheri sono state accompagnate da considerevoli conseguenze negative per la salute. La ricerca ha correlato costantemente l'aumento dell'incidenza dell'obesità all'aumento sia del consumo dei grassi (Bray et al., 1998) sia dell'assunzione di zucchero (Malik et al., 2012). Inoltre, l'alto contenuto di grassi saturi e zuccheri raffinati (HFS) è stato implicato in una serie di malattie croniche, in particolare T2DM e malattie cardiovascolari (Brunner et al., 2008). Tuttavia, di altrettanta grande preoccupazione, è l'evidenza emergente che le diete HFS hanno a lungo termine impatti negativi sulle funzioni cerebrali e sul comportamento.

Un'elevata assunzione di grassi saturi (SF) è stata implicata nella compromissione di varie funzioni cognitive, inclusa la memoria, l'attenzione e il controllo inibitorio. Uno studio trasversale di una popolazione di mezza età ha dimostrato che l'assunzione di una dieta SF era associata ad un aumento del rischio di avere funzioni cognitive compromesse, tra cui memoria, velocità e flessibilità (Kalmijn et al., 2004). Nelle donne con T2DM, una maggiore assunzione di SF era associata

ad un maggiore deterioramento cognitivo su un punteggio globale, sulla valutazione immediata e memoria ritardata, memoria di lavoro e fluidità verbale (Devore et al., 2009).

L'assunzione di grassi saturi è stata anche associata a un maggiore declino delle funzioni cognitive associate con il normale invecchiamento (Okereke et al., 2012), anche se uno studio su donne di età superiore ai 60 anni non ha trovato alcuna associazione tra assunzione di grassi saturi e declino cognitivo (Naqvi et al., 2011).

Un recente studio ha valutato la funzione cognitiva prima e dopo il consumo di una dieta ricca di grassi (HF). Venti uomini di età compresa tra i 25 e i 45 anni sono stati alimentati con una dieta standardizzata (17% di grassi) per 3 giorni seguiti da una dieta HF (74%) per 7 giorni. È stata eseguita la valutazione cognitiva pre e post consumo della dieta HF mostrando un'attenzione significativamente ridotta dopo l'intervento dietetico (Edwards et al., 2011). Uno studio controllato randomizzato, in cui due gruppi di uomini sani di età compresa tra i 19 e i 28 anni sono stati sottoposti a una dieta HF (70% di grasso) o una dieta standard (24% di grassi), ha mostrato un'attenzione e una velocità di processo significativamente inferiore dopo il consumo per cinque giorni della dieta HF rispetto alla dieta standard (Holloway et al., 2011). Anche l'assunzione di zucchero raffinato è stata associata a una riduzione della funzione cognitiva. Nel breve tempo, l'ingestione di pasti ad alto indice glicemico contenenti carboidrati semplici può provocare una compromissione della memoria postprandiale negli adulti sani (Nabb S. et al., 2006) e in soggetti con T2DM (Chui M.H. et al., 2008). Manca uno studio sull'uomo che valuti l'effetto a lungo termine dell'assunzione di zucchero sulle funzioni cognitive, ma è noto tuttavia che il consumo di

zucchero porta a una ridotta tolleranza al glucosio e alla resistenza all'insulina, fattori che sono stati associati a compromissione cognitiva in diversi studi trasversali (Elias M.F., et al., 2005).

Non solo le diete SF o in zuccheri raffinati sono associate a prestazioni di memoria inferiori, ma anche la combinazione dei due sembra esercitare effetti simili. Akbaraly TN, et al. (2009) hanno scoperto che, in una popolazione di pazienti adulti di età compresa tra 35 e 55 anni, il consumo di alimenti trasformati (ad es. cioccolatini, dolci, carni lavorate, cereali raffinati e prodotti lattiero-caseari ricchi di grassi) era associato a prestazioni inferiori nei test cognitivi, di vocabolario e fluidità verbale (funzioni esecutive) rispetto agli individui con una dieta a base di un'ampia varietà di cibi. È importante sottolineare che questa associazione è stata osservata dopo aver controllato sesso, età, assunzione di energia e istruzione. Francis e Stevenson (2011) hanno trovato un'associazione tra una maggiore assunzione di grassi saturi e zucchero e prestazioni inferiori in un compito di memoria neuropsicologica rispetto a quelli che consumano un minore apporto di grassi e zuccheri. È importante sottolineare che le persone in questo studio erano di peso normale (indice di massa corporea tra 18 e 25) e non avevano anamnesi di diabete o malattie cardiovascolari, suggerendo che gli effetti cognitivi erano probabilmente dovuti alla dieta piuttosto che aumento di peso o condizioni associate.

Alcuni studi hanno riportato un miglioramento della funzione cognitiva in seguito al consumo di grassi o zuccheri (Kaplan R.J. et al., 2001). Tuttavia, questi studi sono tipicamente a breve termine, con effetti sulla cognizione esaminati fino a 105 minuti dopo l'ingestione, mentre gli studi discussi sopra sono generalmente su periodi più lunghi che vanno da settimane ad anni. Pertanto, sembra che gli

effetti dannosi del consumo di una dieta HFS sulla cognizione possano essere il risultato di cambiamenti a lungo termine della funzione neuronale. Gli studi sull'uomo, esaminati sopra, sono ben supportati dal modello animale in particolare da roditori, che consentono di stabilire la relazione causale attraverso la manipolazione diretta della dieta.

3.3 Basi neuronali dei deficit cognitivi causati da una western diet

Le funzioni cognitive influenzate dalle diete HFS - memoria, attenzione, memoria di lavoro e controllo inibitorio - sembrano essere controllate prevalentemente da due regioni del cervello; l'ippocampo e la corteccia prefrontale (PFC). L'ippocampo ha un ruolo ben consolidato nel supportare la funzione della memoria, con danni a questa struttura negli esseri umani associata a gravi menomazioni della memoria degli episodi (Duyckaerts C. et al., 1985;). I dati sugli animali suggeriscono che le lesioni dell'ippocampo compromettono le prestazioni della memoria.

La PFC è nota per essere coinvolta in molte delle funzioni cognitive descritte sopra, inclusa attenzione, fluidità verbale, memoria di lavoro e inibizione (Arnsten et al., 2005). È importante notare che è difficile separare la funzione della memoria dipendente dall'ippocampo dalle funzioni cognitive supportate dalla corteccia prefrontale, come l'attenzione, la memoria del controllo inibitorio, dal momento che c'è una forte relazione tra queste funzioni (Persad et al., 2002). Tuttavia, queste regioni del cervello sono state al centro di gran parte della letteratura sul modello animale riguardante gli effetti delle diete HFS sulla funzione cognitiva. Pertanto, vi sono diverse teorie su come le diete HFS arrivino a influenzare queste particolari regioni del cervello. Queste includono riduzioni indotte dalla dieta del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), stress ossidativo, neuro infiammazione e alterazione dell'integrità della barriera emato-encefalica.

L'energia per la produzione di adenosina trifosfato (ATP) per fosforilazione ossidativa viene generata attraverso la catena di trasporto mitocondriale (ETC),

che comprende una serie di enzimi denominati complessi I – IV. La fosforilazione ossidativa è essenziale per il metabolismo energetico, tuttavia produce specie reattive dell'ossigeno (ROS), che possono interagire e causare danni a molti componenti cellulari tra cui DNA, proteine e lipidi (Bayir, 2005). Lo stress ossidativo (OS) è il risultato di uno squilibrio tra ROS e la velocità con cui il danno causato dai ROS può essere rimosso o riparato. Diversi studi sugli animali hanno rivelato che le diete HFS aumentano i livelli di glucosio nel sangue (McNeilly et al., 2011). L'aumento cronico dei livelli di glucosio causa una disfunzione dell'ETC mitocondriale generando livelli più elevati di ROS (Nishikawa et al., 2000). Inoltre, i lipidi producono radicali liberi attraverso la via della perossidazione lipidica e diete ricche in lipidi possono aumentare i livelli di stress ossidativo (Ames, 1983). Dunque, lo stress ossidativo potrebbe essere un meccanismo alla base degli effetti delle diete HFS sulla cognizione. Parecchi studi sugli animali supportano questa ipotesi, trovando un aumento dello stress ossidativo dopo il consumo di diete HFS (Souza et al., 2007) e alcuni studi in aggiunta hanno sottolineato un'associazione tra stress ossidativo indotto da diete HFS e deterioramento cognitivo (White et al., 2009). Ci sono anche prove evidenti che lo stress ossidativo giochi un ruolo nella patogenesi di molte malattie neurodegenerative. Ad esempio, il danno ossidativo si verifica all'inizio della malattia di Alzheimer e precede la deposizione e formazione delle placche (Nunomura et al., 2001). Pertanto, lo stress ossidativo può essere un meccanismo alla base della relazione tra malattie neurodegenerative e diete HFS.

Studi sul modello animale hanno dimostrato che le diete HFS possono generare una risposta infiammatoria sistemica e nel cervello (Pistell et al., 2010). È interessante notare che questo ultimo studio citato ha anche osservato che la

risposta infiammatoria indotta dalla dieta è stata associata a una riduzione dei livelli di BDNF corticali, suggerendo un percorso attraverso il quale la dieta può influenzare questa neurotrofina. Gli effetti di una lieve risposta infiammatoria possono essere osservati anche nel cervello di soggetti umani obesi. Cazes et al. (2011) hanno scoperto che i livelli più elevati di un marker infiammatorio erano associati a un volume corticale orbito-frontale ridotto, una regione del cervello che contribuisce all'elaborazione correlata alla ricompensa alimentare e al controllo inibitorio.

SCOPO DELLA TESI

È stato stimato che la popolazione mondiale di età superiore ai 65 anni aumenterà di oltre tre volte entro il 2050 (World Health Organization, 2011). Pertanto, la diversa suscettibilità agli stimoli ambientali nelle varie fasi della vita è un'area di crescente preoccupazione nella valutazione del rischio per la salute umana. I modelli animali hanno dimostrato risposte specifiche per età ai fattori di stress ambientali (MacPhail et al., 2012), suggerendo così che l'ambiente può influenzare gli anziani in modo diverso dai giovani adulti (Royland et al., 2012). È stato dimostrato che il consumo di una dieta ricca di grassi e zuccheri, uno stile di vita comune soprattutto nei paesi occidentali, può contribuire all'invecchiamento e alterare la funzione cellulare (López-Otín et al., 2016). La mezza età (cioè il periodo intorno alla metà della vita, che corrisponde a circa 40 anni negli esseri umani) è uno stadio iniziale del processo di invecchiamento, durante il quale possono verificarsi cambiamenti fisici gradualmente e alcune malattie croniche possono insorgere. Sebbene molti studi abbiano enfatizzato l'impatto di diete ricche di grassi saturi o di zuccheri semplici sull'invecchiamento, sono disponibili solo pochi dati sulle risposte fisiologiche nella mezza età (Granhölm et al., 2008). Inoltre, la mezza età è una fase della vita in cui gli organismi sono maggiormente esposti a sviluppare insulino-resistenza indotta dalla dieta e disfunzione epatica (Lohr et al., 2016). Tuttavia, sono disponibili pochi dati sull'impatto delle diete occidentali sulle risposte fisiologiche nella mezza età (Li et al., 2017), nonostante il fatto che l'obesità sia maggiormente frequente nella popolazione di mezza età (40,2%) rispetto agli adulti più giovani o più anziani (32,3% e 37,0%, rispettivamente) (Ogden et al., 2015). Un segno distintivo critico è la condizione di stress ossidativo associata ad invecchiamento e / o sovrappeso

e obesità (Bonomini et al.,2015). Tra gli organi più inclini al danno ossidativo, il fegato è profondamente coinvolto nell'insorgenza di disordini metabolici, inclusa la resistenza all'insulina (den Boer et al.,2004), a causa del suo ruolo principale nella regolazione dell'omeostasi sistemica dei lipidi e del glucosio. Risultati precedenti hanno dimostrato che la durata del trattamento dietetico ha un impatto profondo sulla compromissione del metabolismo epatico, che si manifesta a 4 settimane, raggiungendo un plateau a 8-12 settimane, mostrando poi un leggero miglioramento (Fouret et al., 2018). Inoltre, è stato precedentemente dimostrato che sia la steatosi epatica che le alterazioni mitocondriali si verificano già dopo 4 settimane di dieta (Fouret et al., 2018), suggerendo così che gli studi volti a rivelare l'interconnessione tra le alterazioni metaboliche e l'assunzione di diete obesogene dovrebbero essere focalizzati su questo periodo di trattamento dietetico.

Il consumo di grassi e / o zuccheri è un comune fattore dello stile di vita, che può interagire con l'invecchiamento e compromettere anche la funzione cerebrale (Cigliano et al., 2018). In particolare, ratti mantenuti con una dieta ad alto contenuto di grassi/fruttosio hanno mostrato una scarsa capacità di apprendimento spaziale, ridotta densità dendritica dell'ippocampo e livelli ippocampali ridotti di una neurotrofina cerebrale altamente espressa, il BDNF (Stranahan et al., 2008). Inoltre, nell'ippocampo di ratti di mezza età alimentati con una dieta ricca di di grassi saturi e colesterolo è stato osservato un aumento degli errori di memoria e un'attivazione microgliale, indice di infiammazione (Granholtm et al., 2008). Uno dei possibili meccanismi che contribuiscono al deterioramento cerebrale associato alla dieta e / o al consumo di cibo è il danneggiamento dell'attività mitocondriale ed il conseguente stress ossidativo (Papa et al., 2008), poiché questi organelli sono

responsabili della produzione di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa e fungono da generatori di ROS. Quando i sistemi antiossidanti enzimatici e non enzimatici sono sopraffatti da livelli elevati di ROS, può verificarsi un danno ossidativo al DNA, ai lipidi (membrane cellulari e organelli) e alle proteine (recettori, fattori di trascrizione ed enzimi). Sebbene questo problema sia centrale per evidenziare gli eventi molecolari che portano a disfunzioni cerebrali indotte dalla dieta, la conoscenza sugli effetti di una dieta ad alto contenuto di grassi/fruttosio sulle attività respiratorie del cervello, l'equilibrio ossidativo e l'espressione di proteine strettamente legate ai mitocondri nella mezza età è ancora scarsa.

Nell'ultimo decennio, anche i grassi e gli zuccheri della dieta sono stati identificati come fattori di rischio per il declino cognitivo e la neurodegenerazione, attraverso il metabolismo cerebrale alterato, la neuroinfiammazione e la disfunzione neuronale (Cigliano et al.,2018). L'aumento del rischio per gli individui obesi di sviluppare malattie cerebrali potrebbe essere dovuto alla capacità del tessuto adiposo di comunicare con il cervello e influire sulla sua funzionalità. Pertanto, l'analisi di marcatori specifici, i cui livelli adiposi e /o cerebrali sono influenzati dalla dieta, potrebbe contribuire a svelare l'interrelazione tra obesità e neurodegenerazione. In particolare, le citochine proinfiammatorie, come il $TNF\alpha$, sono implicate nello sviluppo dell'insulina resistenza neuronale (Lourenco et al., 2013). Poiché sia le citochine che l'insulina nel cervello regolano la plasticità sinaptica, l'apprendimento e la memoria, è stato proposto che l'infiammazione neuronale e l'insulino-resistenza neuronale siano coinvolte nella compromissione cerebrale associata all'obesità. Inoltre, il sovrappeso durante la mezza età è stato

associato ad un rischio più elevato di sviluppare disturbi cognitivi, inclusa la malattia di Alzheimer.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è quello di indagare l'effetto del trattamento dietetico con una dieta ricca in grassi saturi e fruttosio su ratti di mezza età. Pertanto, è stato valutato l'impatto di questo trattamento dietetico sull'omeostasi metabolica sistemica, e sulla funzionalità del fegato, tessuto adiposo e cervello di ratti di mezza età. In particolare, in ratti di mezza età è stato studiato l'effetto di 4 settimane di alimentazione ad alto contenuto di grassi e fruttosio sulla composizione corporea, sul bilancio energetico, su marcatori specifici di stress ossidativo e infiammazione, nonché sulla sensibilità all'insulina. In questi ratti, è stata valutata poi la respirazione mitocondriale, i markers del bilancio ossidativo e l'espressione dei complessi respiratori I – V, il coattivatore 1-alfa del recettore gamma attivato dai proliferatori perossisomiali (PGC-1 α), il recettore attivato dai proliferatori perossisomiali (PPAR α) e la proteina disaccoppiante 2 (UCP2), nel fegato e in due regioni cerebrali critiche, come l'ippocampo e la corteccia prefrontale. Per studiare la funzione respiratoria mitocondriale, è stata utilizzata la respirometria ad alta risoluzione (HRR). Questo nuovo approccio consente l'analisi della disfunzione nella catena di trasporto degli elettroni, della fosforilazione ossidativa e della respirazione tenendo conto dell'intero spettro di controllo respiratorio, meccanismi compensatori e dell'architettura cellulare che influenza la funzione mitocondriale.

Infine è stata valutata la possibile somiglianza nella risposta del tessuto adiposo bianco e del cervello in seguito ad una tipica dieta occidentale (ricca di grassi saturi e fruttosio, HFF) per 4 settimane. In particolare, le cito / adipochine specifiche (TNF- α , adiponectina), i marker critici di infiammazione dell'obesità

(aptoglobina, lipocalina) e il segnale dell'insulina (IRS, Akt, Erk) sono stati misurati sia nel tessuto adiposo che nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale, due aree chiave per l'apprendimento e la memoria.

DISEGNO SPERIMENTALE

Ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley sono stati forniti da Charles River (Calco, Como, Italia). Tutti i ratti sono stati stabulati singolarmente ad una temperatura controllata di $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con un ciclo luce/buio di 12 ore (6.30-18.30). Tutte le procedure sperimentali che coinvolgono animali soddisfano le linee guida stabilite dal Ministero della Salute Italiano e sono state approvate dal “Comitato Etico-Scientifico per la Sperimentazione Animale” dell’Università di Napoli “Federico II” (260/2015-PR).

I ratti di mezza età (di 11 mesi) sono stati divisi in tre gruppi, ciascuno composto da otto ratti. Un gruppo di ratti è stato sottoposto ad eutanasia all’inizio della fase sperimentale per determinare i valori iniziali della composizione corporea, mentre gli altri due gruppi sono stati alimentati: uno con una dieta ad alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) e l’altro con una dieta di controllo (LF) per 4 settimane. La composizione delle due diete è riportata in tabella 1.

Durante il trattamento dietetico quotidianamente veniva monitorato il peso corporeo, l’assunzione di cibo e acqua e infine erano raccolte le feci. Alla fine del periodo sperimentale, gli animali sono stati anestetizzati con sodio Tiopental (40 mg/kg di peso corporeo) e sottoposti ad eutanasia tramite decapitazione. Il sangue, campioni di fegato, tessuto adiposo bianco, ippocampo e corteccia sono stati raccolti mentre la carcassa è stata usata per determinare la composizione corporea.

Tabella 1. Composizione dietetica.

	Controllo	Alto contenuto di grassi e fruttosio
Componenti g/1000g		
Mangime standard ^a	395.3	231.5
Olio di girasole	19.3	19.3
Caseina	59.7	133.3
Acqua	175.7	175.4
Mix di minerali AIN-93	11.4	11.4
Mix di vitamine AIN-93	3.2	3.2
Colina	0.7	0.7
Metionina	0.9	0.9
Amido	333.8	---
Burro	---	129.8
Fruttosio	---	294.6
Contenuto energetico e composizione		
Contenuto ME, kJ/g ^b	11.2	14.9
Lipidi J/100J	10.5	39.3
Proteine J/100J	19.9	19.8
Carboidrati complessi J/100J	63.9	7.5
Zuccheri semplici J/100J	5.7	33.4

^a 4RF21, Mucedola, Italia; ^b Stimato tramite calcolo usando i valori (kJ/g) per il contenuto energetico come segue: proteine 16.736, lipidi 37.656, e carboidrati 16.736. ME = energia metabolizzabile.

MATERIALE E METODI

Misura della composizione corporea

Le carcasse degli animali sottoposti ad eutanasia sono state pesate, autoclavate per 90 minuti, quindi sminuzzate, mescolate accuratamente ed infine omogeneizzate con acqua (volume finale uguale a due volte il peso della carcassa) in un omogeneizzatore Politron. Aliquote dell'omogenato sono state poi utilizzate per analizzare il contenuto energetico, il contenuto dei lipidi, delle proteine e di acqua della carcassa.

Misura del contenuto energetico della carcassa

Campioni dell'omogenato essiccato sono stati ridotti in polvere ed utilizzati per ottenere delle pasticche di circa 200 mg. Tali pasticche sono servite per misurare il contenuto energetico della carcassa mediante una bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico Parr della Parr Instruments Co., Moline, USA) calibrata con uno standard di acido benzoico essiccato. La bomba calorimetrica è un apparecchio usato per determinare il calore di combustione di sostanze solide o liquide. Consiste di un recipiente cilindrico in acciaio inossidabile, le cui pareti sono robuste ed inattaccabili chimicamente dalle sostanze che in esso bruciano, chiuso da un coperchio a vite, a cui è fissata un'asticciola metallica con un uncino di platino che regge una capsula di platino in cui si introduce una quantità nota del campione da esaminare allo stato secco. Al coperchio della bomba sono anche fissati due uncini metallici a cui viene collegato un filo di nichel che viene messo in contatto con la sostanza contenuta nella capsula. Una volta chiusa la bomba, vi si comprime all'interno ossigeno a circa 25 atmosfere (sotto pressione) attraverso un rubinetto apposito e si immerge il tutto in un calorimetro ad acqua costituito

da un vaso di Dewar. La combustione della sostanza in esame viene provocata mediante una corrente elettrica che si fa passare attraverso due elettrodi connessi al coperchio della bomba, e da qui attraverso gli uncini metallici fino ad arroventare il filo che è a contatto con il campione della sostanza nella capsula di platino. In tale apparecchiatura il calore fornito dall'ossidazione dei substrati fa innalzare la temperatura di un volume noto di acqua che circonda la bomba calorimetrica e attraverso il valore in °C dell'innalzamento termico, il valore del calore specifico dell'acqua e la quantità precisa della sostanza sottoposta all'ossidazione si risale alle chilocalorie prodotte per grammo di sostanza contenuta nella capsula. Il valore del contenuto energetico della carcassa essiccata così ottenuto viene poi corretto per il contenuto di acqua della carcassa per ottenere il valore effettivo per grammo di carcassa.

Misura del contenuto lipidico, proteico e di acqua della carcassa

Il contenuto lipidico della carcassa è stato determinato gravimetricamente in seguito all'estrazione dei lipidi dalla carcassa in accordo con il metodo di Folch (Folch et al, 1957). Nel primo passaggio della procedura, si estraggono i lipidi dall'omogenato di carcassa con una miscela di cloroformio-metanolo (2:1), diluendo la carcassa 20 volte e filtrando poi l'omogenato così ottenuto. Nel passaggio successivo, al filtrato contenente le sostanze lipidiche e non lipidiche della carcassa si aggiungono 0.2 volumi di una soluzione 0.29 % di NaCl. Dopo centrifugazione a 1000 g per 20 minuti a 21°C, si ottengono due fasi: una superiore acquosa ed una inferiore che costituisce l'estratto lipidico puro totale. La fase superiore viene, quindi, aspirata e l'interfaccia viene lavata con una miscela di cloroformio-metanolo-NaCl 0.58 % (in rapporto 3:48:47). La

procedura di lavaggio serve ad eliminare tutti i contaminanti non lipidici dall'estratto. La fase lipidica così ottenuta viene versata in appositi recipienti di vetro, dai quali il solvente viene fatto evaporare mediante l'ausilio di un evaporatore rotante (Heidolph, Germania). Il contenuto lipidico della carcassa, espresso in grammi, è stato ottenuto sottraendo il peso del recipiente vuoto dal peso complessivo del recipiente contenente i lipidi. Il contenuto energetico della carcassa sotto forma di lipidi (espresso in KJ) è stato calcolato dal contenuto lipidico utilizzando il coefficiente 39.2 KJ/g per il contenuto energetico dei lipidi.

Il contenuto proteico della carcassa è stato determinato sottraendo al contenuto energetico totale della carcassa il contenuto energetico dovuto ai lipidi; il valore ottenuto è stato diviso per una costante indicante il contenuto energetico per grammo di proteine (23.5 KJ/g). Per quanto riguarda la misura del contenuto di acqua, aliquote di omogenato di carcassa sono state distribuite in apposite vaschette le quali, dopo essere state pesate, sono state lasciate ad essiccare in stufe a secco per 48 ore a 60 °C. Per differenza tra il peso delle vaschette contenenti l'omogenato prima e dopo l'essiccazione, è stato determinato il contenuto di acqua della carcassa.

Misura del bilancio energetico

Al fine di determinare il guadagno di peso corporeo e l'introito energetico lordo sono stati controllati quotidianamente l'assunzione di cibo ed il peso corporeo dei ratti. Inoltre, le feci ed il cibo caduto all'interno della gabbia sono stati raccolti giornalmente. Le feci sono state messe ad essiccare in una stufa e con un procedimento analogo a quello eseguito per la carcassa, dopo essere state sminuzzate e trasformate in pasticche di circa 200 mg, sono state ossidate

all'interno del calorimetro adiabatico Parr per determinarne il contenuto energetico. Con la stessa procedura è stato possibile stabilire il contenuto energetico lordo delle diete con cui sono stati alimentati i ratti. I risultati mostrano che il valore del contenuto energetico è pari a 17.2 KJ/g sia per la dieta di controllo che per la dieta ricca in fruttosio. Il valore dell'energia metabolizzabile (ME) introdotta è stato determinato sottraendo l'energia contenuta nelle feci e nel cibo recuperato all'introito energetico lordo e moltiplicando il valore ottenuto per il fattore di correzione dell'energia persa con le urine che è pari a 0.96 (Barr et al, 1984). Il guadagno energetico corporeo è stato calcolato come differenza tra il contenuto finale ed iniziale di energia corporea. Il contenuto energetico corporeo iniziale è stato stimato prendendo come riferimento il contenuto energetico corporeo del gruppo di ratti sacrificati all'inizio del periodo sperimentale. Allo stesso modo è stato calcolato il guadagno di proteine e di grassi. Dalla differenza tra la ME introdotta ed il guadagno energetico corporeo è stato possibile determinare la spesa energetica. Infine, è stato calcolato il valore dell'efficienza metabolica come rapporto percentuale tra il guadagno corporeo di energia e l'energia metabolizzabile introdotta.

Profilo plasmatico

Test di tolleranza al glucosio

Il test di tolleranza al glucosio è stato effettuato dopo 4 settimane di trattamento. A tal fine, i ratti sono stati tenuti a digiuno per 6 ore dalle 08.00 di mattina. Il campione basale del sangue è stato ottenuto attraverso un piccolo taglio effettuato sulla coda ed è stato posto in provette rivestite con EDTA, poi il glucosio (2 g/kg peso corporeo) è stato iniettato per via intraperitoneale. I campioni di sangue sono stati prelevati dopo 20, 40, 60, 90 e 120 minuti e posti in provette rivestite con EDTA. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 1400 g per 8 minuti a 4 °C. La concentrazione plasmatica di glucosio è stata misurata con metodo enzimatico colorimetrico (Pokler Italia, Genova, Italia), mentre la concentrazione di insulina plasmatica è stata misurata utilizzando un kit ELISA (Merckodia AB, Svezia) in un unico test per rimuovere le variazioni inter-saggio.

Poiché l'entità dell'aumento del glucosio plasmatico e le concentrazioni di insulina immediatamente a seguito del carico di glucosio (0-30 min) sono proporzionali al grado di resistenza all'insulina epatica (Abdul-Ghani et al, 2008), e poiché l'aumento delle concentrazioni di glucosio e di insulina del plasma possono essere valutate dall'area sotto la curva (AUC) per glicemia e insulina, il prodotto di AUC glucosio e AUC insulina durante i primi 30 minuti dopo il carico di glucosio è stato calcolato e utilizzato come indice della resistenza all'insulina epatica.

Parametri plasmatici

Le concentrazioni plasmatiche dell'alanina aminotransferasi (ALT), dei trigliceridi, del colesterolo totale e del colesterolo HDL sono state misurate con il metodo enzimatico colorimetrico utilizzando kit commerciali (SGM Italia, Italia).

I valori di colesterolo LDL sono stati ottenuti attraverso la formula:

colesterolo totale - [colesterolo HDL + (trigliceridi/5)].

Markers infiammatori plasmatici

Le concentrazioni di TNF- α sono state determinate utilizzando un test di immunoassorbimento enzimatico specifico per ratto (R&D Systems, Minneapolisok, MN, USA) secondo le istruzioni del produttore. Brevemente, i pozzetti di una piastra di microtitolazione sono stati rivestiti con 100 μ l di anticorpi anti-TNF- α (4 mg / ml) in PBS (137 mM di NaCl, 2,7 mM di KCl, 8,1 mM di Na₂HPO₄, 1,5 mM di KH₂PO₄, pH 7,4), e incubate per una notte a temperatura ambiente. L'eccesso di anticorpo è stato poi rimosso mediante lavaggio con tampone di lavaggio (contenente 0,05% (v / v) di Tween 20 in PBS, pH 7,4), e i rimanenti siti sulla piastra sono stati bloccati con diluente reattivo (PBS contenente 1% di BSA) (1 h, temperatura ambiente). Dopo un lungo lavaggio, 100 μ l di campioni di plasma (1:10 diluizione nel diluente reattivo) sono stati aggiunti ai pozzetti e incubati per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo un ulteriore lavaggio, i pozzetti sono stati incubati con anti-TNF- α biotinilato (225 ng / ml di diluente reattivo) seguito dal trattamento con streptavidina-HRP (diluizione 1:200; 1h, temperatura ambiente). Lo sviluppo di colore dalla

tetrametilbenzidina catalizzato dalla perossidasi è stato misurato a 492 nm. I valori di TNF- α sono espressi come ng/mg proteina.

La concentrazione di aptoglobina è stata misurata mediante ELISA. I campioni sono stati diluiti (plasma = 1:9000–1:70.000) con coating buffer (7 mM Na₂CO₃, 17 mM NaHCO₃, 1.5 mM NaN₃, pH 9.6) e le aliquote (50 μ L) sono state quindi incubate nei pozzetti di una piastra per microtitolazione (Immuno MaxiSorp; overnight, 4° C). Il lavaggio e il blocking sono stati effettuati come precedentemente riportato, quindi i pozzetti sono stati incubati (1 ora, 37° C) con 50 μ L di anti-aptoglobina umana di coniglio (1:500 in 130mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.05% Tween, pH 7.4, contenente 0.25% BSA), e successivamente con 60 μ L di anticorpo secondario coniugato con HRP (diluizione 1:5000). Lo sviluppo del colore, dato dalla o-fenilendiammina, catalizzato dalla perossidasi è stato misurato a 492 nm.

La lipocalina è stata rilevata mediante la tecnica del western blot. Tutti i campioni di plasma sono stati adeguati alla concentrazione proteica di 10 μ g/ μ L e 5 μ L sono stati usati per l'elettroforesi.

Attività mitocondriale in ippocampo, corteccia prefrontale e fegato

I tessuti sono stati omogeneizzati (1: 1000) in un tampone Mir05 contenente 110 mM di saccarosio, 60 mM K-lattobionato, 20 mM Hepes, 20 mM taurina, 10 mM KH₂PO₄, 6 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 0,1% BSA libera da acidi grassi, pH 7.0. I campioni (2 mg di tessuto in 2 mL di Mir05) sono stati incubati in camere calibrate dell'Ossigrafo-2k (O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) a 37 °C \pm 0,001 °C e la concentrazione di ossigeno (μ M) e il flusso di ossigeno per

massa tissutale ($\mu\text{mol O}_2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) è stato registrato in tempo reale utilizzando il software DatLab (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria). Dopo l'aggiunta dei campioni di omogenato, è stato applicato un protocollo SUIT (Substrate, Uncoupler, Inhibitor Titration) per valutare i cambiamenti mitocondriali. La respirazione attraverso il complesso I della catena respiratoria (CI) è stata valutata aggiungendo i substrati malato (0,5 mM), piruvato (5 mM) e glutammato (10 mM). È stato quindi aggiunto ADP 2,5 mM, per valutare la respirazione fosforilante con trasferimento di elettroni supportato dal complesso I. La respirazione fosforilante massima con input di elettroni dal complesso I e II è stata ottenuta aggiungendo succinato a 10 mM. L'oligomicina a 2,5 mM è stata aggiunta per inibire l'ATP sintasi, seguita dall'aggiunta del disaccoppiatore carbonilcianuro p-trifluorometossifenilidrazina (FCCP, 0,5 mM), per valutare la capacità massima della catena di trasporto degli elettroni. Il rotenone (0,5 μM) è stato aggiunto per inibire il CI e determinare la capacità massima supportata dal solo CII. Il consumo di ossigeno residuo è stato stabilito mediante l'aggiunta dell'inibitore Antimicina A (2,5 mM) e il valore risultante è stato sottratto dai flussi in ciascuna sessione per correggere la respirazione non mitocondriale. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato e la media è stata utilizzata per l'analisi.

Composizione del fegato

Il contenuto lipidico del fegato è stato determinato gravimetricamente in seguito all'estrazione dei lipidi in accordo con il metodo di Folch (1957).

La concentrazione dei trigliceridi e del colesterolo relativi al fegato è stata determinata mediante l'utilizzo di un dosaggio di tipo enzimatico-colorimetrico (SGM Italia, Italia).

Il contenuto di ceramidi nel fegato è stato valutato mediante saggio ELISA (Crescenzo et al., 2013) con piastre PolySorp da 96 pozzetti (Nunc, NY, USA). In breve, i lipidi estratti dal muscolo scheletrico, risospesi in 70 µl di metanolo, sono stati addizionati ai pozzetti delle piastre, overnight a 4 °C. Le piastre sono state bloccate con PBS 10 mM, NaCl 140 mM e 0.1% di Tween pH 7.4, 1% di BSA per 1 h a 37°C, sono state lavate tre volte con PBS 10 mM, NaCl 140 mM e 0.05 % di Tween pH 7.4 (PBS-Tween) ed incubate con un anticorpo monoclonale anti-ceramide (2 µg/ml) per 1 h a 37°C. Dopo tre lavaggi in PBS-Tween le piastre sono state incubate con un anticorpo secondario anti-mouse IgM coniugato a perossidasi di rafano (1:5000) per 1 h a 37°C. Dopo altri quattro lavaggi in PBS-Tween, è stata aggiunta la soluzione di sviluppo (20 mg 0-fenilendiamina dicloroidrato in 50 ml di Na₂HPO₄ 70 mM, acido citrico 30 mM pH 5, e 120 µl di H₂O₂. Dopo 15 minuti a 37 °C la reazione è stata stoppata con l'aggiunta di 50 µl di H₂SO₄ 2.5 M ed è stata misurata l'assorbanza a 492 nm. Tutte le misure sono state effettuate in triplicato. L'immunoreattività è stata normalizzata al peso iniziale del tessuto. Le reazioni del controllo negativo includevano l'omissione dell'anticorpo primario.

Misura del danno ossidativo in omogenati di ippocampo, corteccia prefrontale e fegato

La perossidazione lipidica è stata determinata secondo Fernandes et al, (2006), misurando sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS), utilizzando il

saggio dell'acido tiobarbiturico così come descritto per il plasma. I TBARS formati durante la reazione vengono espressi in nmol TBARS per g di tessuto per le misure effettuate nell'omogenato. Aliquote di omogenato di fegato, ippocampo e corteccia (1:8 w/v) sono state aggiunte a 0,5 ml di acido tricloroacetico ghiacciato al 40%. Poi sono stati aggiunti 2 ml di acido tiobarbiturico acquoso al 0,67% contenente 0,01% di 2,6-di-tert-butil-p-cresolo. Le miscele sono state riscaldate a 90 °C per 15 minuti, poi raffreddate in ghiaccio per 10 min, e centrifugate a 850 g per 10 min. I surnatanti sono stati raccolti e la perossidazione lipidica è stata stimata spettrofotometricamente a 530 nm. La quantità di TBARS formati è stato calcolato con un coefficiente di estinzione molare di $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ed espressa come nmol di TBARS / g di tessuto.

L'attività specifica della superossido dismutasi (SOD), è stata valutata in accordo con Flohè e Otting (1984), in un mezzo caratterizzato da 0.1 mM EDTA, 2 mM KCN, 50 mM KH_2PO_4 pH 7.8, 20 mM citocromo C, 0.1 mM di xantina, e 0.01 unità di xantina ossidasi. Il dosaggio è stato eseguito spettrofotometricamente (550 nm) a 25°C, monitorando il decremento nel tasso di riduzione del citocromo C da parte del radicale superossido, generato dal sistema xantina xantina ossidasi. Un'unità di SOD è definita come la concentrazione di enzima capace di inibire del 50 % la riduzione del citocromo C in presenza del sistema xantina-xantina ossidasi.

L'attività della catalasi è stata misurata in omogenati di fegato, corteccia e ippocampo preparati in 50mM di buffer fosfato, pH 7.0 (1.50 w/v) monitorando il decremento dell'assorbanza a 240 nm dovuta alla decomposizione di H_2O_2 (Maehly AC,1954).

L'attività della NADPH ossidasi, in estratti di membrana degli epatociti, è stata analizzata secondo la modifica del metodo di Bettaieb et al. (2014). Brevemente, il tessuto epatico (1:10 w/v) è stato omogenizzato in Krebs buffer ghiacciato e poi centrifugato a 800 g a 4°C per 10 minuti. Il surnatante è stato raccolto e poi centrifugato a 30,000 g per 2 ore a 4°C. Il pellet (estratto delle membrane) è stato risospeso in Krebs buffer ed è stata misurata la concentrazione proteica. Le aliquote contenenti 100 µg di proteine sono state aggiunte al Krebs buffer contenete NADPH (500 µM). La variazione dell'assorbanza a 340 nm è stata seguita per 10 minuti a intervalli di 30 secondi. L'attività enzimatica è stata espressa come nmol/min x mg di proteine.

Lipogenesi nel fegato

La stearil-CoA desaturasi (SCD) è una delta-9 desaturasi degli acidi grassi che converte gli acidi grassi saturi in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) (Flowers MT, 2008); in particolare, l'enzima introduce un doppio legame in posizione cis- Δ 9 di acidi grassi saturi con una lunghezza della catena carboniosa da C 12:0 a C 19:0. I substrati preferiti sono il palmitoil-CoA (16:0) e lo stearoil-CoA (C 18:0) che vengono convertiti rispettivamente in palmitoleoil-CoA (C 16:1) e oleoil-CoA (C 18:1).

La SCD (40 KDa) è una proteina integrale di membrana ancorata al reticolo endoplasmatico; inoltre, si tratta di una ossidasi, per cui la sua attività è stata determinata polarograficamente in campioni di omogenato di fegato di ratto. Le misure sono state effettuate utilizzando l'elettrodo ad ossigeno di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e un anodo di argento, immersi in una soluzione di KCl (ponte

salino) 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. Quando agli elettrodi si applica un voltaggio di 0.5-0.8 Volt, l'ossigeno al catodo viene ridotto da quattro elettroni prodotti all'anodo, originando così una corrente proporzionale alla sua quantità nella soluzione in esame. La tensione di ossigeno al catodo, quindi, tende ad azzerarsi promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. Per questo motivo l'elettrodo di Clark risulta utile nelle misure dei rapidi cambiamenti dell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari. Le misure sugli omogenati sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 37°C, in una soluzione contenente 0.1 mM K₂HPO₄ (pH 7.4) e 1 µM mixotiazolo, in presenza di 0.12 mM NADH e 0.06 mM stearyl-CoA, valutando il consumo di ossigeno in presenza o assenza di 5 mM KCN. Tale metodica si basa sul principio che nell'omogenato di fegato possono contribuire al consumo di ossigeno i mitocondri, i perossisomi e in parte anche il reticolo endoplasmatico dove si realizza l'insaturazione degli acidi grassi. Al fine di determinare l'attività della SCD, è stato valutato il consumo di ossigeno totale dell'omogenato epatico. Tali misure sono state effettuate in presenza di mixotiazolo che inibisce la respirazione mitocondriale, eliminando, quindi, il contributo dei mitocondri al consumo di ossigeno. Il KCN inibisce la respirazione dovuta al reticolo endoplasmatico e, dunque, della SCD. In presenza sia di mixotiazolo che di KCN respirano solo i perossisomi, per cui sottraendo il valore di questa misura a quella ottenuta con solo il mixotiazolo, in cui respirano sia i perossisomi che il reticolo endoplasmatico, si ottiene la differenza dovuta solo al reticolo endoplasmatico dove è localizzato l'enzima SCD.

L'acido grasso sintasi (FAS) è un complesso multi-enzimatico capace di sintetizzare acidi grassi partendo da malonil-CoA ed acetil-CoA, attraverso una complessa serie di reazioni in cui viene ossidato il coenzima NADPH. La forma ridotta di questo coenzima presenta una banda di assorbimento con picco massimo a 340 nm, per cui l'attività specifica della FAS può essere determinata valutando la cinetica della reazione di ossidazione del NADPH mediante una lettura spettrofotometrica a tale lunghezza d'onda. Dal momento che la FAS è localizzata nel citoplasma degli epatociti, il dosaggio viene effettuato su campioni di omogenato di fegato. In particolare, secondo il protocollo sperimentale (Penicaud et al.1991), i campioni in esame (1,5 mg di fegato) sono stati incubati in una soluzione contenente KH_2PO_4 0.1 mM a pH 6.5, acetil-CoA 57.9 μM , malonil-CoA 87.9 μM e NADPH 281.2 μM . Sono state, inoltre, effettuate delle misure in assenza del substrato enzimatico malonil-CoA (bianchi) per escludere un'eventuale quota di NADPH ossidato indipendentemente dalla FAS. La lettura spettrofotometrica a 340 nm è stata effettuata ogni minuto per 6 minuti a 37°C. Quindi, in base alla velocità di ossidazione del NADPH, è stato possibile calcolare le unità enzimatiche di FAS per grammo di fegato analizzato, sapendo che una unità rappresenta la quantità di enzima che ossida 1 μmol di NADPH in un minuto a 37°C.

WESTERN BLOT nel fegato, e-wat, ippocampo e corteccia prefrontale

Le proteine sono state estratte dai tessuti diluendo i campioni 1: 1 con un tampone di lisi (20,0 mL / L Tris, pH 8, 5% glicerolo, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1% NP-40, 5 mM EDTA, 5% con un cocktail di inibitore proteasi, 1% di un cocktail

inibitore della fosfatasi). Gli omogenati sono stati centrifugati a 15.000 g per 15 min a 4 ° C, quindi i surnatanti sono stati raccolti e utilizzati per la quantificazione di diverse proteine, vale a dire p-Akt, p-Erk, p-IRS, adiponectina, lipocalina, recettore LDL, PPAR α , recettore gamma attivato dai proliferatori perossisomiali (PPAR γ), UCP2, PGC1- α e i complessi respiratori I-V. Aliquote di 20 μ g (40 μ g per i complessi respiratori) sono state denaturate in Laemmli's buffer (60 mMTrisPH6,8,10% di saccarosio, 2% SDS, 4% β -mercaptoetanolo, 0,02% di bromofenolo blu-poliacido 12,5% e acido silamidico). Successivamente, i gel sono stati trasferiti su membrane di polivinilidene fluoroide (Millipore, Billerica, MA, USA) a 0,8 mA / cm² per 90 min. Le membrane sono state bloccate in PBS, 3% di albumina bovina, 0,3% Tween 20 per p-Akt, p-Erk, lipocalina, recettore LDL, PPAR α , PPAR γ , UCP2, p-IRS, OXOPHOS e Adiponectina per 1 h e poi incubate per una notte a 4 °C con anticorpi per p-Akt (Ser473) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; diluito 1: 1000 in tampone bloccante), p-Erk (Thr 202/Tyr 204) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; diluito 1 : 1000 in tampone bloccante), lipocalina (Thermo Fisher, Rock Ford, USA; diluito 1: 200 in tampone bloccante), recettore LDL (Abcam, Cambridge, Regno Unito, 1: 200 in tampone bloccante), PPAR- α (Thermo Fisher, IL, USA; 0,5 mg / mL in tampone bloccante), PPAR- γ (Thermo Fisher, IL, USA; 1: 1000 in tampone bloccante) UCP2 (abcam, Cambridge, Regno Unito, diluito 1:1000 in tampone bloccante), PGC1- α (Merck, Darmstadt, Germany; diluito 1:1000 in T-TBS contenente lo 0.25% di latte),complessi respiratori I-V (OXOPHOS, Abcam, Cambridge, UK; diluito 1:400 in T-TBS contenente il 3% di BSA), p-IRS (Tyr895) (Cell Signaling Danvers, MA, USA, diluito 1:1000 in tampone bloccante), Adiponectina (Immunological Science, Roma, Italia, 1:1000 in tampone bloccante). Le

membrane sono state lavate e quindi incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari coniugati con HRP (Promega, Madison, WI, USA, diluiti 1: 5000 per p-Akt, p-Erk, lipocalina, recettore LDL, PPAR- α , PPAR- γ , Adiponectina, p-IRS e UCP-2; o Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), mentre PGC1- α è stato incubato con un anticorpo secondario coniugato con HRP (Merck, Darmstadt, Germany; diluito 1:1000 in T-TBS contenente lo 0.25% di latte), e i complessi respiratori sono stati incubati con anticorpo secondario HRP (GAM-HRP; Sigma Aldrich; Diluizione 1: 120.000 per il rilevamento del complesso I, 1: 170.000 per i complessi II e III, 1: 60.000 per il complesso IV, 1: 200.000 per il complesso V, in T-TBS contenente l'1% di latte; per 1 ora, 37 ° C). Diverse diluizioni di anticorpo secondario sono state utilizzate per ottimizzare l'intensità della banda e la quantificazione accurata di ciascun complesso. Per p-Akt, p-Erk, lipocalina, recettore LDL, PPAR- α , PPAR- γ e UCP-2, PGC1- α , p-IRS, Adiponectina e i complessi respiratori le membrane sono state lavate e incubate a temperatura ambiente con un substrato chemiluminescente, Immobilon (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA). Per il controllo, Akt è stato rilevato con anticorpo policlonale (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; diluito 1: 1000 in tampone di blocco) e utilizzato per normalizzare il segnale di p-Akt, Erk totale è stato rilevato con anticorpo monoclonale (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; diluito 1: 1000 nel tampone bloccante) e usato per normalizzare p-Erk, mentre l'actina è stata rilevata con anticorpo policlonale (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; diluito 1: 1000 nel tampone bloccante) e usata per normalizzare i segnali di lipocalina, adiponectina, recettore LDL, PPAR- α , PPAR- γ , UCP-2, PGC1- α e i complessi respiratori. IRS-1 è stato rilevato con un anticorpo monoclonale (Cell Signaling, Danvers, MA, USA diluito 1:1000 in tampone di

blocco) e utilizzato per normalizzare p-IRS. La densitometria quantitativa delle bande è stata effettuata analizzando immagini chemidoc utilizzando il software Image Lab (Biorad Laboratories S.r.l., Segrate (MI) - Italia).

Markers infiammatori in e-wat, fegato, ippocampo e corteccia prefrontale

Le concentrazioni di TNF- α sono state determinate utilizzando un test di immunoassorbimento enzimatico specifico per ratto (R&D Systems, Minneapolisok, MN, USA) secondo le istruzioni del produttore così come indicato per il plasma, utilizzando estratti proteici. I valori di TNF- α sono espressi come ng/mg proteina.

La concentrazione di aptoglobina è stata misurata mediante ELISA come descritto per il plasma. I campioni sono stati diluiti per il tessuto adiposo, 1:1000–1: 30.000.

Il grado di attività della mieloperossidasi (MPO) può essere considerato un marker dell'infiammazione, in quanto è stato mostrato che l'attività di questo enzima leucocitario è direttamente proporzionale alla quantità di neutrofili che infiltra il tessuto infiammato (Krawisz et al. 1984). Quindi è stata valutata l'attività della MPO in campioni di fegato, come riportato da Kim et al. (2012). Il grado di attività dell'enzima è stato valutato, assumendo che un'unità di attività della MPO sia quella che degrada 1 micromole di H₂O₂ al minuto a 25°C, e sapendo che la degradazione di 1 micromole di H₂O₂ genera una variazione di assorbanza al minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) di $1,13 * 10^2 \text{ nm}$.

Analisi statistiche

I dati riportati sono le medie \pm SEM. Le valutazioni statistiche sono state compiute mediante il test "t di Student" o, quando richiesto, l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie seguita dal post test di Tuckey. Valori di probabilità minori di 0,05 ($p < 0,05$) sono stati considerati statisticamente significativi. Tutte le analisi sono state compiute utilizzando il programma GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RISULTATI

Composizione corporea

I ratti HFF mostrano un aumento significativo nel guadagno del peso corporeo, nel guadagno dell'energia corporea e nel guadagno dei lipidi. D'altro canto, il guadagno delle proteine corporee (calcolato come differenza tra il guadagno di energia corporea e guadagno di lipidi corporei, espressa in KJ) è significativamente più basso nei ratti HFF rispetto quelli di controllo (Tabella 2).

La somministrazione di una dieta HFF ha suscitato iperfagia calorica nella prima settimana e, in misura meno marcata, nella seconda settimana, mentre durante la terza e la quarta settimana l'introito calorico è risultato simile nei due gruppi di ratti (Figura 1A). I ratti HFF hanno mostrato un aumento giornaliero di peso corporeo significativamente più elevato, così come un maggiore contenuto corporeo di tessuto adiposo bianco epididimale (e-WAT), sia in termini di quantità assoluta sia in % del peso corporeo (Figura 1B).

Tabella 2: Composizione corporea e bilancio energetico

Composizione Corporea	Valori iniziali	LF	HFF
Peso corporeo iniziale, g		642.0 ± 40.0	643.0 ± 40.0
Peso corporeo finale, g		654.0 ± 40.0	678.0 ± 40.0
Guadagno del peso corporeo, g		12.0 ± 1.0	35 ± 2.0*
Energia corporea, KJ/g	15.5 ± 0.6	15.5 ± 0.3	15.2 ± 0.7
Lipidi corporei, g/100g b.w.	21.6 ± 1.8	25.3 ± 1.6	26.7 ± 3.0*
Proteine corporee, g/100g b.w.	27.6 ± 1.8	23.6 ± 2.0*	20.0 ± 2.0*
Acqua corporea, g/100g b.w.	58.5 ± 0.3	56.7 ± 0.9	55.5 ± 2.4
Bilancio energetico			
Introito calorico proveniente dalla dieta, g		868 ± 31.1	719.0 ± 29.0
Energia metabolizzabile, KJ		9524 ± 450.0	10.715.0 ± 864.0
Guadagno energetico, KJ		477.0 ± 40.0	598 ± 30.0*
Guadagno Lipidico, KJ		1091.0 ± 100.0	1697.0 ± 100.0*
Guadagno proteico, KJ		-584.0 ± 30.0	-1068.0 ± 30.0*
Energia spesa, KJ		9048 ± 400.0	10.117.0 ± 1000
Efficienza energetica, %		5.0 ± 0.2	5.5 ± 0.2

I valori sono le medie ± SEM di otto ratti. * p < 0.05 rispetto alla dieta LF (t-test Student non accoppiato a due code).

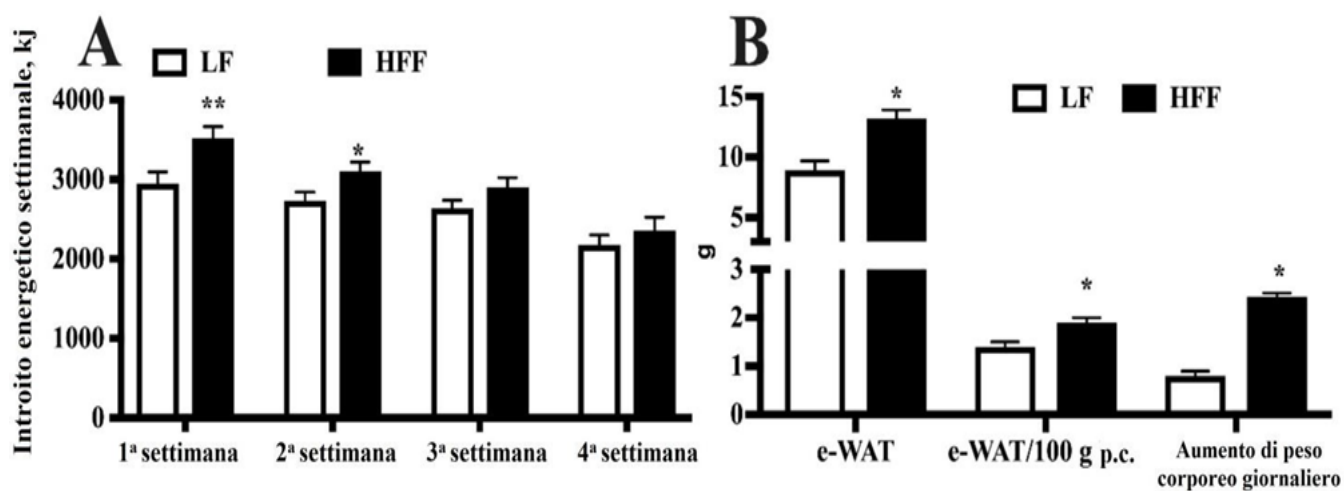


Figura 1: Introito energetico settimanale (A), peso del tessuto adiposo bianco epididimale (e-WAT) e aumento di peso corporeo (B) nei ratti di mezza età alimentati con dieta di controllo (LF) o ad alto contenuto di grassi e alto contenuto di fruttosio (HFF) per quattro settimane. I valori sono la media \pm SEM di otto differenti ratti. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ rispetto alla dieta LF (ANOVA a due vie seguito da Tukey post-test per i dati sull'assunzione di energia e Student's t-test a due code per il peso dell'e-WAT e i dati giornalieri sull'aumento di peso corporeo).

Parametri plasmatici

Il profilo dei lipidi plasmatici mostra un significativo aumento di trigliceridi (Figura 2A), colesterolo totale (Figura 2B), LDL (Figura 2C) nei ratti HFF rispetto ai ratti LF. In aggiunta i livelli plasmatici di ALT, indice affidabile di necrosi epatocellulare (Ozera et al, 2008), sono significativamente più alti in ratti HFF rispetto quelli LF (Figura 2E).

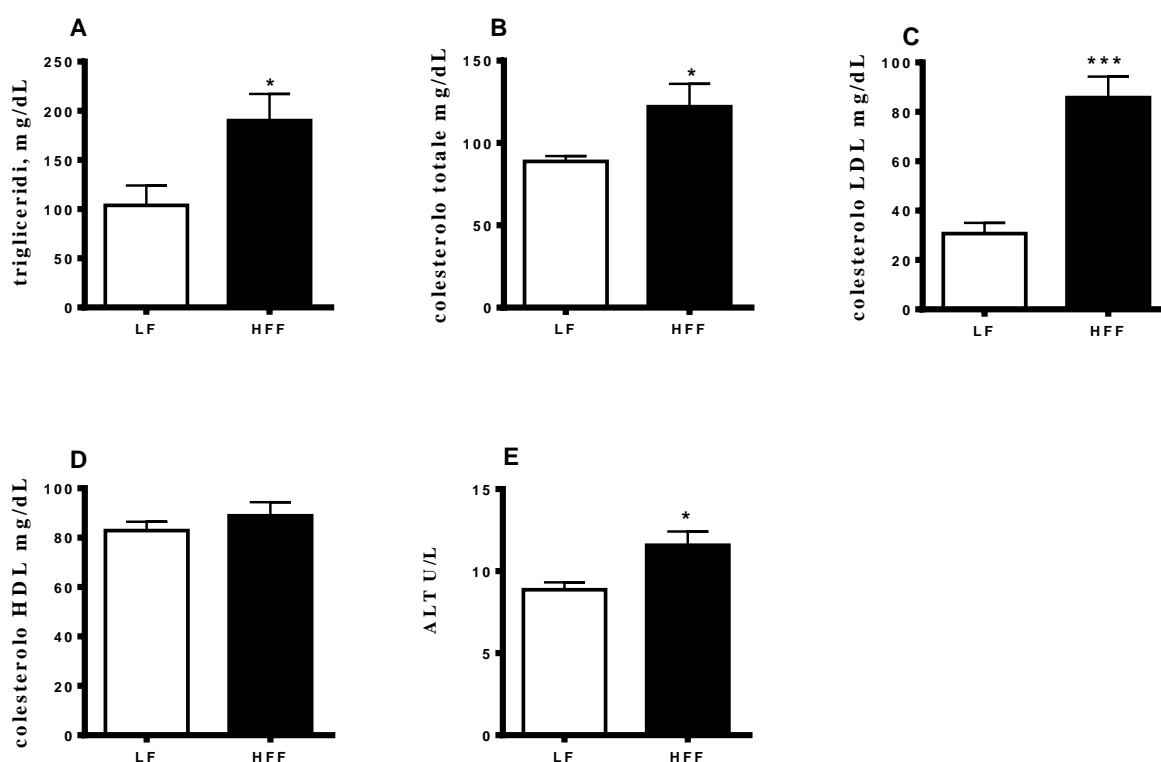


Figura 2. Livelli plasmatici dei markers dell'omeostasi dei lipidi, infiammazione e necrosi epatica nei ratti di mezza età nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. Il profilo lipidico plasmatico è stato valutato determinando i trigliceridi (A), colesterolo totale (B), colesterolo LDL (C), e colesterolo HDL (D). I livelli plasmatici di alanina aminotrasferasi sono stati valutati come marker di necrosi epatica (E). I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ rispetto alla dieta LF (t-test Student non accoppiato a due code)

Omeostasi glicemica e sensibilità all'insulina nel fegato

Sono stati analizzati i livelli plasmatici di glucosio e insulina, così come l'attivazione di Akt a livello epatico, in modo da avere un quadro generale dell'omeostasi del glucosio. I livelli di glucosio plasmatici (Figura 3A, C) e di insulina (Figura 3 B, D) sono significativamente più alti nei ratti HFF rispetto quelli LF, durante il carico di glucosio. In aggiunta, l'indice di insulino-resistenza epatica, calcolato durante la fase iniziale del test di tolleranza al glucosio, è stato trovato significativamente più alto in ratti HFF rispetto che quelli LF (Figura 3E). La sensibilità all'insulina a livello epatico è stata anche analizzata determinando il grado di fosforilazione della chinasi Akt, effettore a valle della via di trasduzione dell'insulina, che è notevolmente più basso in ratti HFF, rispetto quelli LF (Figura 3 F).

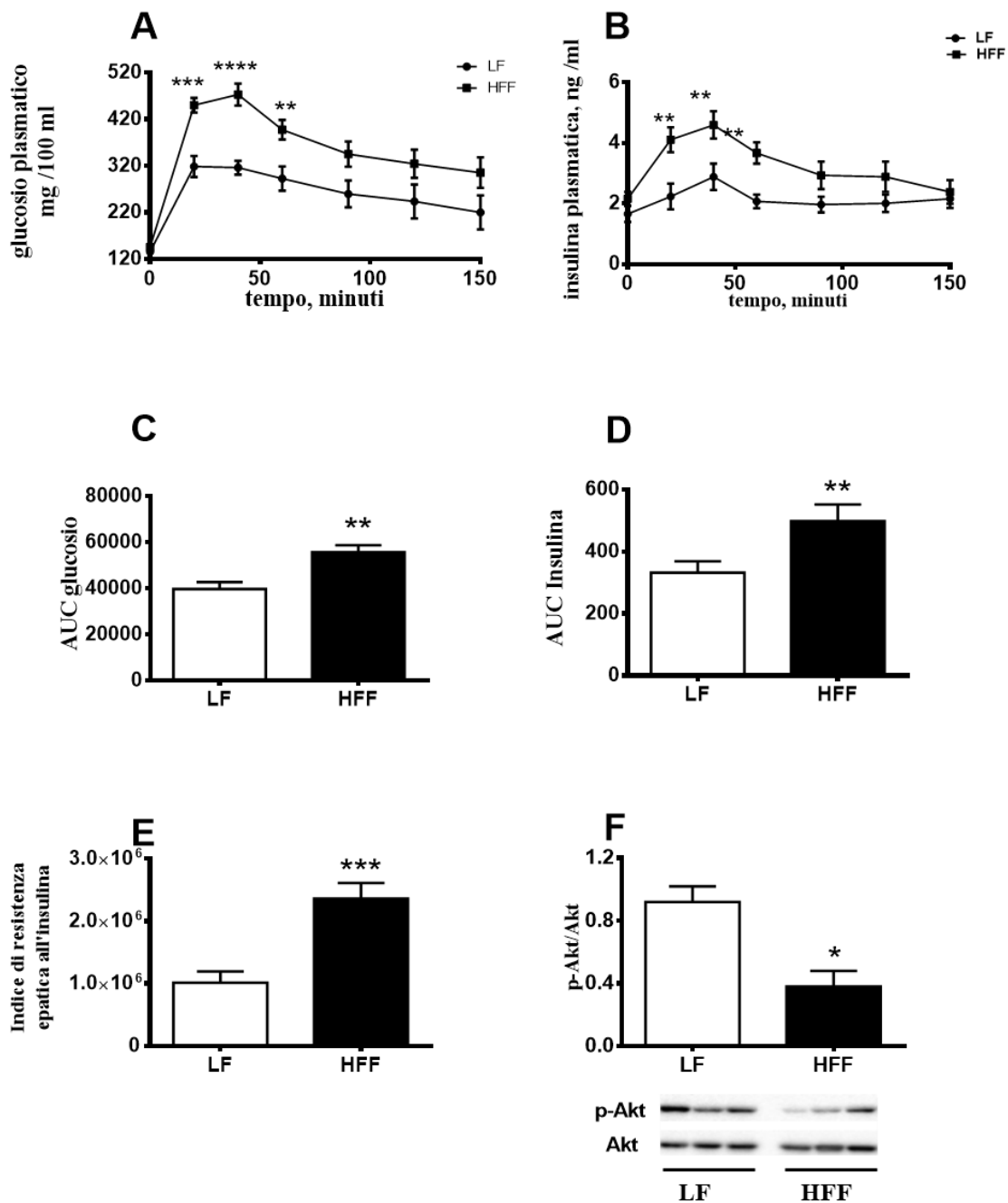


Figura 3. Omeostasi del glucosio in ratti di mezza età nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. Livelli di glucosio plasmatico (A) e di insulina (B) durante il test di tolleranza al glucosio; area sotto la curva del glucosio plasmatico (C) e insulina (D); indice di resistenza all'insulina epatica calcolata durante i primi 30 minuti del test di tolleranza al glucosio (E) contenuto di Akt fosforilata (F) valutata attraverso il western blot e normalizzata con Akt. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ comparati alla dieta LF (t-test Student non accoppiato a due code)

Composizione epatica

Con l'obiettivo di chiarire l'effetto della dieta HFF sul fegato, è stata fatta un'analisi della composizione lipidica di questo organo dato il suo ruolo chiave nel metabolismo. I ratti HFF mostrano un aumento significativo dei livelli di lipidi totali (figura 4A), trigliceridi (Figura 4B) e colesterolo epatici (Figura 4C) rispetto i ratti LF, mentre nessuna variazione è stata riscontrata per il contenuto di ceramidi.

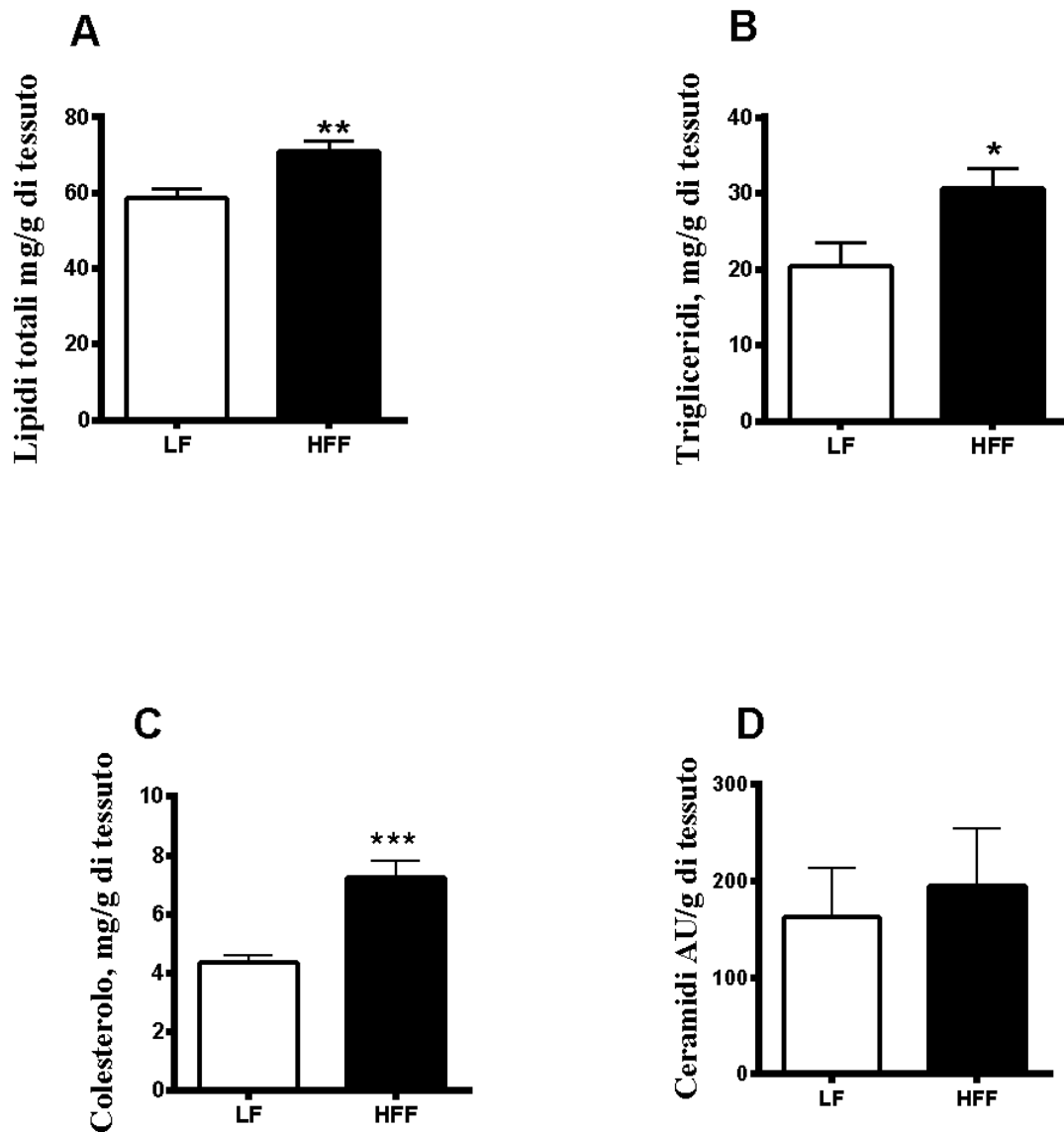


Figura 4. Composizione lipica epatica nei ratti di mezza età nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. I parametri valutati sono lipidi totali (A), trigliceridi (B), colesterolo totale (C) e ceramidi (D). I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparati alla dieta LF (t- test Student non accoppiato a due code).

Lipogenesi de novo

Per ottenere ulteriori informazioni sui possibili meccanismi alla base del bilancio alterato dei lipidi epatici, è stata valutata l'attività dei due enzimi maggiormente coinvolti nella via della lipogenesi de novo, chiamati FAS e SCD, insieme al recettore delle LDL (Figura 5C). Una diminuzione significativa dell'attività della SCD è stata riscontrata in ratti HFF rispetto ai ratti LF (Figura 5B), mentre non è stata trovata alcuna differenza nell'attività della FAS (Figura 5A) e nella quantità di recettore delle LDL (Figura 5C).

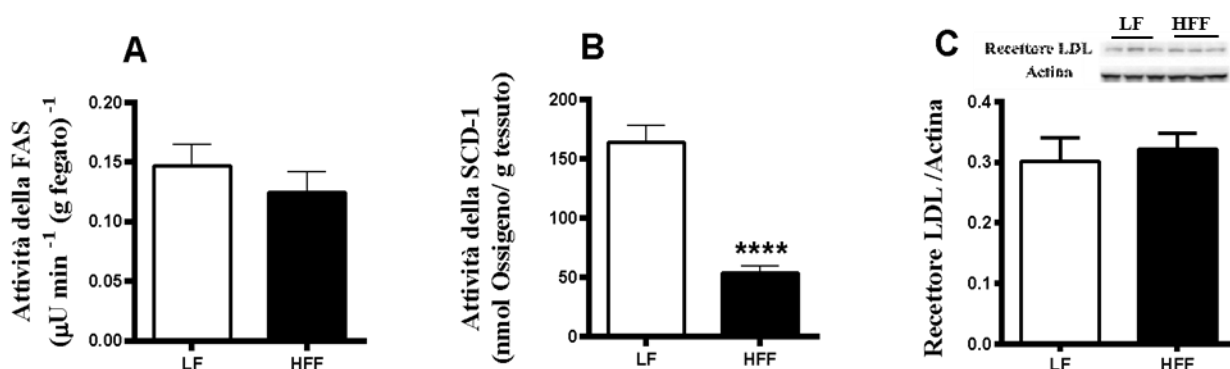


Figura 5. Markers epatici della lipogenesi de novo e recettore delle LDL nei ratti di mezza età nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. **** $p < 0.0001$ comparati alla dieta LF (t- test Student non accoppiato a due code).

Markers di danno ossidativo epatico

La perossidazione lipidica è stata analizzata come marker del danno ossidativo epatico ai lipidi ed è risultata più alta nei ratti HFF rispetto quelli LF, mostrando quindi un aumento del danno ossidativo (Figura 6A) nei ratti HFF. Questo risultato è stato anche confermato dall'analisi dell'attività della NADPH ossidasi, una delle fonti principali di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che è notevolmente più alta in ratti HFF rispetto quelli LF (Figura 6B). In aggiunta l'attività della catalasi, enzima antiossidante, è significativamente diminuita (Figura 6C) mentre quella della SOD, altro enzima antiossidante, risulta aumentata nei ratti HFF (figura 6D).

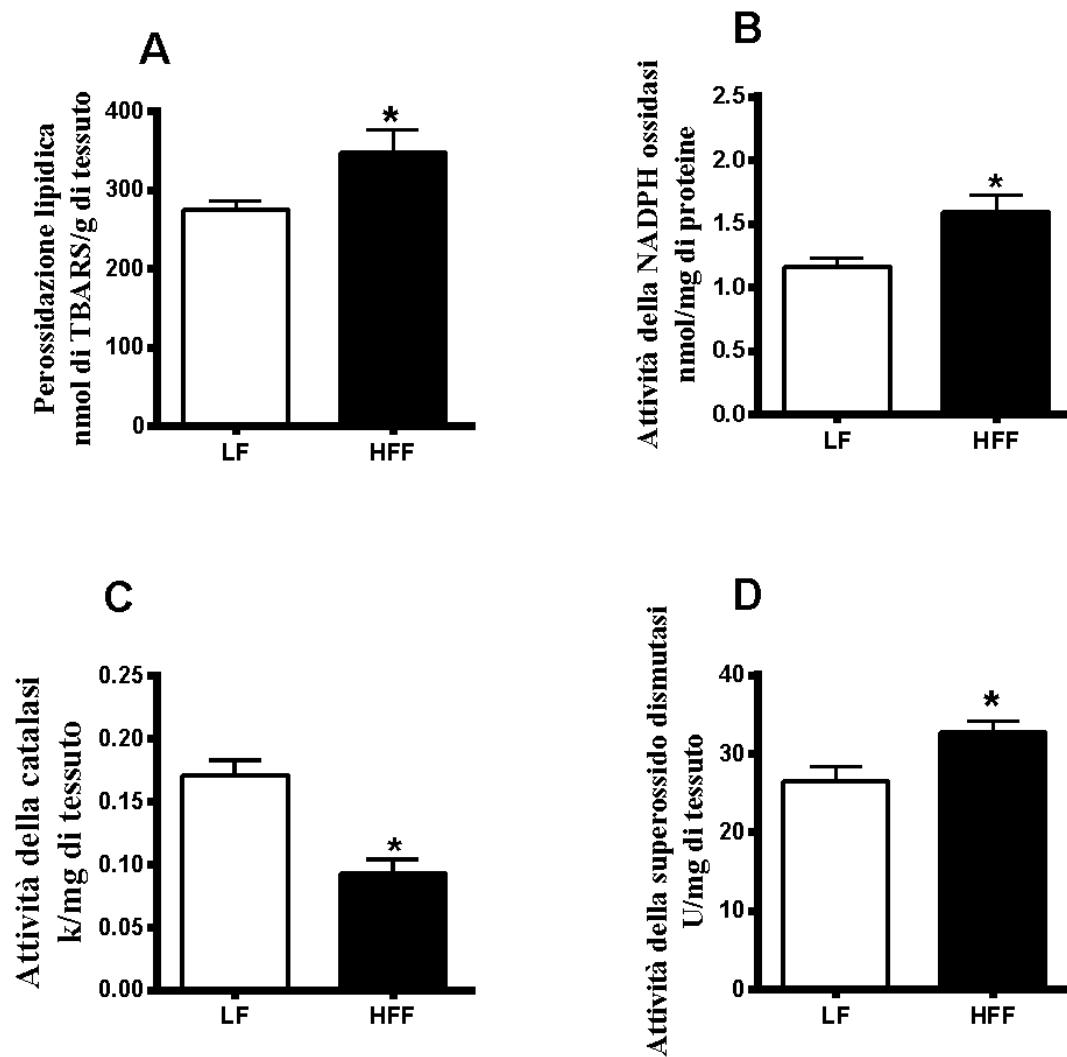


Figura 6. Stato ossidativo nel fegato di ratti di mezza età nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0.05$ comparati alla dieta LF (t- test Student non accoppiato a due code).

Markers di infiammazione epatica

L'attività della MPO è stata usata come marker di infiammazione epatica. Infatti è stato visto che l'attività della MPO, solubilizzata nel tessuto infiammato, è direttamente proporzionale al numero di neutrofili osservati nelle sezioni istologiche (Krawisz et al., 1984). Inoltre, la lipocalina gioca un ruolo chiave nella modulazione della risposta della fase acuta (Zhang et al., 2008). L'attività MPO (Figura 7A) e il contenuto di lipocalina (Figura 7B) così come della citochina infiammatoria TNF- α (Figura 7F) sono significativamente più alte nei ratti HFF (Figura 7B). Inoltre, una significativa diminuzione della quantità di PPAR γ , un noto fattore di trascrizione con attività antinfiammatoria, è stata trovata nel fegato dei ratti HFF (Figura 7D), mentre non è stata trovata alcuna variazione in p-Erk (Figura 7E) e PPAR α (Figura 7C).

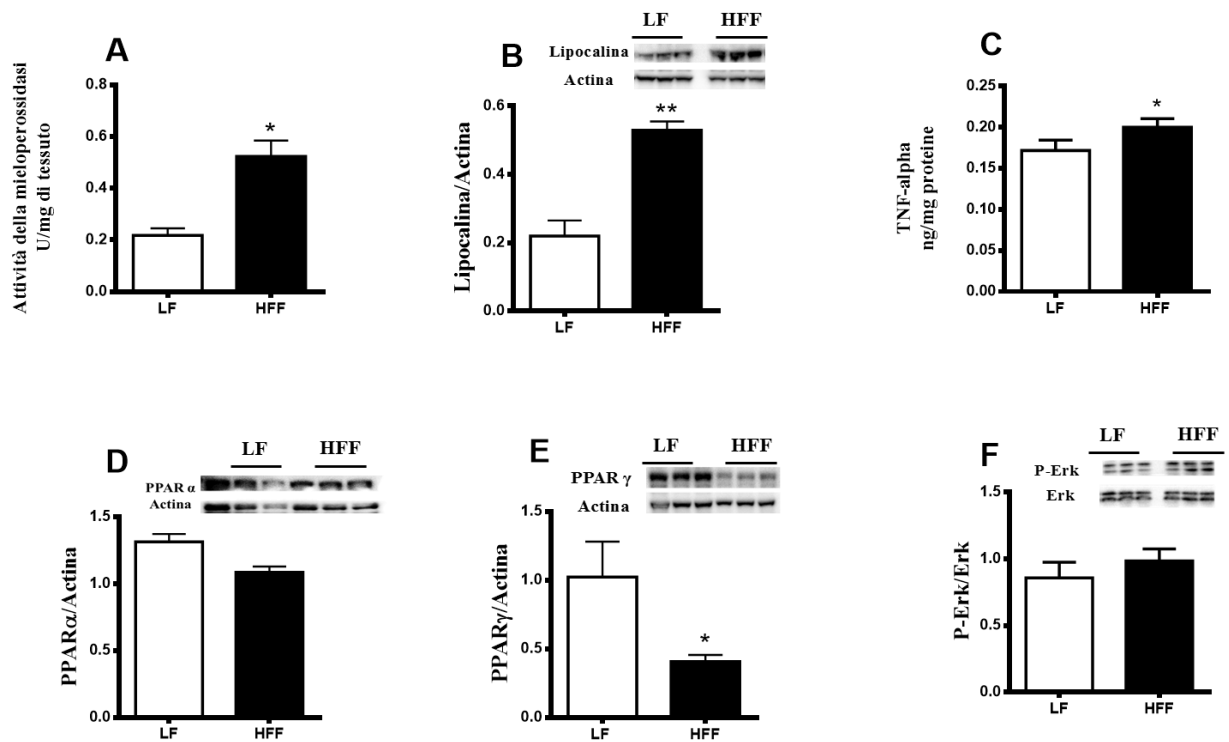


Figura 7. Marcatori di infiammazione nel fegato di ratti di mezza età alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o ad alto contenuto di grassi e ad alto contenuto di fruttosio (HFF) per 4 settimane. Lo stato infiammatorio del fegato è stato valutato misurando l'attività della mieloperossidasi (A), insieme al contenuto proteico di lipocalina (con immagini rappresentative del blot) (B), TNF- α valutato mediante ELISA (C), PPAR α (con immagini rappresentative dei blot) (D) e PPAR γ (con immagini rappresentative dei blot) (E), P-Erk (con immagini rappresentative dei blot) (F). I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ rispetto alla dieta LF (test t di Student non accoppiato a due code). PPAR = recettore attivato dai proliferatori perossisomiali, TNF= fattore di necrosi tumorale.

Funzione epatica mitocondriale

Poiché la condizione di stress ossidativo riscontrata nel fegato potrebbe essere strettamente collegata alla disfunzione dei mitocondri e / o alterazione del livello dei complessi respiratori, è stata effettuata un'analisi di questi organelli (Figura 8). Per quanto riguarda i tassi di consumo di ossigeno mitocondriale è stato riscontrato un aumento significativo della respirazione stimolata da FCCP con succinato come substrato del complesso II nei ratti HFF, mentre tutti gli altri valori non sono stati influenzati in modo significativo (Figura 8 A). Inoltre, una diminuzione significativa di FCF per la respirazione del complesso I è stata trovata nei ratti HFF (Figura 8B). La determinazione parallela della quantità dei vari complessi respiratori ha rivelato un marcato aumento nella quantità del complesso I, mentre non è stata osservata alcuna variazione per gli altri complessi (Figura 8C).

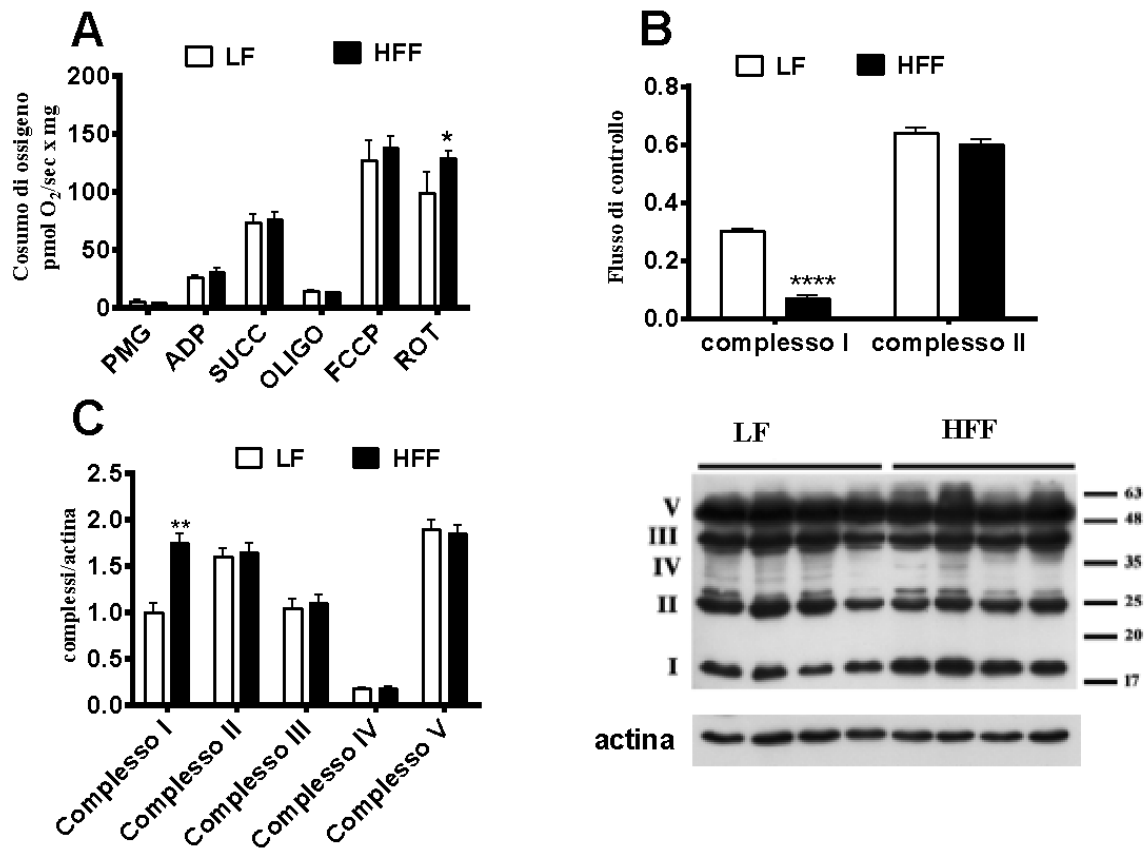
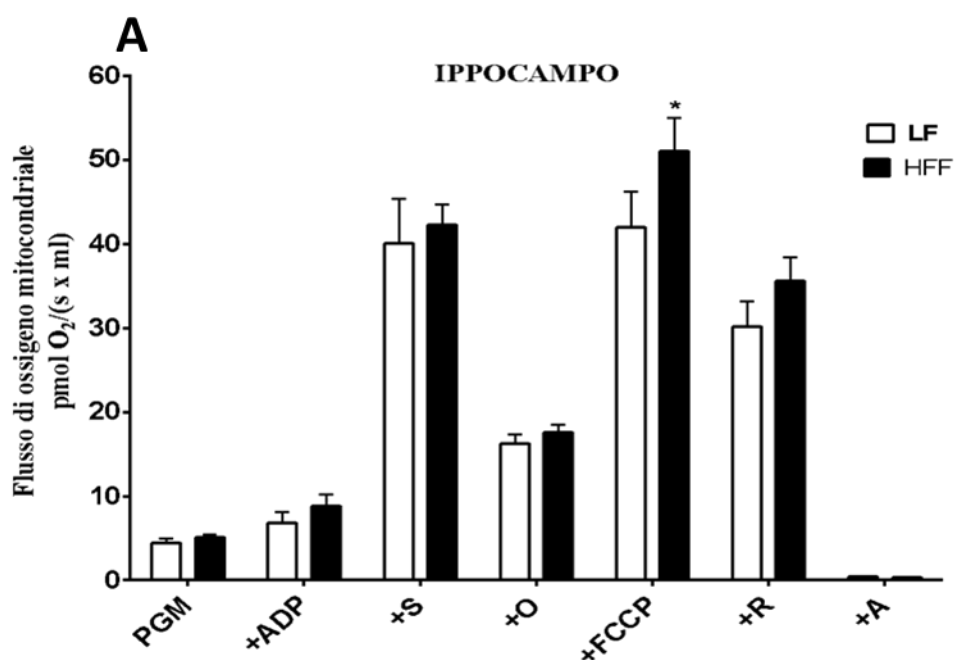


Figura 8. Attività respiratoria (A), fattori di controllo del flusso (B) e contenuto proteico dei complessi respiratori (con immagini rappresentative del blot) (C) nel fegato di ratti di mezza età alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. Respirazione non normalizzata dopo l'aggiunta di malato + piruvato + glutammato (PMG), ADP, succinato (SUCC), oligomicina (OLIGO), FCCP, rotenone (ROT). I valori sono le medie \pm SEM di 8 diversi ratti * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ rispetto alla dieta LF (test t di Student non accoppiato a due code). FCCP carbonil cianuro p-trifluorometossifenilidrazone

Attività mitocondriale nel cervello

Per valutare come questa dieta possa influenzare la funzione mitocondriale cerebrale, sono state effettuate misurazioni sulla catena di trasporto mitocondriale attraverso la metodologia HRR concentrando l'attenzione sulla corteccia prefrontale e sull'ippocampo che sono due regioni cerebrali maggiormente coinvolte nella neurodegenerazione. E' stata anche valutata la quantità dei complessi respiratori I-V nell'ippocampo, per verificare se la significativa variazione dell'attività mitocondriale fosse dovuta a variazioni quantitative dell'espressione proteica dei complessi respiratori. La quantità dei complessi I e II è significativamente ridotta mentre il livello del complesso IV è aumentato nell'ippocampo di ratti che hanno seguito una dieta HFF. Nessuna variazione è evidente nella quantità dei complessi III e V.



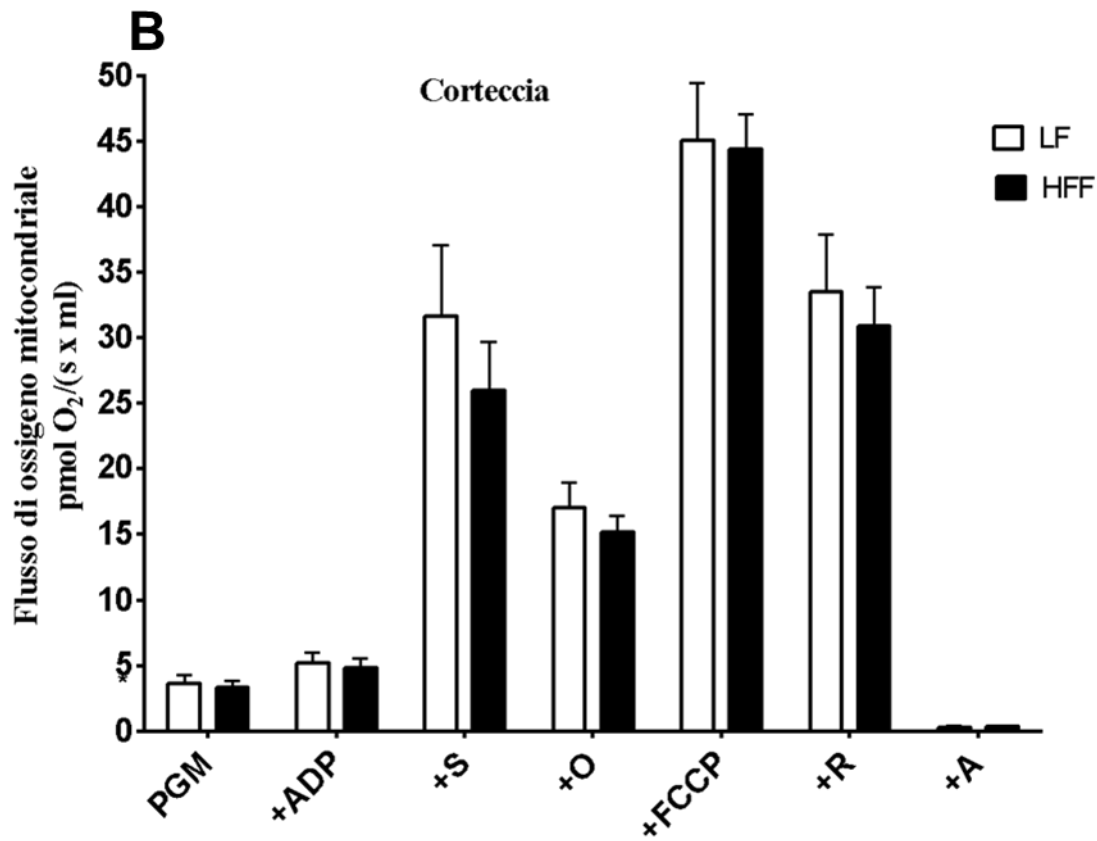


Figura 9. Attività respiratoria nell'ippocampo (A) e nella corteccia prefrontale (B) di ratti di mezza età alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. Respirazione non normalizzata dopo l'aggiunta di malato + piruvato + glutammato (PMG), ADP, succinato (S), oligomicina (O), FCCP, rotenone (R) e antimicina (A). I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0,05$ (test t di Student a due code, spaiato). FCCP carbonil cianuro p-trifluorometossifenilidrazone

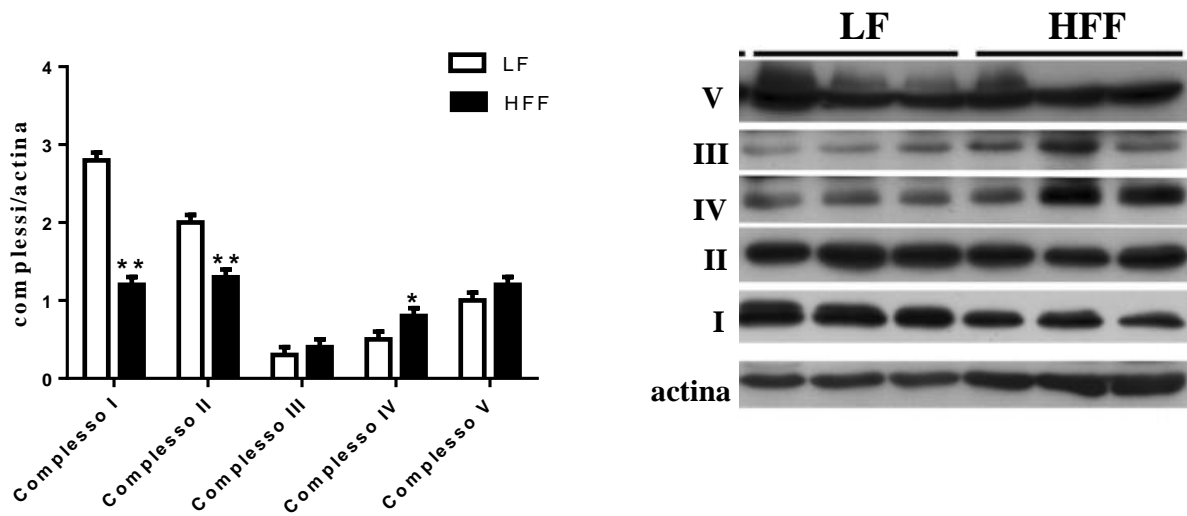


Figura 10. La quantità di complessi mitocondriali I, II, III, IV e V è stata valutata sugli estratti proteici dell'ippocampo di ratti di mezza età nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. I valori sono la media \pm SEM di otto ratti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparati alla dieta LF (t- test Student non accoppiato a due code).

Markers di danno ossidativo in ippocampo e corteccia prefrontale

Poichè è noto da tempo che l'invecchiamento e l'obesità sono associati ad un aumento della produzione di ROS e che qualsiasi fattore che possa indurre un aumento della produzione di ROS può compromettere la funzione mitocondriale e indurre infiammazione, è stato valutato il danno ossidativo analizzando la perossidazione lipidica (Figura 11) e l'attività di due enzimi antiossidanti come la catalasi e la SOD (Figura 12). Nell'ippocampo, la perossidazione lipidica risulta aumentata nei ratti HFF (Figura 11 A) mentre non sono stati trovati cambiamenti significativi nella corteccia prefrontale (Figura 11 B). Allo stesso modo, in entrambi i tessuti l'attività di due enzimi antiossidanti catalasi e superossido dismutasi (SOD) non è stata alterata dal trattamento dietetico (figura 12 A, B, C, D).

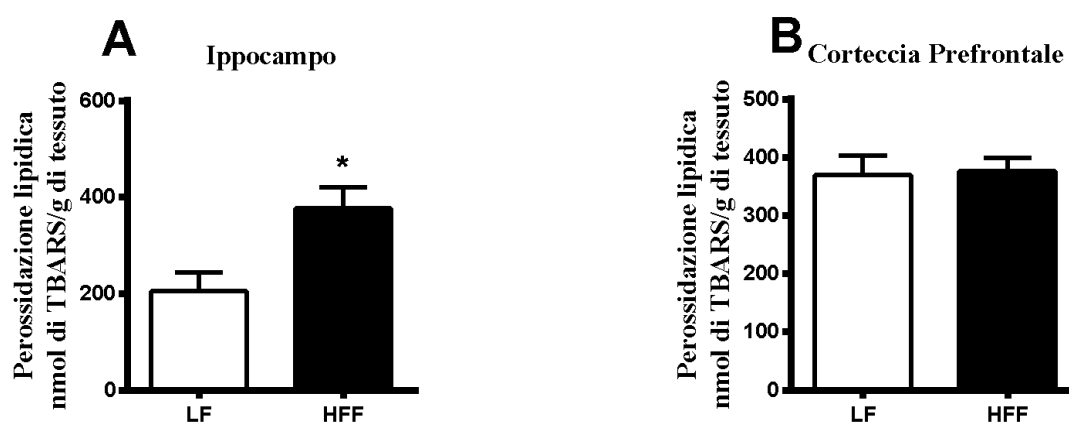


Figura 11. Perossidazione lipidica nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale di ratti di mezza età nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0.05$ comparati alla dieta LF (t-test Student non accoppiato a due code).

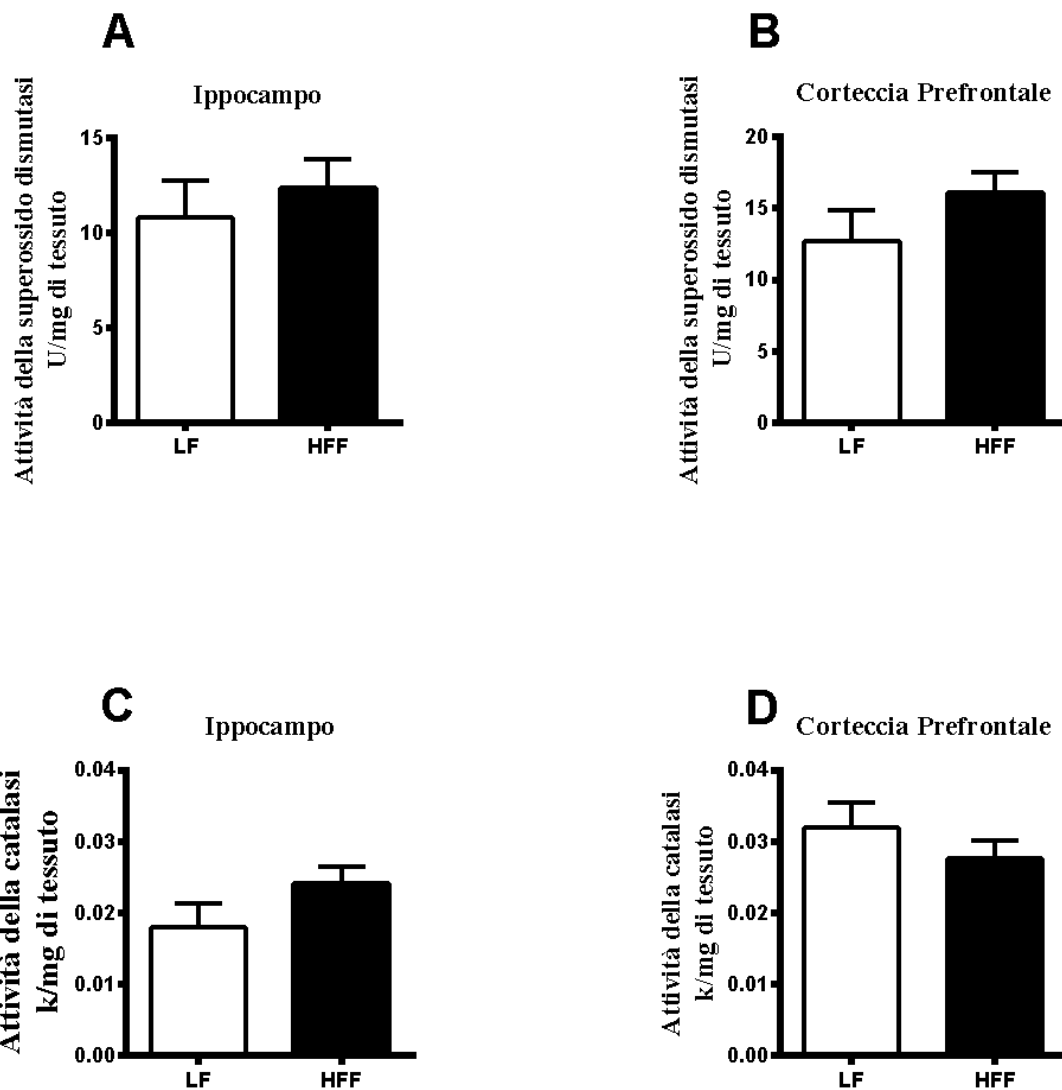


Figura 12. Attività dei due enzimi antiossidanti: superossido dismutasi (A e B) e catalasi (C e D) nell'ippocampo e nella corteccia prefrontale di ratti di mezza età nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF) per 4 settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. (t- test Student non accoppiato a due code).

Espressione proteica di UCP2, PGC-1 α , PPAR α

Poiché l'UCP2 è fondamentale per ridurre la produzione di ROS e il conseguente stress ossidativo (Krauss et al.,2005), giocando così un ruolo neuroprotettivo nel cervello (Barnstable et al.,2016), è stato valutato come la dieta HFF influisce sul livello di questa proteina mitocondriale. La quantità di questa proteina è diminuita significativamente con la dieta HFF in entrambi i distretti cerebrali (Figure 13 A e 14 A). Sono stati valutati anche i livelli proteici di PGC-1 α e PPAR α , un target di PGC-1 α che svolge un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo dell'energia cellulare e nella protezione contro lo stress ossidativo. La quantità di PGC-1 α in ippocampo (Fig. 13 B) e corteccia frontale (Fig. 14 B) è diminuita con il trattamento dietetico. Il contenuto di proteine PPAR α è diminuito significativamente con il trattamento dietetico nell'ippocampo di ratti HFF (Fig. 13 C) mentre nessuna variazione è stata riscontrata nella corteccia prefrontale. La diminuzione di UCP2, PGC-1 α , e PPAR α nell'ippocampo, in accordo con i risultati dell'analisi sia dei marcatori di stress ossidativo che degli enzimi antiossidanti, mostra che la dieta HFF ha un effetto dannoso sul mantenimento dell'omeostasi redox.

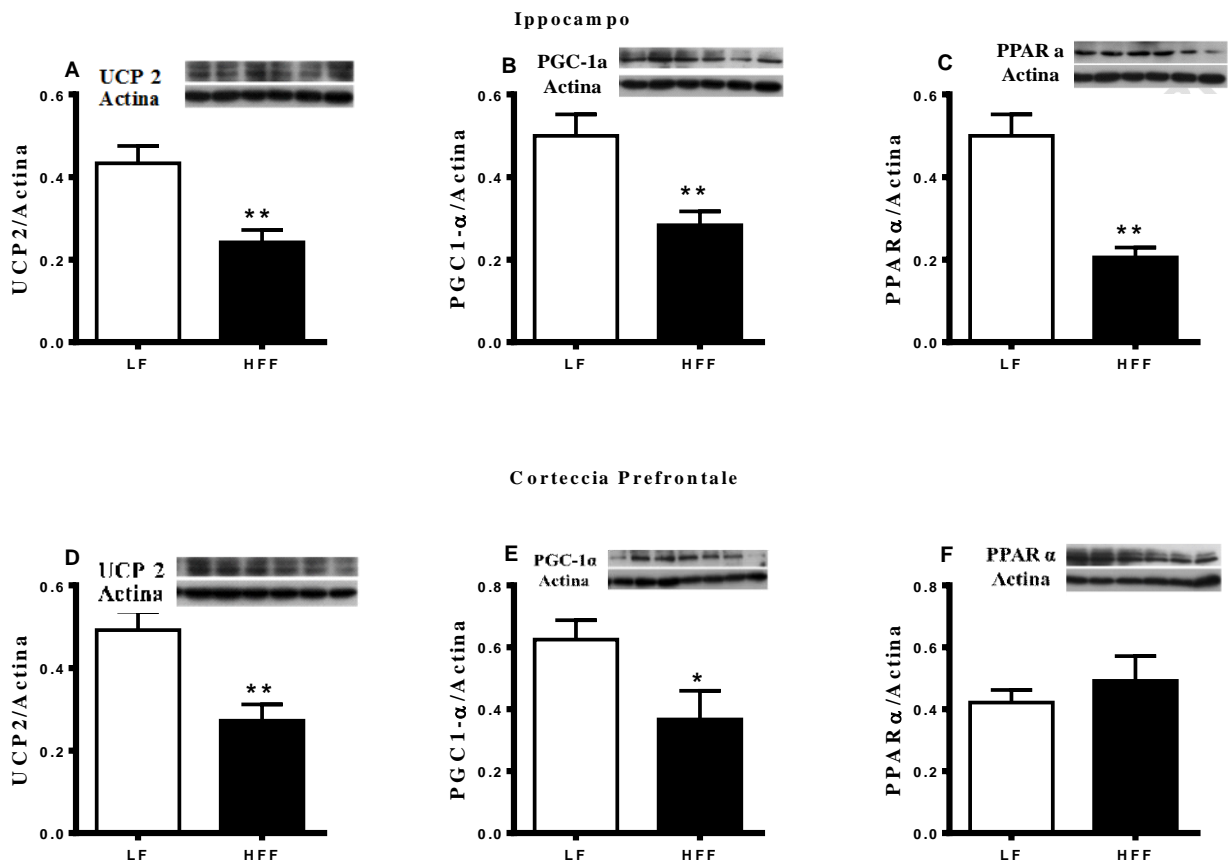


Figura 13. Livelli di UCP2, PGC-1 α e PPAR α nell'ippocampo e corteccia prefrontale. I livelli di UCP2 (A-D), PGC-1 α (B-E) e PPAR α (C-F) sono stati valutati mediante western blot su estratti proteici dall'ippocampo e della corteccia prefrontale di ratti HFF adulti, di mezza età. Sono mostrati i western blot rappresentativi (in basso). È stata eseguita la densitometria quantitativa, sono state calcolate le intensità delle bande e le concentrazioni proteiche sono state espresse rispetto al livello di β -actina (in alto). I dati sono riportati come medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (t- test Student non accoppiato a due code). PPAR- α = recettore alfa attivato da proliferatori perossisomiali, PGC-1 α = coattivatore 1 α del recettore gamma attivato da proliferatori perossisomiali, UCP2= proteina disaccoppiante 2.

Tessuto adiposo bianco (e-WAT)

Le proteine chiave coinvolte nella regolazione della funzione degli adipociti, in particolare la proteina disaccoppiante 2 (UCP2), il recettore alfa attivato da proliferatori perossisomiali (PPAR- α) e il coattivatore 1 α del recettore gamma attivato da proliferatori perossisomiali (PGC-1 α) sono risultati essere diminuiti nei ratti HFF rispetto ai ratti LF (Figura 15).

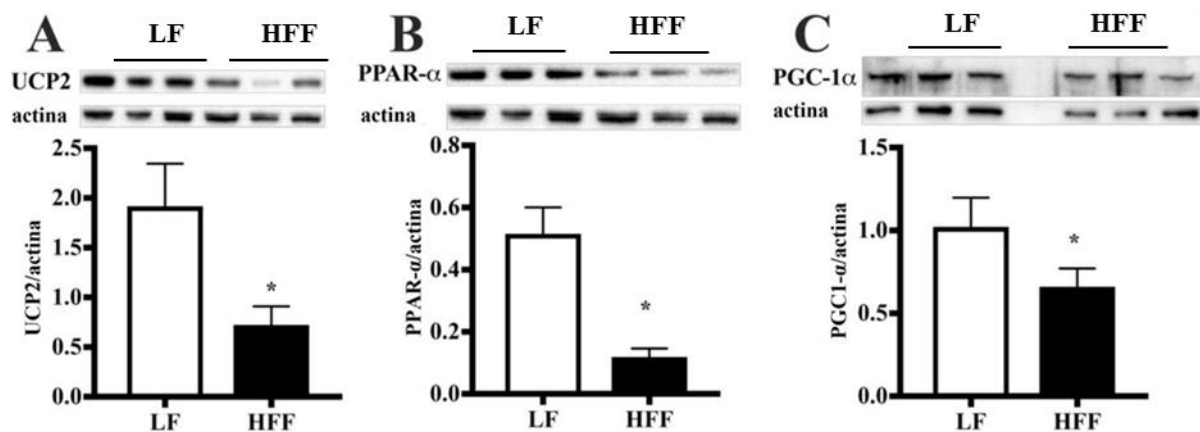


Figura 15. Contenuto proteico (con western blot rappresentativo) di proteina disaccoppiante 2 (UCP2) (A), recettore alfa attivato da proliferatori perossisomiali (PPAR- α) (B) e coattivatore 1 α del recettore gamma attivato da proliferatori perossisomiali (PGC-1 α) (C) nel tessuto adiposo bianco epididimale (e-WAT) di ratti di mezza età alimentati con una dieta di controllo (LF) o ad alto contenuto di grassi e di fruttosio (HFF) per quattro settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0.05$ rispetto ai ratti alimentati con la dieta LF (test t di student non accoppiato a due code)

Markers di infiammazione e-WAT, ippocampo e corteccia prefrontale

Poiché l'aumento dell'assunzione di grassi e fruttosio è associato all'infiammazione sistemica e tissutale (Della Corte et al.,2018), ho voluto verificare se questa risposta fosse stata suscitata dopo il trattamento dietetico. A tal fine, ho valutato i marcatori di infiammazione nel plasma, nel e-WAT e nelle aree cerebrali. Il livello di TNF- α è aumentato in modo significativo nel plasma, nell'e-WAT e nell'ippocampo dei ratti HFF rispetto ai controlli, mentre non è stata trovata alcuna variazione nella corteccia frontale (Figura 16). Inoltre, ho valutato il livello di adiponectina, un'adipochina che svolge un ruolo nella riduzione dello stress ossidativo e della cascata infiammatoria (Esmaili et al.,2014) ed è stato anche segnalato che esercita un effetto neuroprotettivo (Blomer et al.,2018). La quantità di adiponectina è stata trovata significativamente ridotta nel plasma, nell'e-WAT, nell'ippocampo e nella corteccia frontale dei ratti HFF (Figura 17). È stato misurato il livello di aptoglobina e lipocalina, che sono considerati marker sia di infiammazione che di adiposità (Maffei et al.,2016). Come mostrato nella Figura 18, nessuna variazione della concentrazione di lipocalina associata alla dieta è stata rilevata nel plasma, nell'ippocampo e nella corteccia, mentre il contenuto proteico della lipocalina nell'e-WAT è aumentato significativamente nei ratti HFF. Al contrario, il livello di aptoglobina è stato riscontrato aumentato, in seguito alla dieta HFF, nel plasma, nella corteccia frontale e nell'ippocampo, mentre non sono stati rilevati cambiamenti nell'e-WAT (Figura 19).

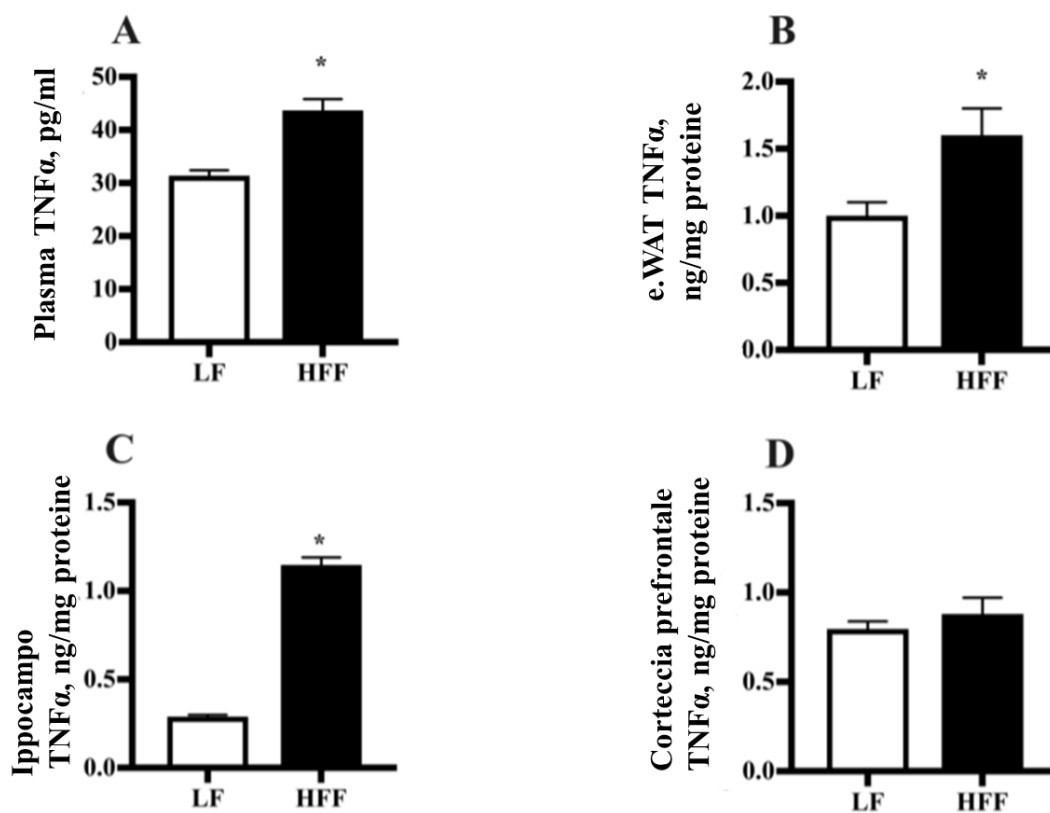


Figura 16. Livelli del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) rilevati da plasma (A), tessuto adiposo bianco epididimale (e-WAT) (B), ippocampo (C) e corteccia prefrontale (D) in ratti di mezzà età alimentati con diete a basso contenuto di grassi (LF) o ad alto contenuto di grassi e alto contenuto di fruttosio (HFF) per quattro settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0,05$ rispetto alla dieta LF (test t di Student non accoppiato a due code)

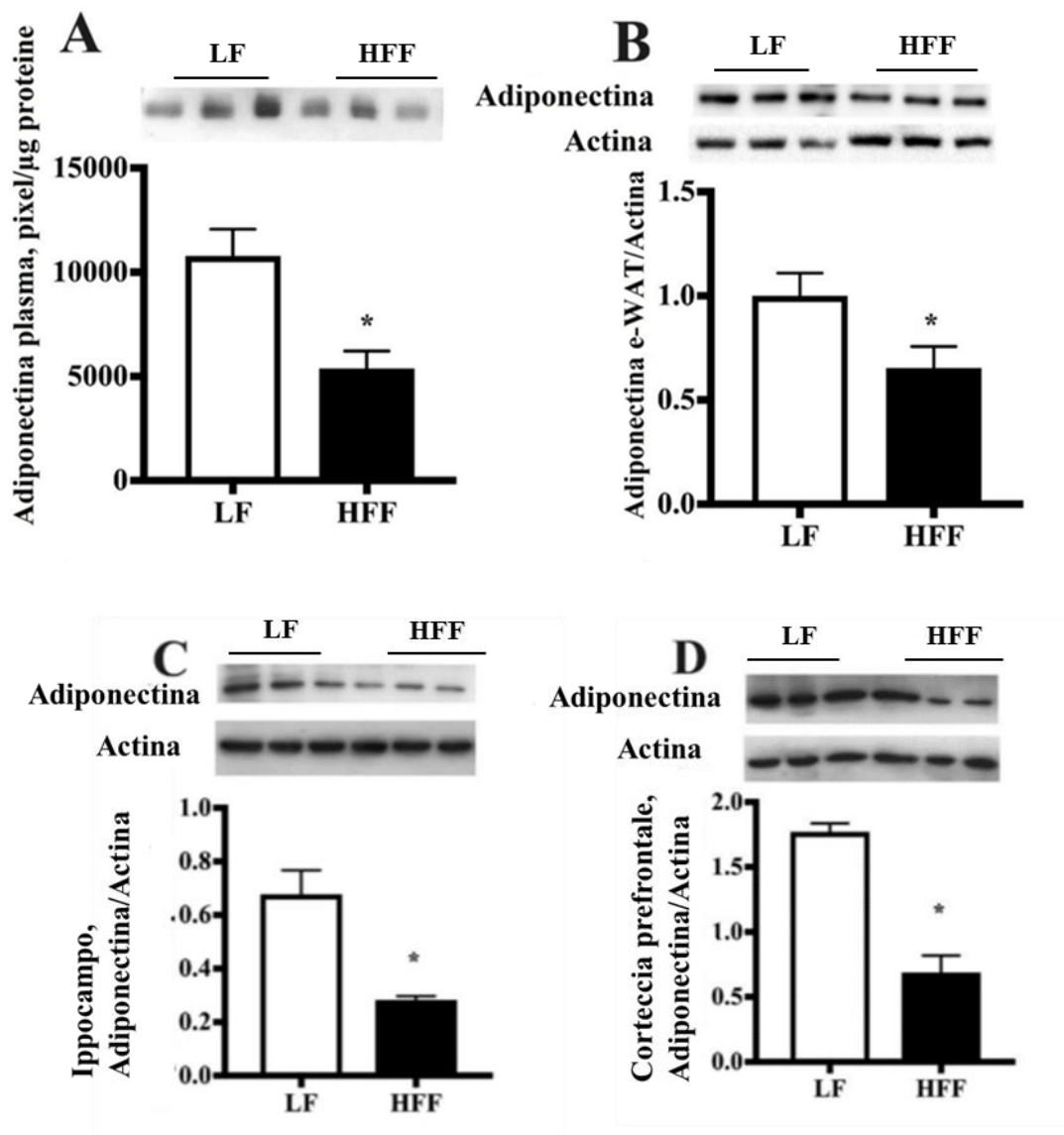


Figura 17. Contenuto proteico (con western blot rappresentativo) dell'adiponectina nel plasma (A), tessuto adiposo bianco dell'epididimo (e-WAT) (B), ippocampo (C) e corteccia frontale (D) da ratti di mezza età alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o ad alto contenuto di grassi e ad alto contenuto di fruttosio (HFF) per quattro settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0,05$ rispetto alla dieta LF (test t di Student non accoppiato a due code).

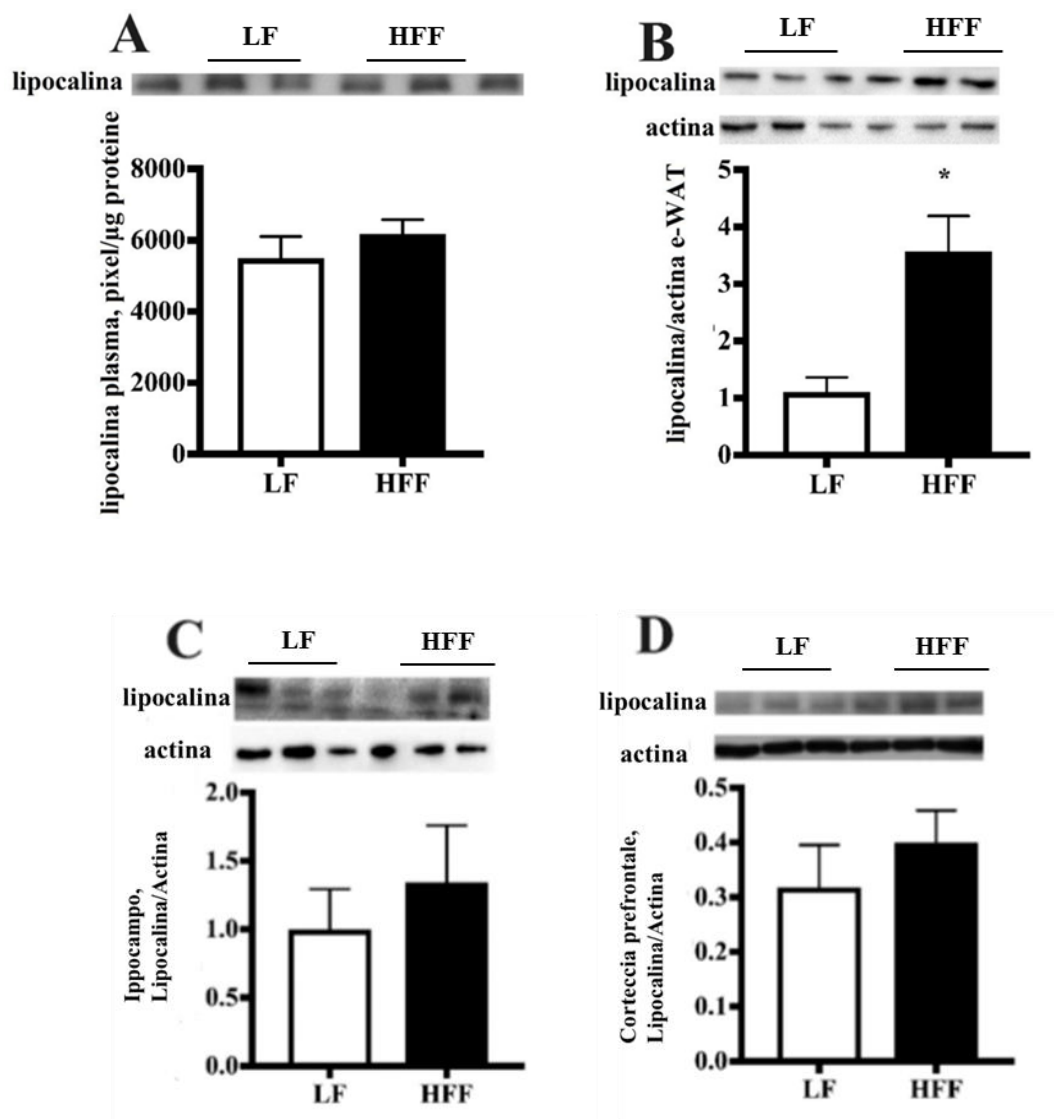


Figura 18 Contenuto proteico (con western blot rappresentativo) di lipocalina nel plasma (A), tessuto adiposo bianco dell'epididimo (e-WAT) (B), ippocampo (C) e corteccia frontale (D) da ratti di mezza età nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o una dieta ricca di grassi e di fruttosio (HFF) per quattro settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0,05$ rispetto alla dieta LF (test t di Student non accoppiato a due code).

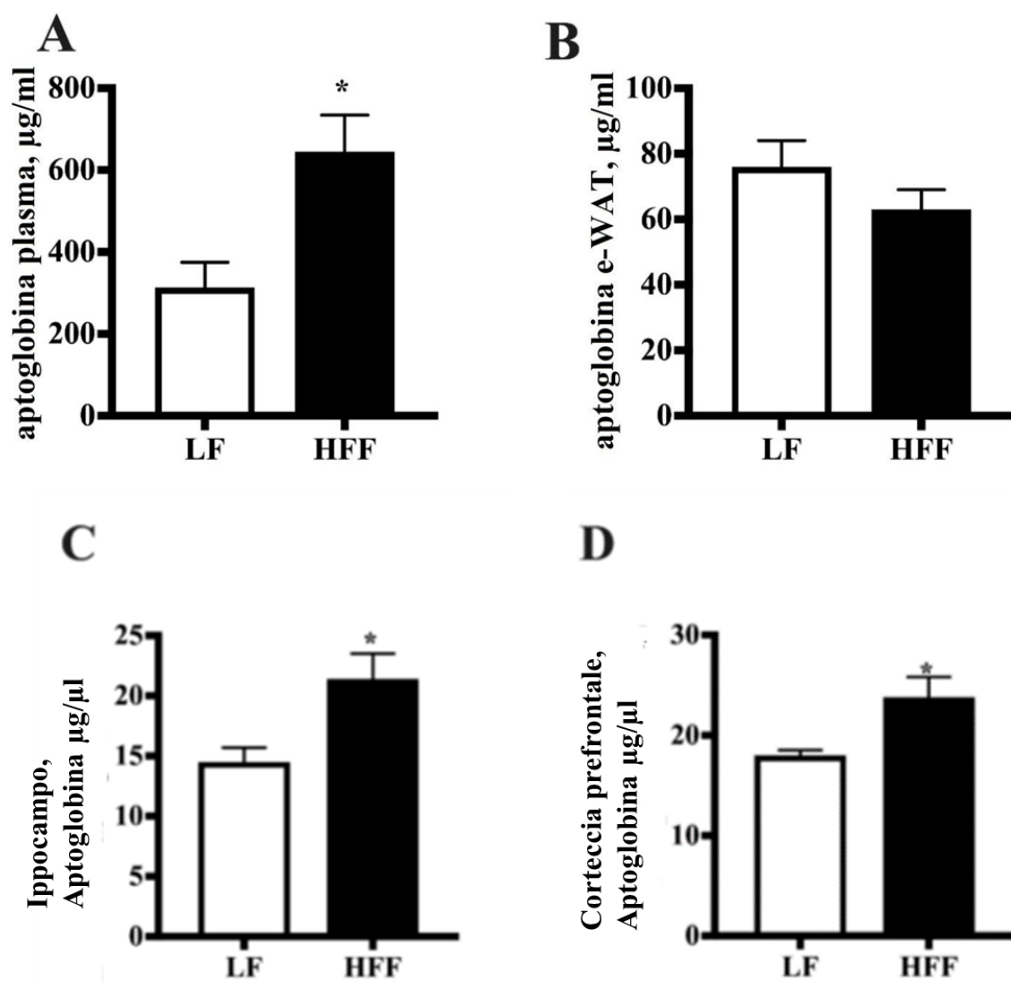


Figura 19. Livelli di aptoglobina rilevati mediante test ELISA nel plasma (A), tessuto adiposo bianco dell'epididimo (e-WAT) (B), ippocampo (C) e corteccia frontale (D) da ratti di mezza età alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o dieta ad alto contenuto di grassi e fruttosio (HFF). I valori sono la media \pm SEM di otto ratti. * $p < 0,05$ rispetto alla dieta LF (test t di Student non accoppiato a due code).

Segnalazione dell'insulina nel e-WAT, ippocampo e corteccia prefrontale

La segnalazione dell'insulina è stata compromessa dalla dieta HFF nell'e-WAT, come mostrato da una significativa riduzione della fosforilazione attivatoria di IRS (Figura 20A), mentre questo effettore non è stato influenzato dalla dieta nell'ippocampo (Figura 20B) e nella corteccia (Figura 20C).

L'analisi degli effettori a valle di IRS, in particolare Akt ed Erk, ha rivelato una compromissione per entrambi gli effettori nell'e-WAT (Figura 21A e 21B). L'attivazione della via Akt ed Erk è stata trovata significativamente ridotta dalla dieta HFF nella corteccia frontale (Figura 21E, F), mentre nell'ippocampo era evidente un aumento significativo dell'attivazione di Erk (Figura 21D), senza variazione nella via Akt (Figura 21C).

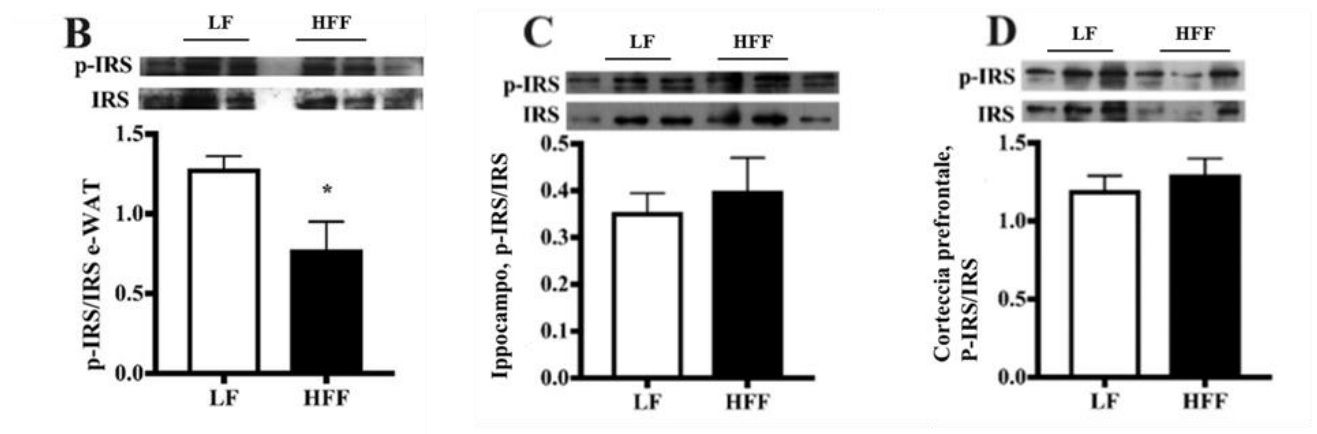


Figura 20. Contenuto proteico (con western blot rappresentativo) del substrato del recettore dell'insulina fosforilato (p-IRS) nel tessuto adiposo bianco epididimale (e-WAT) (A), ippocampo (B) e corteccia frontale (C) in ratti di mezza età alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi (LF) o ad alto contenuto di grassi-alto contenuto di fruttosio (HFF) per quattro settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0,05$ rispetto alla dieta LF (test t di Student non accoppiato a due code).

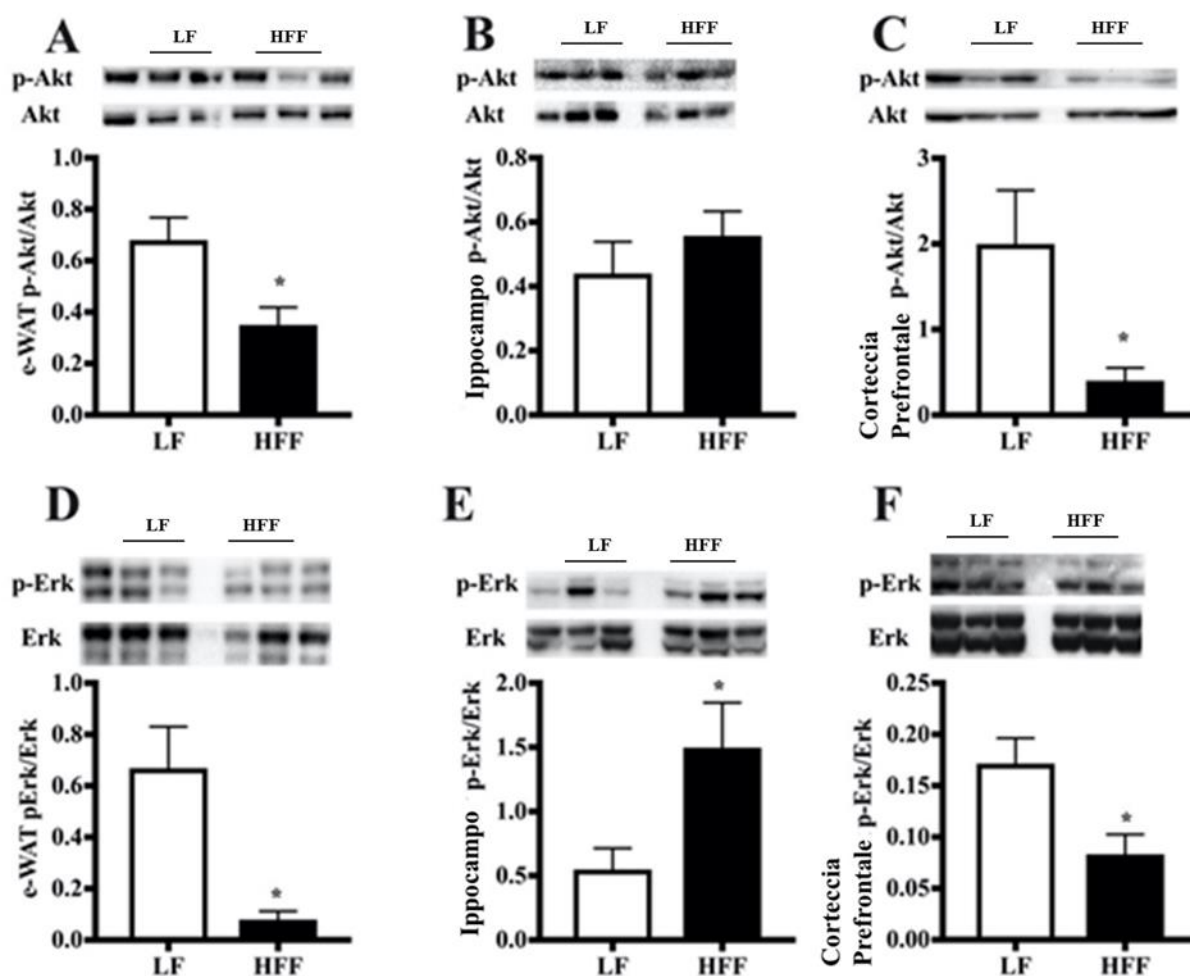


Figura 21. Contenuto proteico (con western blot rappresentativo) di Akt fosforilato (p-Akt) ed Erk (p-Erk) nel tessuto adiposo bianco epididimale (e-WAT) (A, D), ippocampo (B, E) e corteccia frontale (C, F) di ratti di mezza età alimentati con diete a basso contenuto di grassi (LF) o ad alto contenuto di grassi e alto contenuto di fruttosio (HFF) per quattro settimane. I valori sono le medie \pm SEM di otto ratti. * $p < 0,05$ rispetto alla dieta LF (test t di Student non accoppiato a due code).

DISCUSSIONE

La mezza età è uno stadio precoce del processo di invecchiamento, durante il quale possono verificarsi gradualmente cambiamenti fisiologici ed alcune malattie croniche che incideranno sull'età avanzata. Molti studi hanno enfatizzato l'impatto delle diete sull'invecchiamento in modelli animali, ma pochi dati sono disponibili sull'impatto di un'alimentazione ricca di grassi e zuccheri sulle risposte fisiologiche nella mezza età. Nel cercare di tracciare gli eventi molecolari che promuovono lo sviluppo di uno squilibrio metabolico epatico, ho cercato di delineare gli effetti associati alla dieta nella fase iniziale dello sviluppo della patologia. Perciò per il mio studio è stato scelto un periodo di 4 settimane per effettuare un intervento dietetico in ratti di 11 mesi.

Il modello del ratto usato in questa fase sperimentale ricorda molto le abitudini alimentari dei paesi occidentali, e quindi il consumo di una dieta ad alto contenuto di acidi grassi saturi combinati all'elevata assunzione di fruttosio. L'incremento dei livelli plasmatici di trigliceridi e colesterolo LDL confermano che la dieta è stata in grado di indurre alterazioni metaboliche simili a quelle riscontrate negli uomini (Drake et al., 2018).

I ratti HFF mostrano un incremento del 60% nella massa grassa corporea, indicativo dell'obesità, conseguenza dell'aumentata assunzione di grassi e zuccheri. Il guadagno proteico è negativo in ratti di controllo, indicando che i ratti perdono la massa proteica, condizione tipica dell'età avanzata (Dardevet et al., 2000). In aggiunta, il guadagno proteico nei ratti HFF è notevolmente più basso rispetto ai ratti di controllo, dimostrando che la perdita della massa proteica è aggravata dalla dieta HFF. Questa perdita si riflette nel contenuto proteico

corporeo più basso in ratti HFF rispetto quelli LF, sebbene i valori non raggiungano risultati statisticamente significativi. Precedentemente, è stato dimostrato che ratti adulti (90 giorni) nutriti con una dieta HFF mostrano un incremento nel guadagno dei lipidi corporei, mentre il guadagno proteico non è influenzato dalla dieta (Crescenzo et al., 2015). Di conseguenza, sembra che i ratti di mezza età siano metabolicamente più vulnerabili agli effetti della dieta HFF, indicando così che le abitudini alimentari di una popolazione di mezza età sono un fattore critico sul mantenimento della massa magra e di uno stato di benessere. In aggiunta allo squilibrio del metabolismo dei lipidi, la dieta HFF determina insulino-resistenza. Il test di tolleranza al glucosio è alterato e l'indice di resistenza epatica all'insulina è incrementato in ratti HFF. In linea con questo risultato, a livello molecolare, la quantità di Akt fosforilata, forma attiva della chinasi, riscontrata a valle della via di trasduzione dell'insulina, è più bassa in ratti HFF.

Un'altra modifica metabolica trovata in ratti HFF è l'alterazione del profilo lipidico con incremento di trigliceridi, colesterolo totale e colesterolo LDL. In aggiunta, la necrosi degli epatociti (ALT plasmatica) è evidente in questi ratti. Dal momento che il fegato ha un ruolo importante nel metabolismo dei lipidi ed è il sito principale del metabolismo del fruttosio, sono stati valutati gli effetti della dieta HFF su questo organo. In accordo con i risultati precedenti ottenuti in ratti adulti (Crescenzo et al., 2014), ho riscontrato che una dieta HFF suscita un incremento della deposizione di trigliceridi nel fegato, associata ad un aumento del contenuto epatico di colesterolo. L'incremento del contenuto epatico di trigliceridi potrebbe derivare dalla mancata inibizione della lipogenesi de novo nel fegato, che solitamente avviene in seguito all'assunzione di diete ad alto

contenuto di grassi, per contrastare l'aumento dei lipidi provenienti dall'alimentazione (Crescenzo et al., 2012). La risposta metabolica è in linea con i precedenti risultati ottenuti nel fegato di ratti adulti dopo 2 settimane di dieta HFF (Crescenzo et al., 2014). Allo stesso modo la diminuzione dell'attività dell'SCD è in accordo con studi precedenti (Crescenzo et al., 2014) e con quelli che dimostrano che il fegato grasso, indotto dalla dieta, è associato con la down-regolazione della trascrizione epatica di SCD e la de-dimerizzazione della proteina sintetizzata in un modello di ratto (Fernández et al., 2013). È interessante notare che la bassa attività epatica di SCD è associata con il fegato grasso e l'insulino-resistenza in uomini obesi (Stefan et al., 2008). Per far luce sul possibile meccanismo alla base dell'incremento del contenuto epatico di colesterolo in ratti HFF, ho analizzato il recettore delle LDL nel fegato, ma non ho riscontrato cambiamenti significativi, escludendo così che questa proteina, che ha un ruolo importante nella captazione delle lipoproteine (Mensenkamp et al., 2001), sia coinvolta in questo processo. Si può ipotizzare che la down-regolazione dell'attività di SCD trovata in ratti HFF può avere un ruolo nell'aumento del colesterolo epatico. Infatti, la SCD sintetizza acidi grassi monoinsaturi, principalmente acido palmitoleico ed oleico, che sono gli acidi grassi più utilizzati per la formazione di esteri del colesterolo per la loro inclusione nelle VLDL (Ntambi et al., 2004). Così è possibile che l'eccesso di colesterolo nel fegato proveniente dalla dieta è solo parzialmente esportato, mentre la porzione maggiore rimane nel fegato.

La dieta HFF è associata anche all'aumento dello stress ossidativo epatico. Lo stress ossidativo si verifica quando aumenta la produzione di ROS o si verifica una diminuzione delle difese antiossidanti. Un fattore che potenzialmente

influisce sull'incremento dello stress ossidativo è la diminuzione significativa della catalasi, enzima antiossidante. Tra i siti cellulari coinvolti nella produzione di ROS, i mitocondri svolgono un ruolo di primo piano. Pertanto, ho studiato la funzione respiratoria epatica dei mitocondri e ho trovato una compromissione indotta dalla dieta nella respirazione guidata dal complesso I, associata a un aumento compensativo della quantità di complesso I. Va notato che è stata trovata in precedenza una significativa diminuzione della respirazione legata al complesso I nei ratti giovani (30 giorni di età) dopo 30 giorni di una dieta ricca di lipidi (Iossa et al., 2000). Pertanto, è possibile che, indipendentemente dall'età degli animali, si verifichi un danno ossidativo nello specifico al complesso mitocondriale I nel fegato a seguito all'assunzione di una dieta ricca di lipidi. In accordo con questo suggerimento, è stato riscontrato che l'attività epatica del complesso mitocondriale I è specificamente ridotta a seguito di un'alimentazione ricca di grassi (Garnol et al., 2014) e questo complesso è più sensibile al danno ossidativo rispetto agli altri. Una fonte principale della produzione di ROS è l'enzima NADPH ossidasi. L'aumento significativo di questo enzima trovato in ratti HFF è indicativo dell'incremento della produzione di ROS attraverso questo pathway. Infatti, la NADPH ossidasi è un complesso multiproteico, che può causare lo stress ossidativo riducendo l'ossigeno molecolare a superossido e perossido di idrogeno. È stato suggerito un ruolo per la NADPH ossidasi nella patogenesi della steatosi epatica, sulla base dei risultati ottenuti su topi con deficienza di NADPH-ossidasi che sono resistenti alla fibrosi epatica (De Minicis et al., 2010). In aggiunta è stato dimostrato che sia l'espressione genica delle componenti molecolari dell'NADPH ossidasi e l'attività enzimatica sono incrementate nel fegato di topi alimentati con una dieta ricca di lipidi (García-

Ruiz et al., 2014) e la produzione di ROS attraverso questa via è stata trovata aumentata in ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di acidi grassi e fruttosio (Feillet-Coudray et al., 2019). Va sottolineato che una serie di fattori può stimolare l'attività della NADPH ossidasi, compresi gli acidi grassi saturi (García-Ruiz et al., 2015) e il TNF- α (Cheranov et al., 2016).

L'aumento dello stress ossidativo nel fegato di ratti HFF è accompagnato da un aumento dei marcatori di infiammazione, come l'attività della mieloperossidasi e il contenuto di lipocalina e della citochina infiammatoria TNF- α . Inoltre, il contenuto della proteina PPAR γ è marcatamente ridotto nei ratti HFF, quindi probabilmente contribuendo all'infiammazione del tessuto, considerato il ruolo antinfiammatorio di questo fattore di trascrizione (Silva et al., 2018). E'interessante l'aumento della lipocalina epatica, poiché questa proteina, la cui fonte principale è il fegato (Sultan et al., 2012), è attualmente considerata un marker di obesità (Wang et al., 2007), oltre ad avere un ruolo chiave nella modulazione della risposta della fase acuta (Liu et al., 1995). È stata osservata una marcata sovra regolazione della lipocalina nel fegato in parallelo con la funzione mitocondriale alterata e aumento dell'infiammazione dopo 4 settimane di una dieta ricca in fruttosio (Alwahsh et al., 2014); quindi, si può suggerire che l'aumento della lipocalina epatica trovato nei ratti HFF sia dipendente dall'elevato contenuto di fruttosio della dieta.

Per quanto riguarda l'ippocampo, è stata evidenziata un aumento della capacità respiratoria massima misurando i tassi di respirazione in presenza di substrati dei complessi I e II e FCCP, escludendo così la regolazione esercitata dal complesso

ATP sintasi. Tenendo conto dei dati relativi alla quantità dei diversi complessi respiratori, si può osservare una diminuzione dei complessi I e II accompagnata da un aumento del complesso IV. Questo risultato suggerisce che il complesso IV esercita un elevato controllo sulla respirazione mitocondriale quando entrambi i substrati dei complessi I e II vengono ossidati senza il controllo dell'ATP sintasi, in accordo con i risultati precedenti (Davey et al., 1996). Diversi studi hanno riportato alterazioni nell'attività degli enzimi della catena respiratoria in animali alimentati con una dieta ricca di grassi, ma sono stati ottenuti risultati incoerenti, poiché è stato dimostrato che queste attività enzimatiche diminuiscono, rimangono invariate o addirittura aumentano (Franko et al., 2014). In effetti, le conseguenze bioenergetiche della dieta ricca di grassi dipendono fortemente dalla fonte di grasso, dalla durata del trattamento, dalla specie o dal ceppo di roditori o dall'età iniziale (Kakimoto et al., 2016)

È interessante notare che nei ratti di mezza età il regime alimentare consistente in assunzione di alto contenuto di grassi e fruttosio non esercita un forte effetto sulla funzionalità mitocondriale né sulla quantità dei complessi respiratori nella corteccia prefrontale, mentre era stato precedentemente riscontrato in ratti adulti che solo 2 settimane di una dieta ricca in fruttosio erano in grado di indurre una diminuzione della funzionalità mitocondriale nell'ippocampo (Cigliano et al., 2018). È quindi possibile che, contrariamente a quanto generalmente si crede, gli stimoli del trattamento sono più dannosi per i mitocondri durante l'età adulta che nella mezza età.

Il processo di invecchiamento, così come l'insorgenza dell'obesità, sono da lungo tempo noti per essere associati all'accumulo di ROS. Qualunque fattore di stress, in grado di aumentare la produzione di ROS e di superare i sistemi antiossidanti

cellulari, compromette la funzione bioenergetica dei mitocondri, alterando il ciclo dell'acido tricarbossilico e la catena respiratoria con ulteriore produzione di ROS. Questo innesca un circolo vizioso che aggrava progressivamente lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale (Grimm et al., 2017). Ancora una volta, l'ippocampo mostra una maggiore propensione agli insulti metabolici, con danno ossidativo ai lipidi. L'aumento indotto dalla dieta HFF del danno ossidativo è concomitante a una significativa riduzione della quantità di UCP2, in accordo con il fatto che questa proteina protegge i neuroni riducendo la produzione di radicali liberi (Lu et al., 2014). Nel complesso, dunque, nei ratti di mezza età, la dieta HFF provoca una condizione di stress ossidativo nell'ippocampo, anche in assenza di marcati cambiamenti dei mitocondri.

Per caratterizzare meglio i cambiamenti nello stato redox indotti nel cervello da una dieta ricca di grassi/zuccheri, ho analizzato i livelli proteici di PGC-1 α e PPAR α , che è un bersaglio di PGC-1 α . In effetti, è noto che PGC-1 α sia coinvolto nella regolazione dei geni che proteggono le cellule neuronali dallo stress ossidativo, come la superossido dismutasi mitocondriale (St-Pierre et al., 2006). Inoltre, è stato suggerito che PPAR α giochi un ruolo nel controllo della plasticità sinaptica nei neuroni dell'ippocampo nel sistema nervoso centrale (Roy et al., 2015). In accordo con precedenti studi sulla diminuzione di PGC-1 α indotta da una dieta ad elevato contenuto di grassi nel cervello (Morselli et al., 2016), la dieta HFF induce una compromissione di questi meccanismi difensivi, poiché PGC-1 α (nell'ippocampo e nella corteccia frontale) e i livelli di PPAR α (nell'ippocampo) sono notevolmente diminuiti.

È stato dimostrato che il rischio di disfunzione cerebrale è aumentato nei soggetti in sovrappeso o obesi (Anstey et al., 2011). I meccanismi sottostanti non sono

definiti con precisione, ma l'obesità è stata associata a diversi processi relativi all'accelerazione dell'invecchiamento, tra cui lo stress ossidativo e l'infiammazione (Bhat, 2010). Il legame tra obesità e malattie cerebrali può essere ulteriormente chiarito studiando l'alterazione della fisiologia del tessuto adiposo. In effetti, è stato suggerito che le molecole rilasciate o prodotte dal tessuto adiposo potrebbero essere il legame molecolare tra obesità e disfunzione cerebrale (Parimisetty et al., 2016). Infatti, l'espansione del tessuto adiposo porta all'infiammazione locale e al rilascio di citochine e adipochine nella circolazione sistemica, che a loro volta potrebbero contribuire alla patogenesi dei disturbi cerebrali (Sutinen et al., 2012). Poiché questo problema non è stato approfondito, ho cercato di studiare l'effetto di una dieta western a breve termine sui marker funzionali del tessuto adiposo bianco, su marcatori funzionali e la loro possibile somiglianza con i cambiamenti in due aree cerebrali critiche per l'apprendimento e la memoria, vale a dire l'ippocampo e la corteccia frontale. La fenotipizzazione metabolica dei ratti di mezza età ha evidenziato gli effetti deleteri della dieta HFF, con l'aumento del peso assoluto e relativo dell'e-WAT. Questo deposito adiposo è tra i cuscinetti di grasso più grandi e facilmente accessibili nel ratto (Chusyd et al., 2016), ed è stato dimostrato che raggiunge la sua massima espansione prima (dopo 4 settimane di alimentazione ad alto contenuto di grassi) rispetto ad altri depositi di tessuto adiposo (Guo et al., 2013). L'espansione dell'e-WAT nei ratti HFF è ben correlata con l'aumento dell'introito calorico durante le prime due settimane e con la diminuzione nel contenuto delle proteine chiave coinvolte nella regolazione del funzionamento degli adipociti, vale a dire UCP2, PPAR- α e PGC-1 α . In effetti, PPAR- α e PGC-1 α svolgono un ruolo centrale nella regolazione metabolica nel tessuto adiposo (Cheng et al., 2018). Inoltre, l'UCP2 può

influenzare il metabolismo sistemico regolando il rilascio di adipochine da parte di questo tessuto (Chevillotte et al., 2007). È interessante notare che la stessa diminuzione di UCP2, PPAR- α e PGC-1 α è stata osservata anche nell'ippocampo e nella corteccia. La dieta HFF ha provocato resistenza all'insulina non solo a livello sistemico, ma anche nell'e-WAT, dove gli effettori a valle della segnalazione dell'insulina (IRS, Akt ed Erk) erano meno attivati nei ratti HFF, suggerendo così una condizione di resistenza all'insulina in questo tessuto. Nei ratti HFF è stata trovata anche infiammazione sistemica, come dimostrato dall'aumento dei livelli plasmatici di TNF- α e aptoglobina, che è una delle proteine più rappresentate della fase acuta. Allo stesso modo, l'e-WAT dei ratti HFF ha mostrato un aumento del contenuto di TNF- α , in accordo con la frequente associazione tra insulino-resistenza e infiammazione (Shoelson et al., 2007). L'aumento è rilevante e potrebbe essere alla base dell'aumentato del contenuto di lipocalina trovato nell'e-WAT di questi animali. In effetti, l'espressione della lipocalina negli adipociti è regolata dall'obesità e dal TNF- α e può, a sua volta, indurre resistenza all'insulina (Yan et al., 2007). In linea con lo stato infiammatorio sistemico e adiposo, è stata evidenziata una condizione di infiammazione cerebrale in risposta alla dieta HFF. Un aumento associato alla dieta di TNF- α è stato osservato nell'ippocampo e il livello di aptoglobina è stato trovato più alto sia nell'ippocampo che nella corteccia frontale dei ratti HFF. Finora non sono disponibili dati sui cambiamenti dell'aptoglobina nel cervello di ratti di mezza età associati alla dieta. L'aumento dell'aptoglobina cerebrale potrebbe rappresentare un meccanismo protettivo contro la condizione di maggiore stress ossidativo riscontrato nell'ippocampo, a causa della sua ben nota attività antiossidante (Maresca et al., 2015).

L'analisi dei cambiamenti dell'adiponectina mostra una diminuzione in e-WAT. Questo risultato è in buon accordo con i più bassi livelli delle proteine UCP2 e PPAR- α , poiché è stato dimostrato che l'espressione dell'adiponectina è regolata tramite PPAR- α (Goto et al., 2011) e UCP2, che controlla l'espressione genica dell'adiponectina nel tessuto adiposo (Maresca et al., 2015). È stata osservata anche una riduzione dell'adiponectina associata alla dieta sia nell'ippocampo che nella corteccia frontale. L'adiponectina può entrare nel cervello passando attraverso la barriera emato-encefalica (Thundyil et al., 2012). Quindi, il tessuto adiposo potrebbe essere la fonte di adiponectina cerebrale, anche se è stato segnalato che l'adiponectina viene prodotta anche nel cervello (Wilkinson et al., 2007).

Vale la pena ricordare che, oltre al suo ruolo nel miglioramento della sensibilità all'insulina e nella modulazione del metabolismo dei lipidi e dei carboidrati, è stato riportato anche che l'adiponectina influenza la neurogenesi, le sinapsi dell'ippocampo e la plasticità sinaptica (Zhang et al., 2016). Inoltre, esistono prove evidenti a sostegno degli effetti neuroprotettivi dell'adiponectina nelle colture cellulari e nei modelli animali (Letra et al., 2017). Pertanto, la riduzione dell'adiponectina nell'e-WAT potrebbe contribuire all'alterazione del funzionamento del cervello.

Lo stato infiammatorio potrebbe contribuire all'insorgenza di insulino-resistenza cerebrale, tuttavia, cosa interessante, non è stata riscontrata un'alterazione nell'attivazione dell'IRS. È quindi possibile che la dieta HFF, somministrata per sole 4 settimane, sia in grado di indurre insulino-resistenza nel tessuto adiposo, nonché infiammazione cerebrale e stress ossidativo, ma non comprometta la risposta all'insulina nel cervello. L'aumentata attivazione della via Erk

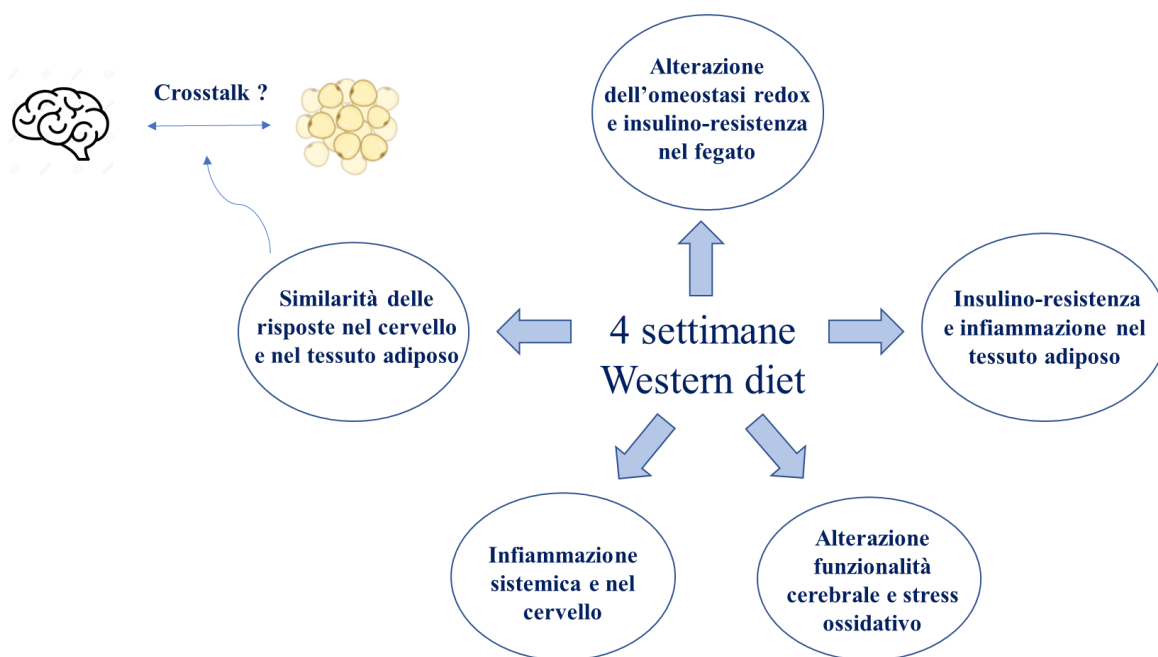
nell'ippocampo potrebbe essere considerata come un marker di danno di quest'area del cervello. In effetti, l'attivazione di Erk sembra giocare un ruolo attivo in diversi modelli di morte neuronale, come il danno neuronale mediato da iperglicemia (Zhang et al., 2007) o la morte neuronale indotta da β -amiloide (Frasca et al., 2008). D'altra parte, la corteccia prefrontale è differentemente interessata e la diminuzione dei percorsi Akt ed Erk è probabilmente dovuta alla compromissione di altri meccanismi, inclusa la segnalazione delle neurotrofine, poiché sia Akt che Erk sono all'incrocio di diverse vie intracellulari.

Si evince dunque che il tessuto adiposo sia fortemente influenzato dalla dieta HFF, e che vengano innescati in tale tessuto i principali danni metabolici connessi all'obesità, nonostante la breve durata del trattamento dietetico. Queste condizioni di alterata funzionalità metabolica potrebbero a loro volta andare ad influenzare negativamente la funzionalità cerebrale e quindi rappresentare il nesso molecolare tra obesità e disfunzione cerebrale.

Presi nel loro insieme, questi risultati forniscono la prova che ratti di mezza età mostrano una suscettibilità ad una dieta Western a breve termine, esibendo un'alterata omeostasi redox ed insulino-resistenza nel fegato, infiammazione e insulino-resistenza nel tessuto adiposo e alterazione cerebrale, con l'ippocampo che si presenta come una regione maggiormente suscettibile ad una compromissione metabolica rispetto alla corteccia prefrontale. Studi futuri rivolti alla risposta di una dieta ad alto contenuto di grassi e di fruttosio in ratti giovani, rispetto quelli di mezza età, consentiranno di approfondire ulteriormente l'interazione tra età e dieta oltre a verificare l'ipotesi di un nesso tra obesità e disfunzioni cerebrali. Inoltre, I dati presentati indicano che le risposte alla dieta HFF sono simili nel tessuto adiposo e nel cervello per molti (UCP2, PPAR- α ,

PGC-1 α , TNF- α , adiponectina), ma non tutti i marcatori analizzati (i.e., l'insulino-resistenza insorta nell'e-WAT ma non nel cervello, o la lipocalina e l'aptoglobina, i cui livelli non sono modificati nel cervello o nell'e-WAT, rispettivamente). Se questa similarità di risposta sia dovuta ad un "crosstalk" tra le due aree o se esse siano interconnesse tramite un terzo elemento è al momento ignoto e sicuramente questa rappresenta un'importante area di studio per esperimenti futuri.

Figura 22. Effetti di 4 settimane di "western diet" in ratti di mezza età.



BIBLIOGRAFIA CITATA

- Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, Diehl AM. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research N. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore MD)* 51: 1961–1971, 2010
- Abdul-Ghani MA, Matsuda M, De Fronzo RA (2008). Strong association between insulin resistance in liver and skeletal muscle in non-diabetic subjects. *Diabet Med* 25(11):1289-94.
- Abdullah A, Peeters A, de Courten M, Stoelwinder J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;89(3):309-19
- Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol.* (2008) 22(5):1023-31
- Akbaraly, T. N., Singh-Manoux, A., Marmot, M. G., & Brunner, E. J. (2009). Education attenuates the association between dietary patterns and cognition. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 27(2), 147–154
- Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2016;12(4):1–80

- Alwahsh, S.M.; Xu, M.; Seyhan, H.A.; Ahmad, S.; Mihm, S.; Ramadori, G.; Schultze, F.C. Diet high in fructose leads to an overexpression of lipocalin-2 in rat fatty liver. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 1807–1821
- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221(4617), 1256–1264.
- Anstey, K.J.; Cherbuin, N.; Budge, M.; Young, J. Body mass index in midlife and late life as a risk factor for dementia: A meta-analysis of prospective studies. *Obes. Rev.* 2011, 12, e426–e437
- Arnsten, A. F., & Li, B. M. (2005). Neurobiology of executive functions. Catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biological Psychiatry*, 57(11), 1377–1384.
- Bhat, N.R. Linking cardiometabolic disorders to sporadic Alzheimer’s disease: A perspective on potential mechanisms and mediators. *J. Neurochem.* 2010, 115, 551–562
- Barnstable CJ, Reddy R, Li H, Horvath TL (2016) Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) regulates retinal ganglion cell number and survival. *J Mol Neurosci* 58:461 –469
- Barr HG, Mc Cracken KJ (1984). High efficiency of energy utilization in 'cafeteria' and force-fed rats kept at 29 degrees. *Brit J Nutr* 51: 379-387.
- Bettaieb A, Vazquez Prieto MA, Rodriguez Lanzi C, Miatello RM, Haj FG, Fraga CG, Oteiza PI. 2014. Epicatechin mitigates high fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress. *Free Radic. Biol. Med.* 72:247-256

- Bayir, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33(12 Suppl.), S498–S501.
- Biessels, G.J.; Despa, F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: Mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018, 14, 591–604
- Blomer, J.; Pinky, P.D.; Govindarajulu, M.; Hong, H.; Judd, R.; Amin, R.H.; Moore, T.; Dhanasekaran, M.; Reed, M.N.; Suppiramaniam, V. (2018). Role of adiponectin in central nervous system disorders. *Neural. Plast.* 4593530
- Bonomini, F.; Rodella, L.F.; Rezzani, R. Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Aging Dis.* 2015, 6, 109–120
- Bray, G. A., & Popkin, B. M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6), 1157–1173.
- Brunner, E. J., Mosdol, A., Witte, D. R., Martikainen, P., Stafford, M., Shipley, M. J., & Marmot, M. G. (2008). Dietary patterns and 15-y risks of major coronary events, diabetes, and mortality. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1414–1421.
- Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. 2016. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 65:1038–48
- Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats, *Am. J. Physiol.* 295: E1269-E1276

- Cazettes, F., Cohen, J. I., Yau, P. L., Talbot, H., & Convit, A. (2011). Obesity-mediated inflammation may damage the brain circuit that regulates food intake. *Brain Research*, 1373, 101–109.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes– United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* (2004) 53:1066–8
- Chait A and den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.*,2020; 7: 22
- ChaJ Y, Repa JJ. 2007. The liver Xreceptor(LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* 282:743–51
- Charlton M, Krishnan A, Viker K, Sanderson S, Cazanave S, McConico A, Masuoko H, Gores G. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G825–G834, 2011.
- Cheng, C.F.; Ku, H.C.; Lin, H. PGC-1 α as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3447
- Cheranov, S.Y.; Jaggar, J.H. TNF- α dilates cerebral arteries via NAD(P)H oxidase-dependent Ca²⁺ spark activation. *Am. J. Physiol.* 2006, 290, C964–C971

- Chevillotte, E.; Giralt, M.; Miroux, B.; Ricquier, D.; Villarroya, F. Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production. *Diabetes* 2007, 56, 1042–1050
- Choe, S.S.; Huh, J.Y.; Hwang, I.J.; Kim, J.I.; Kim, J.B. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol* 2016,7,30.
- Chui, M. H., & Greenwood, C. E. (2008). Antioxidant vitamins reduce acute meal-induced memory deficits in adults with type 2 diabetes. *Nutrition Research*, 28(7), 423–429.
- Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Front Nutr.* (2016)
- Cigliano L, Spagnuolo MS, Crescenzo R, Cancelliere R, Iannotta L, Mazzoli A, Liverini G, Iossa S (2018) Short-term fructose feeding induces inflammation and oxidative stress in the hippocampus of young and adult rats. *Mol Neurobiol* 55(4):2869–2883
- Cook, K.S.; Min, H.Y.; Johnson, D.; Chaplinsky, R.J.; Flier, J.S.; Hunt, C.R.; Spiegelman, B.M. Adipsin: A circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 1987, 237, 402–405.
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Tsalouhidou S, Yepuri G, Mougios V, Dullo AG, Liverini G, Iossa S. 2012. Hepatic mitochondrial energetics

during catch-up fat with high-fat diets rich in lard or safflower oil. *Obesity*. 20:1763-1772

- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Liverini G, Iossa S (2013). Increased de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose. *Eur. J. Nutr* 52:537-545.
- Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Tussellino M, Carotenuto R, Liverini G, Iossa S. 2014. Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats. *Exp. Physiol.* 99:1203-1213
- Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, Iossa S. 2015. The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *Eur. J. Nutr.* 54:183-192
- Crescenzo, R.; Bianco, F.; Mazzoli, A.; Giacco, A.; Liverini, G.; Iossa, S. A possible link between hepatic mitochondrial dysfunction and diet-induced insulin resistance. *Eur. J. Nutr.* (2016), 55, 1–6.
- Dardevet D, Sornet C, Balage M, Grizard J. 2000. Stimulation of vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J. Nutr.* 130:2630-2635
- Davey GP, Clark JB (1996) Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J Neurochem* 66(4):1617 –1624

- DeFronzo RA. Banting lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. (2009) 58:773–95. doi: 10.2337/db09-9028
- Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(5):E685–94.
- Della Corte, K.W.; Perrar, I.; Penczynski, K.J.; Schwingshackl, L.; Herder, C.; Buyken, A.E. (2018). Effect of dietary sugar intake on biomarkers of subclinical inflammation: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Nutrients* 10, 606.
- De Minicis, S.; Seki, E.; Paik, Y.H.; Osterreicher, C.H.; Kodama, Y.; Kluwe, J.; Torozzi, L.; Miyai, K.; Benedetti, A.; Schwabe, R.F.; et al. Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010, 52, 1420–1430
- Den Boer, M.; Voshol, P.J.; Kuipers, F.; Havekes, L.M.; Romijn, J.A. Hepatic steatosis: A mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2004, 24, 644–649.
- Devore, E. E., Stampfer, M. J., Breteler, M. M., Rosner, B., Hee Kang, J., Okereke, O. et al. (2009). Dietary fat intake and cognitive decline in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32(4), 635–640
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins

in patients with non alcoholic fatty liver disease. *J.Clin. Investig.* 115:1343–51

- Drake I, Sonestedt E, Ericson U, Wallstrom P, Orho-Melander M. 2018. A Western dietary pattern is prospectively associated with cardio-metabolic traits and incidence of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 119:1168-1176
- Duval C, Thissen U, Keshtkar S, Accart B, Stienstra R, Boekschoten MV, Roskams T, Kersten S, Muller M. Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Diabetes* 59: 3181–3191, 2010
- Duyckaerts, C., Derouesne, C., Signoret, J. L., Gray, F., Escourolle, R., & Castaigne, P. (1985). Bilateral and limited amygdalohippocampal lesions causing a pure amnesic syndrome. *Annals of Neurology*, 18(3), 314–319.
- Edwards, L. M., Murray, A. J., Holloway, C. J., Carter, E. E., Kemp, G. J., Codreanu, I., et al. (2011). Short-term consumption of a high-fat diet impairs whole-body efficiency and cognitive function in sedentary men. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(3), 1088–1096.
- Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology (Baltimore, MD)* 44: 865–873, 2006.

- Elias, M. F., Elias, P. K., Sullivan, L. M., Wolf, P. A., & D'Agostino, R. B. (2005). Obesity, diabetes and cognitive deficit. The Framingham heart study. *Neurobiology of Aging*, 26(Suppl. 1), 11–16.
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(5):911–22.
- Esmaili, S.; Xu, A.; George, J. (2014). The multifaceted and controversial immunometabolic actions of adiponectin. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 444–451.
- Ezquerro E., Castellano Vázquez J. M., Alegría Barrero A. Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes: Cardiovascular Implications and Therapy. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61(7):752-64
- Feillet-Coudray, C.; Fouret, G.; Vigor, C.; Bonafos, B.; Jover, B.; Blachnio-Zabielska, A.; Rieusset, J.; Casas, F.; Gaillet, S.; Landrier, J.F.; et al. Long-term measures of dyslipidemia.; inflammation.; and oxidative stress in rats fed a high-fat/high-fructose diet. *Lipids* 2019, 54, 81–97.
- Fernandes MA, Custodo JB, Santos MS, Moreno AJ, Vicente JA. (2006). Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat mitochondria from oxidative stress. *Mitochondrion*, 6: 176-185
- Fernández Gianotti T, Burgueno A, Gonzales Mansilla N, Pirola CJ, Sookoian S. 2013. Fatty liver is associated with transcriptional downregulation of steroyl-CoA desaturase and impaired protein dimerization. *PLoS ONE* 8:e76912

- Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among us adults, 1999-2010. *JAMA*. (2012) 307:491–7. doi: 10.1001/jama.2012.39
- Flier, J.S.; Maratos-Flier, E. Lasker lauds leptin. *Cell* 2010, 143, 9–12
- Flohè L, Otting F (1984). Superoxide dismutase assay. *Meth. Enzymol.* 105, 93-104
- Flowers MT, J.M. Ntambi, Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 19 (2008) 248-256.
- Formolo, D.A.; Lee, T.H.; Yau, S.Y. Increasing adiponergic system activity as a potential treatment for depressive disorders. *Mol. Neurobiol.* 2019 56, 7966–7976
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*; 226: 497–510.
- Fouret,G.;Gaillet,S.;Lecomte,J.;Bonafos,B.;Djohan,F.; Barea B.; Badia,E.;Coudray,C.;Feillet-Coudray,C. 20-week follow-up of hepatic steatosis installation and liver mitochondrial structure and activity and their interrelation in rats fed a high-fat–high-fructose diet. *Br. J. Nutr.* 2018, 119, 368–380
- Francis, H. M., & Stevenson, R. J. (2011). Higher reported saturated fat and refined sugar intake is associated with reduced hippocampal-dependent memory and sensitivity to interoceptive signals. *Behavioral Neuroscience*, 125(6), 943–955

- Franko A, von Kleist-Retzow JC, Neschen S, Wu M, Schommers P, Böse M, Kunze A, Hartmann U et al (2014) Liver adapts mitochondrial function to insulin resistant and diabetic states in mice. *J Hepatol* 60:816–823
- Frasca, G.; Carbonaro, V.; Merlo, S.; Copani, A.; Sortino, M.A. Integrins mediate beta-amyloid-induced cell-cycle activation and neuronal death. *J. Neurosci. Res.* 2008, 86, 350–355
- Fu, Z., Gilbert, E. R., and Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 9,25–53
- García-Ruiz, I.; Solís-Muñoz, P.; Fernández-Moreira, D.; Grau, M.; Colina, F.; Muñoz-Yagüe, T.; Solís-Herruzo, J.A. High fat diet decreases activity of the oxidative phosphorylation enzymes and causes nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Dis. Model. Mech.* 2014, 7, 1287–1296
- García-Ruiz, I.; Solís-Muñoz, P.; Fernández-Moreira, D.; Muñoz-Yagüe, T.; Solís-Herruzo, J.A. In vitro treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in nonalcoholic steatohepatitis. *Dis. Model. Mech.* 2015, 8, 183–191
- Garnol, T.; Endlicher, R.; Kucˇera, O.; Drahota, Z.; Cervinková, Z. Impairment of mitochondrial function of rat hepatocytes by high fat diet and oxidative stress. *Physiol. Res.* 2014, 63, 271–274
- Gastaldelli A, Harrison SA, Belfort-Aguilar R, Hardies LJ, Balas B, Schenker S, Cusi K. Importance of changes in adipose tissue insulin resistance to histological response during thiazolidinedione treatment of

patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, MD)* 50: 1087–1093, 2009

- Goto, T.; Lee, J.Y.; Teraminami, A.; Kim, Y.I.; Hirai, S.; Uemura, T.; Inoue, H.; Takahashi, N.; Kawada, T.J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *Lipid Res.* 2011, 52, 873–884.
- Granholm AC, Bimonte-Nelson H, Moore AB, Nelson ME, Freeman LR, Sambamurti K (2008) Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J Alzheimers Dis* 14:133–145
- Grimm A, Eckert A (2017) Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *J Neurochem* 143(4):418 –431
- Guo, H.; Bazuine, M.; Jin, D.; Huang, M.M.; Cushman, S.W.; Chen, X. Evidence for the regulatory role of lipocalin2 in high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in male mice. *Endocrinology* 2013, 54, 3525–3538
- Gustafson, D. Adiposity indices and dementia. *Lancet Neurol.* 2006, 5, 713–720
- Haase J, Weyer U, Immig K, Klötting N, Blüher M, Eilers J, et al. Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia.* (2014) 57(3):562-71

- Han CY, Subramanian S, Chan CK, Omer M, Chiba T, Wight TN, Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. 2016. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum. *Annu. Rev. Pathol.* 11:451–96
- Harvey, J.; Solovyova, N.; Irving, A. Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Prog. Lipid Res.* 2006, 45, 369–378
- Hassain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world: a growing challenge. *N Engl Med.* 2007; 352:213-6.
- Hayashi-Park, E.; Ozment, B.N.; Griffith, C.M.; Zhang, H.; Patrylo, P.R.; Rose, G.M. Experimentally induced diabetes worsens neuropathology, but not learning and memory, in middle aged 3xTg mice. *Behav. Brain Res.* 2017, 322, 280–287
- Heidemann C, Schulze MB, Franco OH, van Dam RM, Mantzoros CS, Hu FB. Dietary patterns and risk of mortality from cardiovascular disease, cancer, and all causes in a prospective cohort of women. *Circulation* 118: 230 –237, 2008.
- Holloway, C. J., Cochlin, L. E., Emmanuel, Y., Murray, A., Codreanu, I., Edwards, L. M., et al. (2011). A high-fat diet impairs cardiac high-energy phosphate metabolism and cognitive function in healthy human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 748–755.
- Hundal, R. S., Petersen, K. F., Mayerson, A. B., Randhawa, P. S., Inzucchi, S., Shoelson, S.E., et al. (2002). Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in T2D. *J. Clin. Invest.* 109, 1321–1326.

- Kahn, B. B., and Flier, J. S. (2000). Obesity and IR. *J. Clin. Invest.* 106, 473–481
- Kakimoto PA, Kowaltowski AJ (2016) Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biol* 8: 216–225
- Kalmijn, S., van Boxtel, M. P., Ocke, M., Verschuren, W. M., Kromhout, D., & Launer, L.J. (2004). Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology*, 62(2), 275–280
- Kaplan, R. J., Greenwood, C. E., Winocur, G., & Wolever, T. M. (2001). Dietary protein, carbohydrate, and fat enhance memory performance in the healthy elderly. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(5), 687–693.
- Kawano Y, Cohen DE. 2013. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* 48:434–441
- Kim Y., Yoon S., Kim S.J., Kim J.S., Cheong J. W., and Min Y.H. Myeloperoxidase Expression in Acute Myeloid Leukemia Helps Identifying Patients to Benefit from Transplant. *Yonsei Med J.* 2012; 53(3): 530–536.
- Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, Softic S, Feldstein AE, Saxena V, Tang PH, Miles L, Miles MV, Balistreri WF, Woods SC, Seeley RJ. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, MD)* 52: 934–944, 2010

- Kondapally Seshasai SR, Kaptoge S, Thompson A, Di Angelantonio E, Gao P, Sarwar N, et al. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med* 2011 Mar 3;364(9):829-841
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. Dec; 87(6):1344-50.
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:784-36.
- Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, et al. 2011. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *PNAS* 108:16381–85
- Iossa, S.; Lionetti, L.; Mollica, M.P.; Crescenzo, R.; Barletta, A.; Liverini, G. Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. *Br. J. Nutr.* 2000, 84, 377–385
- Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. 2014. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 146:726–35
- Lee CM, Huxley RR, Wildman RP, Woodward M. Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than bmi: a meta-analysis. *J Clin Epidemiol.* (2008) 61:646–53.

- Lee, B.C., and Lee, J. (2014). Cellular and molecular players in AT inflammation in the development of obesity-induced IR. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 446–462
- Letra, L.; Rodrigues, T.; Matafome, P.; Santana, I.; Seiça, R. Adiponectin and sporadic Alzheimer's disease: Clinical and molecular links. *Front Neuroendocr.* 2017, 52, 1–11
- Li, Y.; Zhao, F.; Wu, O.; Li, M.; Zhu, Y.; Song, S.; Zhu, J.; Ma, Y.; Li, H.; Shi, X.; et al. Fish oil diet may reduce inflammatory levels in the liver of middle-aged rats. *Sci. Rep.* 2017, 7, 6241
- Liu, Q.; Nilsen Hamilton, M. Identification of a new acute phase protein. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 22565–22570
- Lohr, K.; Pachl, F.; Moghaddas Gholami, A.; Geillinger, K.E.; Daniel, H.; Kuster, B.; Klingenspor, M. Reduced mitochondrial mass and function add to age-related susceptibility to ward diet-induced fatty liver in C57BL/6J mice. *Physiol. Rep.* 2016, 4, e12988
- López-Otín, C.; Galluzzi, L.; Freije, J.M.P.; Madeo, F.; Kroemer, G. Metabolic Control of Longevity. *Cell* 2016, 166, 802–821
- Lourenco, M.V.; Clarke, J.R.; Frozza, R.L.; Bomfim, T.R.; Forny-Germano, L.; Batistam, A.F.; Sathler, L.B.; Brito-Moreira, J.; Amaral, O.B.; Silva, C.A.; et al. TNF- α mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's b-amyloid oligomers in mice and monkeys. *Cell Metab.* 2013, 18, 831–843

- Lu M, Sun XL, Qiao C, Liu Y, Ding JH, Hu G (2014) Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation. *Neurobiol Aging* 35:421–430
- Ludwig DS. Dietary glycemic index and obesity. *J Nutr.* 2000;130(2S Suppl): 280S–3S.
- Luft, V. C., Schmidt, M. I., Pankow, J. S., Coupe, R. D., Ballantyne, C. M., Young, J. H., et al. (2013). Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-cohort study. *Diabetol. Metab. Syndr.* 5:31
- Luppino, F.; de Wit, L.; Bouvy, P.F., A. Overweight, obesity, and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch. Gen. Psychiatry* 2010, 67, 220–229
- Machado MV, Michelotti GA, Xie G, de Almeida TP, Boursier J, Bohnic B, Guy CD, Diehl AM. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One* 10: e0127991, 2015
- MacPhail RC, Farmer JD, Jarema KA (2012) Toluene effects on the motor activity of adolescent, young-adult, middle-age and senescent male Brown Norway rats. *Neurotoxicol* 33:111e11
- Maeda, N.; Shimomura, I.; Kishida, K.; Nishizawa, H.; Matsuda, M.; Nagaretani, H.; Furuyama, N.; Kondo, H.; Takahashi, M.; Arita, Y.; et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 2002, 8, 731–737.

- Maehly AC, Chance B. 1954. The assay of catalase and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.* 1:357-424
- Maffei, M.; Barone, I.; Scabia, G.; Santini, F. (2016). The multifaceted haptoglobin in the context of adipose tissue and metabolism. *Endocr. Rev.* 37, 403–416
- Malik, V., & Hu, F. (2012). Sweeteners and risk of obesity and type 2 diabetes. The role of sugar-sweetened beverages. *Current Diabetes Reports*, 1–9
- Maresca, B.; Spagnuolo, M.S.; Cigliano, L. Haptoglobin modulates beta-amyloid uptake by U-87MG astrocytes cell line. *J. Mol. Neurosci.* 2015, 56, 35–47
- Matthew J. Watt, Paula M. Miotto, William De Nardo, and Magdalene K. Montgomery. The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocrine Reviews*, October 2019, 40(5):1367–1393
- McGarry JD, Brown NF. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyl transferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244:1–14
- McNeilly, A. D., Williamson, R., Sutherland, C., Balfour, D. J., & Stewart, C. A. (2011). High fat feeding promotes simultaneous decline in insulin sensitivity and cognitive performance in a delayed matching and non-matching to position task. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 134–141
- McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. 2015. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis

using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J. Hepatol.* 62:1148–55

- MacPhail RC, Farmer JD, Jarema KA (2012) Toluene effects on the motor activity of adolescent, young-adult, middle-age and senescent male Brown Norway rats. *Neurotoxicol* 33:111e118
- Maffei, M.; Barone, I.; Scabia, G.; Santini, F. (2016). The multifaceted haptoglobin in the context of adipose tissue and metabolism. *Endocr. Rev.* 37, 403–416
- Maresca, B.; Spagnuolo, M.S.; Cigliano, L. Haptoglobin modulates beta-amyloid uptake by U-87MG astrocytes cell line. *J. Mol. Neurosci.* 2015, 56, 35–47
- Mensenkamp AR, Havekes LM, Romijn JA, Kuipers F. 2001. Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: The involvement of apolipoprotein E. *J. Hepatol.* 35:816-822
- Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, et al. 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445:219–23
- Morselli E, Frank AP, Palmer BF, Rodriguez-Navas C, Criollo A, Clegg DJ (2016) A sexually dimorphic hypothalamic response to chronic high-fat diet consumption. *Int J Obes* 40:206 –209
- Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res.* (2008) 49(7):1562-8.

- Murray C, Sanderson DJ, Barkus C, Deacon RM, Rawlins JN, Bannerman DM, Cunningham C. Systemic inflammation induces acute working memory deficits in the primed brain: relevance for delirium. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(3): 603–616.e3
- Nabb, S., & Benton, D. (2006). The influence on cognition of the interaction between the macro-nutrient content of breakfast and glucose tolerance. *Physiology & Behavior*, 87(1), 16–23
- Naqvi, A. Z., Harty, B., Mukamal, K. J., Stoddard, A. M., Vitolins, M., & Dunn, J. E.(2011). Monounsaturated, trans, and saturated Fatty acids and cognitive decline in women. *Journal of the American Geriatrics Society*, 59(5), 837–843
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet*. (2016) 387:1513–30. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00618-8
- Ng, R.C.; Cheng, O.Y.; Jian, M.; Kwan, J.S.; Ho, P.W.; Cheng, K.K.; Yeung, P.K.; Zhou, L.L.; Hoo, R.L.; Chung, S.K.; et al. Chronic adiponectin deficiency leads to Alzheimer’s disease-like cognitive impairments and pathologies through AMPK inactivation and cerebral insulin resistance in aged mice. *Mol. Neurodegener*. 2016, 11, 71
- Nicolas, S.; Cazareth, J.; Zarif, H.; Guyon, A.; Heurteaux, C.; Chabry, J.; Petit-Paitel, A. Globular adiponectin limits microglia pro-inflammatory phenotype through an AdipoR1/NF-kappaB signaling pathway. *Front. Cell Neurosci*. 2017, 11, 352

- Nielsen, S. J., Siega-Riz, A. M., & Popkin, B. M. (2002). Trends in energy intake in US between 197 and 1996. Similar shifts seen across age groups. *Obesity Research*, 10(5), 370–37
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., et al. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404(6779), 787–790.
- Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011;378(9786):169–81
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., et al. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), 759–767.
- Ntambi JM, Miyazaki M. 2004. Regulation of steroyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 43:91-109
- Okereke, O. I., Rosner, B. A., Kim, D. H., Kang, J. H., Cook, N. R., Manson, J. E., et al. (2012). Dietary fat types and 4-year cognitive change in community-dwelling older women. *Annals of Neurology*, 72(1), 124–134.
- Ogden, C.L.; Carroll, M.D.; Fryar, C.D.; Flegal, K.M. Prevalence of obesity among adults and youth: United States, 2011–2014. *NCHS Data Brief* 2015, 219, 1–8.

- Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C., and Zuñiga, F. A. (2018). Association between IR and the development of cardiovascular disease. *Cardiovasc.Diabetol.*17:122
- Ozero J, Ratnerb M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245:194-205
- Panahi, G., Pasalar, P., Zare, M., Rizzuto, R., and Meshkani, R. (2018). High glucose induces inflammatory responses in HepG2 cells via the oxidative stress mediated activation of NF- κ B, and MAPK pathways in HepG2 cells. *Arch. Physiol.Biochem.*124,468–474
- Papa L, Rockwell P (2008) Persistent mitochondrial dysfunction and oxidative stress hinder neuronal cell recovery from reversible proteasome inhibition. *Apoptosis* 13:588–599
- Parimisetty, A.; Dorsemans, A.C.; Awada, R.; Ravanan, P.; Diotel, N.; Lefebvre d’Hellencourt, C. Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors—an emerging frontier in the neurodegenerative research. *J. Neuroinflamm.* 2016, 13, 67.
- Penicaud, L.; Ferre, P.; Assimacopoulos-Jeannet, F.; Perdereau, D.; Leturque, A.; Jeanrenaud, B.; Picon, L.; Girard, J. Increased gene expression of lipogenic enzymes and glucose transporter in white adipose tissue of suckling and weaned obese Zucker rats. *Biochem. J.* 1991, 279, 303–308
- Persad, C. C., Abeles, N., Zacks, R. T., & Denburg, N. L. (2002). Inhibitory changes after age 60 and their relationship to measures of attention and

memory. *Journals of Gerontology. Series B, Psychological Sciences and Social Sciences*, 57(3), P223–232.

- Piper, M.D.W.; Bartke, A. Diet and aging. *Cell Metab.* 2008, 8, 99–104
- Pistell, P. J., Morrison, C. D., Gupta, S., Knight, A. G., Keller, J. N., Ingram, D. K., & Bruce-Keller, A. J. (2010). Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of Neuroimmunology*, 219(1–2), 25–32
- Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 13: 3540–3553, 2007
- Ramalingam, L., Oh, E., and Thurmond, D. C. (2013). Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates. *Cell Mol.LifeSci.*70,2815–2834
- Reedy J, Krebs-Smith SM. Dietary sources of energy, solid fats, and added sugars among children and adolescents in the United States. *J Am Diet Assoc* 110: 1477–1484, 2010
- Regazzetti, C., Peraldi, P., Grémeaux, T., Najem-Lendom, R., Ben-Sahra, I., Cormont, M., et al. (2009). Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 58,95–103
- Reilly, S. M., Chiang, S. H., Decker, S. J., Chang, L., Uhm, M., Larsen, M. J., et al. (2013). An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK- α improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nat. Med.* 19, 313–321

- Rogue A, Lambert C, Josse R, Antherieu S, Spire C, et al. 2011. Comparative gene expression profiles induced by PPAR γ and PPAR α /agonists in human hepatocytes. PLOS ONE 6:e18816
- Rosen, E.D.; Spiegelman, B.M. What we talk about when we talk about fat. Cell 2014, 156, 20–44.
- Roy A, Pahan K (2015) PPAR α signaling in the hippocampus: Crosstalk between fat and memory. J NeuroImmune Pharmacol 86310(1):30–34
- Royland JE, Kodavanti PR, Schmid JE, MacPhail RC (2012) Toluene effects on gene expression in the hippocampus of young adult, middle-age, and senescent Brown Norway rats. Toxicol Sci 685126:193e21
- Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, et al. 2008. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. Science 322:1539–43
- Schioth, H.B.; Craft, S.; Brooks, S.J.; Frey, W.H., 2nd; Benedict, C. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. Mol. Neurobiol. 2012, 46, 4–10.
- Shoelson, S. E., Lee, J., and Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and IR. J. Clin. Invest. 116, 1793–1801.
- Shulman, G. I. (2000). Cellular mechanisms of IR. J. Clin. Invest. 106, 171–176

- Silva, A.K.S.; Peixoto, C.A. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in non-alcoholic fatty liver disease inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018, 75, 2951–2961
- Softic S, Cohen DE, Kahn CR. 2016. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. *Dig. Dis. Sci.* 61:1282–93
- Song, J.; Kang, S.M.; Kim, E.; Kim, C.H.; Song, H.T.; Lee, J.E. Adiponectin receptor-mediated signaling ameliorates cerebral cell damage and regulates the neurogenesis of neural stem cells at high glucose concentrations: An in vivo and in vitro study. *Cell Death Dis.* 2015, 6, e1844
- Souza, C. G., Moreira, J. D., Siqueira, I. R., Pereira, A. G., Rieger, D. K., Souza, D. O., et al. (2007). Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences*, 81(3), 198–203.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K et al (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127(2):397–408
- Stefan N, Peter A, Cegan A, Staiger H, Machann J, Schick F, Clausen CD, Fritsche A, Häring HU, Schleicher E. 2008. Low hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans. *Diabetologia.* 51:648-656

- Stoeckel, L.E.; Arvanitakis, Z.; Gandy, S.; Small, D.; Kahn, C.R.; Pascual-Leone, A.; Sherwin, R.; Smith, P. Complex mechanisms linking neurocognitive dysfunction to insulin resistance and other metabolic dysfunction. *F1000Research* 2016, 5, 353
- Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP (2008) Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18:1085–1088
- Sultan, S.; Pascucci, M.; Ahmad, S.; Malik, I.A.; Bianchi, A.; Ramadori, P.; Ahmad, G.; Ramadori, G. Lipocalin-2 is a major acute phase protein in a rat and mouse model of sterile abscess. *Shock* 2012,37,191–196.
- Sutinen, E.M.; Pirttilä, T.; Anderson, G.; Salminen, A.; Ojala, J.O. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease associated amyloid- β production in human neuron-like cells. *J. Neuroinflamm.* 2012, 9, 1–14
- Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010;90(1):23–46
- Thundyil, J.; Pavlovski, D.; Sobey, C.G.; Arumugam, T.V. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br. J. Pharm.* 2012, 165, 313–327
- Tilg, H., and Moschen, A. R. (2008). Inflammatory mechanisms in the regulation of IR. *Mol. Med.* 14, 222–231
- Uemura, H., Katsuura-Kamano, S., Yamaguchi, M., Bahari, T., Ishizu, M., and Fujioka, M. (2017). Relationships of serum high-sensitivity C-reactive

protein and body size with IR in a Japanese cohort. *PLoS One* 12:e0178672.doi:10.1371/journal.pone.0178672

- Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., and Hotamisligil, G.S. (1998). Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated IR in genetic obesity. *Endocrinology* 139,4832–4838.
- Van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ, Hu FB. Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care*. 2002;25(3):417–24.
- Vasdev S, Longerich L, Gill V. Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clin Biochem*. 2004;37(1):1–9.
- Wang, Y.; Lam, K.S.; Kraegen, E.W.; Sweeney, G.; Zhang, J.; Tso, A.W.; Chow, W.S.; Wat, N.M.; Xu, J.Y.; Hoo, R.L.; et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clin. Chem*. 2007, 53, 34–41
- Wang, B.; Guo, H.; Li, X.; Yue, L.; Liu, H.; Zhao, L.; Bai, H.; Liu, X.; Wu, X.; Qu, Y. Adiponectin attenuates oxygen-glucose deprivation-induced mitochondrial oxidative injury and apoptosis in hippocampal HT22 cells via the JAK2/STAT3 pathway. *Cell Transpl*. 2018, 27, 1731–1743
- Wang, K.; Song, F.; Xu, K.; Liu, Z.; Han, S.; Li, F.; Sun, Y. Irisin attenuates neuroinflammation and prevents the memory and cognitive deterioration in streptozotocin-induced diabetic mice. *Mediators Inflamm*. 2019, 1567179

- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* (2003) 112(12):1796-808
- Welsh JA, Sharma A, Abramson JL, Vaccarino V, Gillespie C, Vos MB. Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults. *JAMA.* 2010;303(15):1490–7
- White, C. L., Pistell, P. J., Purpera, M. N., Gupta, S., Fernandez-Kim, S. O., Hise, T. L., et al. (2009). Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats. Contributions of maternal diet. *Neurobiology of Diseases*, 35(1), 3–13
- Wilkinson, M.; Brown, R.; Imran, S.A.; Ur, E. Adipokine gene expression in brain and pituitary gland. *Neuroendocrinology* 2007, 86, 191–209.
- World Health Organization (2011) Global health and aging. Nat Inst Aging NIH Publication no:11 –7737
- Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, et al. 2003. Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 3:243–54
- Yan, Q.W.; Yang, Q.; Mody, N.; Graham, T.E.; Hsu, C.H.; Xu, Z.; Houstis, N.E.; Kahn, B.B.; Rosen, E.D. The Adipokine Lipocalin 2 Is Regulated by Obesity and Promotes Insulin Resistance. *Diabetes* 2007, 56, 2533–254
- Yau, S.Y.; Li, A.; Hoo, R.L.; Ching, Y.P.; Christie, B.R.; Lee, T.M.; Xu, A.; So, K.F. Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and

antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2014, 111, 15810–15815

- Ye, R.; Scherer, P.E. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? Mol. Metab. 2013, 2, 133–141.
- Yuwen Luo, Christine M. Burrington, Emily C. Graff, Jian Zhang, Robert L. Judd, Promporn Suksaranjit, Quanhathai Kaewpoowat, Samantha K. Davenport, Ann Marie O’Neill, and Michael W. Greene. Metabolic phenotype and adipose and liver features in a high-fat Western diet-induced mouse model of obesity-linked NAFLD. Am J Physiol Endocrinol Metab 310: E418–E439, 2016
- Wang, Y.; Lam, K.S.; Kraegen, E.W.; Sweeney, G.; Zhang, J.; Tso, A.W.; Chow, W.S.; Wat, N.M.; Xu, J.Y.; Hoo, R.L.; et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. Clin. Chem. 2007, 53, 34–41
- Zatterale F, Longo M, Naderi J, Raciti GA, Desiderio A, Miele C and Beguinot F (2020) Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. Front. Physiol. 10:1607
- Zhang, J.; Wu, Y.; Zhang, Y.; LeRoith, D.; Bernlohr, D.A.; Chen, X. The Role of Lipocalin 2 in the Regulation of Inflammation in Adipocytes and Macrophages. Mol. Endocrinol. 2008, 22, 1416–1426
- Zhang, J.Z.; Jing, L.; Guo, F.Y.; Ma, Y.; Wang, Y.L. Inhibitory effect of ketamine on phosphorylation of the extracellular signal regulated kinase1/2

following brain ischemia and reperfusion in rats with hyperglycemia. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2007, 59, 227–235

- Zhang, D.; Wang, X.; Lu, X.Y. Adiponectin exerts neurotrophic effects on dendritic arborization, spinogenesis, and neurogenesis of the dentate gyrus of male mice. *Endocrinology* 2016, 157, 2853–2869

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- Abdul-Ghani MA, Matsuda M, De Fronzo RA (2008). Strong association between insulin resistance in liver and skeletal muscle in non-diabetic subjects. *Diabet Med* 25(11):1289-94.
- Alwahsh, S.M.; Xu, M.; Seyhan, H.A.; Ahmad, S.; Mihm, S.; Ramadori, G.; Schultze, F.C. Diet high in fructose leads to an overexpression of lipocalin-2 in rat fatty liver. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 1807–1821
- Anstey, K.J.; Cherbuin, N.; Budge, M.; Young, J. Body mass index in midlife and late life as a risk factor for dementia: A meta-analysis of prospective studies. *Obes. Rev.* 2011, 12, e426–e437
- Bhat, N.R. Linking cardiometabolic disorders to sporadic Alzheimer's disease: A perspective on potential mechanisms and mediators. *J. Neurochem.* 2010, 115, 551–562
- Barr HG, Mc Cracken KJ (1984). High efficiency of energy utilization in 'cafeteria' and force-fed rats kept at 29 degrees. *Brit J Nutr* 51: 379-387.

- Barnstable CJ, Reddy R, Li H, Horvath TL (2016) Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) regulates retinal ganglion cell number and survival. *J Mol Neurosci* 58:461–469
- Bettaieb A, Vazquez Prieto MA, Rodriguez Lanzi C, Miatello RM, Haj FG, Fraga CG, Oteiza PI. 2014. Epicatechin mitigates high fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress. *Free Radic. Biol. Med.* 72:247-256
- Blomer, J.; Pinky, P.D.; Govindarajulu, M.; Hong, H.; Judd, R.; Amin, R.H.; Moore, T.; Dhanasekaran, M.; Reed, M.N.; Suppiramaniam, V. (2018). Role of adiponectin in central nervous system disorders. *Neural. Plast.* 4593530
- Burtscher J, Zangrandi L, Schwarzer C, Gnaiger E (2015) Differences in mitochondrial function in homogenated samples from healthy and epileptic specific brain tissues revealed by high resolution respirometry. *Mitochondrion* 25:104–112
- Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats, *Am. J. Physiol.* 295: E1269-E1276
- Chait A and den Hartigh LJ (2020) Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.*
- Chang Yeop Han, Savitha Subramanian, Christina K. Chan, Mohamed Omer, Tsuyoshi Chiba, Thomas N. Wight and Alan Chait. et al. Adipocyte-

derived serum amyloid a₃ and hyaluronan play a role in monocyte recruitment and adhesion. *Diabetes*. (2007)

- Cheng, C.F.; Ku, H.C.; Lin, H. PGC-1 α as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3447
- Cheranov, S.Y.; Jaggar, J.H. TNF- α dilates cerebral arteries via NAD(P)H oxidase-dependent Ca²⁺ spark activation. *Am. J. Physiol.* 2006, 290, C964–C971
- Chevillotte, E.; Giralt, M.; Miroux, B.; Ricquier, D.; Villarroya, F. Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production. *Diabetes* 2007, 56, 1042–1050
- Chusyd, D.E.; Wang, D.; Huffman, D.M.; Nagy, T.R. Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Front. Nutr.* 2016, 3:10.
- Cigliano L, Spagnuolo MS, Crescenzo R, Cancelliere R, Iannotta L, Mazzoli A, Liverini G, Iossa S (2018) Short-term fructose feeding induces inflammation and oxidative stress in the hippocampus of young and adult rats. *Mol Neurobiol* 55(4):2869–2883
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Tsalouhidou S, Yepuri G, Mougios V, Dullo AG, Liverini G, Iossa S. 2012. Hepatic mitochondrial energetics during catch-up fat with high-fat diets rich in lard or safflower oil. *Obesity*. 20:1763-1772

- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Liverini G, Iossa S (2013). Increased de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose. *Eur. J. Nutr* 52:537-545.
- Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Tussellino M, Carotenuto R, Liverini G, Iossa S. 2014. Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats. *Exp. Physiol.* 99:1203-1213
- Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, Iossa S. 2015. The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *Eur. J. Nutr.* 54:183-192
- Crescenzo, R.; Bianco, F.; Mazzoli, A.; Giacco, A.; Liverini, G.; Iossa, S. A possible link between hepatic mitochondrial dysfunction and diet-induced insulin resistance. *Eur. J. Nutr.* (2016), 55, 1–6.
- Davey GP, Clark JB (1996) Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J Neurochem* 66(4):1617 –1624
- Dardevet D, Sornet C, Balage M, Grizard J. 2000. Stimulation of vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J. Nutr.* 130:2630-2635
- Della Corte, K.W.; Perrar, I.; Penczynski, K.J.; Schwingshackl, L.; Herder, C.; Buyken, A.E. (2018). Effect of dietary sugar intake on biomarkers of subclinical inflammation: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Nutrients* 10, 606.

- De Minicis, S.; Seki, E.; Paik, Y.H.; Osterreicher, C.H.; Kodama, Y.; Kluwe, J.; Torozzi, L.; Miyai, K.; Benedetti, A.; Schwabe, R.F.; et al. Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010, 52, 1420–1430
- Drake I, Sonestedt E, Ericson U, Wallstrom P, Orho-Melander M. 2018. A Western dietary pattern is prospectively associated with cardio-metabolic traits and incidence of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 119:1168-1176
- Ezquerro E., Castellano Vázquez J. M., Alegría Barrero A. Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes: Cardiovascular Implications and Therapy. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61(7):752-64
- Feillet-Coudray, C.; Fouret, G.; Vigor, C.; Bonafos, B.; Jover, B.; Blachnio-Zabielska, A.; Rieusset, J.; Casas, F.; Gaillet, S.; Landrier, J.F.; et al. Long-term measures of dyslipidemia.; inflammation.; and oxidative stress in rats fed a high-fat/high-fructose diet. *Lipids* 2019, 54, 81–97.
- Fernandes MA, Custodo JB, Santos MS, Moreno AJ, Vicente JA. (2006). Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat mitochondria from oxidative stress. *Mitochondrion*, 6: 176-185
- Fernández Gianotti T, Burgueno A, Gonzales Mansilla N, Pirola CJ, Sookoian S. 2013. Fatty liver is associated with transcriptional downregulation of steroyl-CoA desaturase and impaired protein dimerization. *PLoS ONE* 8:e76912
- Flohè L, Otting F (1984). Superoxide dismutase assay. *Meth. Enzymol.* 105, 93-104

- Flowers MT, J.M. Ntambi, Role of stearyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 19 (2008) 248-256.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*; 226: 497–510.
- Frasca, G.; Carbonaro, V.; Merlo, S.; Copani, A.; Sortino, M.A. Integrins mediate beta-amyloid-induced cell-cycle activation and neuronal death. *J. Neurosci. Res.* 2008, 86, 350–355
- García-Ruiz, I.; Solís-Muñoz, P.; Fernández-Moreira, D.; Grau, M.; Colina, F.; Muñoz-Yagüe, T.; Solís-Herruzo, J.A. High fat diet decreases activity of the oxidative phosphorylation enzymes and causes nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Dis. Model. Mech.* 2014, 7, 1287–1296
- García-Ruiz, I.; Solís-Muñoz, P.; Fernández-Moreira, D.; Muñoz-Yagüe, T.; Solís-Herruzo, J.A. In vitro treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in nonalcoholic steatohepatitis. *Dis. Model. Mech.* 2015, 8, 183–191
- Garnol, T.; Endlicher, R.; Kucˇera, O.; Drahota, Z.; Cervinková, Z. Impairment of mitochondrial function of rat hepatocytes by high fat diet and oxidative stress. *Physiol. Res.* 2014, 63, 271–274
- Grimm A, Eckert A (2017) Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *J Neurochem* 143(4):418 –431
- Goto, T.; Lee, J.Y.; Teraminami, A.; Kim, Y.I.; Hirai, S.; Uemura, T.; Inoue, H.; Takahashi, N.; Kawada, T.J. Activation of peroxisome

proliferator-activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *Lipid Res.* 2011, 52, 873–884.

- Guo, H.; Bazuine, M.; Jin, D.; Huang, M.M.; Cushman, S.W.; Chen, X. Evidence for the regulatory role of lipocalin2 in high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in male mice. *Endocrinology* 2013, 54, 3525–3538
- Francis, R. Stevenson. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain *Appetite* 63 (2013) 119–128
- Ho-yin Lee T., King-yip Cheng K., Lai-chong Hoo R., Ming-fai Siu P. and Yu Yau S. The Novel Perspectives of Adipokines on Brain Health. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 5638
- Juan Pablo Arab, Marco Arrese, and Michael Trauner. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2018.13:321-350
- Kim Y., Yoon S., Kim S.J., Kim J.S., Cheong J. W., and Min Y.H. Myeloperoxidase Expression in Acute Myeloid Leukemia Helps Identifying Patients to Benefit from Transplant. *Yonsei Med J.* 2012; 53(3): 530–536
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:78436.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of

inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. Dec; 87(6):1344-50.

- Iossa,S.; Lionetti,L.; Mollica,M.P.; Crescenzo, R.;Barletta, A.; Liverini,G .Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. *Br. J. Nutr.* 2000, 84, 377–385
- Letra, L.; Rodrigues, T.; Matafome, P.; Santana, I.; Seiça, R. Adiponectin and sporadic Alzheimer’s disease: Clinical and molecular links. *Front Neuroendocr.* 2017, 52, 1–11
- Li, Y.; Zhao, F.; Wu, O.; Li, M.; Zhu, Y.; Song, S.; Zhu, J.; Ma, Y.; Li, H.; Shi, X.; et al. Fish oil diet may reduce inflammatory levels in the liver of middle-aged rats. *Sci. Rep.* 2017, 7, 6241
- Liu,Q.; Nilsen Hamilton,M. Identification of a new acute phase protein. *J.Biol. Chem.* 1995,270,22565–2257
- Lozano I., Van der Werf R., Bietiger W., Seyfritz E.,Peronet C.,Pinget M., Jeandidier N., Maillard E., Marchioni E., Sigrist S., Dal S, High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition & Metabolism* (2016) 13:15
- Lu M, Sun XL, Qiao C, Liu Y, Ding JH, Hu G (2014) Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation. *Neurobiol Aging* 35:421–430
- Maehly AC, Chance B. 1954. The assay of catalase and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.* 1:357-424

- Maffei, M.; Barone, I.; Scabia, G.; Santini, F. (2016). The multifaceted haptoglobin in the context of adipose tissue and metabolism. *Endocr. Rev.* 37, 403–416
- Maresca, B.; Spagnuolo, M.S.; Cigliano, L. Haptoglobin modulates beta-amyloid uptake by U-87MG astrocytes cell line. *J. Mol. Neurosci.* 2015, 56, 35–47
- Matthew J. Watt, Paula M. Miotto, William De Nardo, and Magdalene K. Montgomery. The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocrine Reviews*, October 2019, 40(5):1367–1393
- Mazzoli A, Crescenzo R, Cigliano L, Spagnuolo MS, Cancelliere R, Gatto C, Iossa S. 2019. Early hepatic oxidative stress and mitochondrial changes following Western diet in middle aged rats. *Nutrients.* 11:2670
- Mazzoli A., Spagnuolo M.S., Gatto C., Nazzaro M., Cancelliere R., Raffaella Crescenzo R., Iossa S and Cigliano L. Adipose Tissue and Brain Metabolic Responses to Western Diet—Is There a Similarity between the Two?. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 786;
- Mensenkamp AR, Havekes LM, Romijn JA, Kuipers F. 2001. Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: The involvement of apolipoprotein E. *J. Hepatol.* 35:816-822
- Morselli E, Frank AP, Palmer BF, Rodriguez-Navas C, Criollo A, Clegg DJ (2016) A sexually dimorphic hypothalamic response to chronic high-fat diet consumption. *Int J Obes* 40:206 –209

- Ntambi JM, Miyazaki M. 2004. Regulation of steroyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 43:91-109
- Ozero J, Ratnerb M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245:194-205
- Parimisetty, A.; Dorsemans, A.C.; Awada, R.; Ramanan, P.; Diotel, N.; Lefebvre d’Hellencourt, C. Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors—an emerging frontier in the neurodegenerative research. *J. Neuroinflamm.* 2016, 13, 67.
- Penicaud, L.; Ferre, P.; Assimacopoulos-Jeannet, F.; Perdereau, D.; Leturque, A.; Jeanrenaud, B.; Picon, L.; Girard, J. Increased gene expression of lipogenic enzymes and glucose transporter in white adipose tissue of suckling and weaned obese Zucker rats. *Biochem. J.* 1991, 279, 303–308
- Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C, Hepple RT (2011) Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PLoS One* 6(3):e183
- Piper, M.D.W.; Bartke, A. Diet and aging. *Cell Metab.* 2008, 8, 99–104
- Roy A, Pahan K (2015) PPAR α signaling in the hippocampus: 862crosstalk between fat and memory. *J NeuroImmune Pharmacol* 86310(1):30 –34
- Shoelson, S.E.; Herrero, L.; Naaz, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterol* 2007, 132, 2169–2180

- Silva, A.K.S.; Peixoto, C.A. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in non-alcoholic fatty liver disease inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018, 75, 2951–2961
- Spencer S.J., D’Angelo H., Soch A., Watkins L.R.: , Maier S. F., Barrientos R.M. High-fat diet and aging interact to produce neuroinflammation and impair hippocampal- and amygdalar-dependent memory. *Neurobiol Aging* 2017
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K et al (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127(2):397–408
- Stefan N, Peter A, Cegan A, Staiger H, Machann J, Schick F, Clausen CD, Fritsche A, Häring HU, Schleicher E. 2008. Low hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans. *Diabetologia.* 51:648-656
- Sultan, S.; Pascucci, M.; Ahmad, S.; Malik, I.A.; Bianchi, A.; Ramadori, P.; Ahmad, G.; Ramadori, G. Lipocalin-2 is a major acute phase protein in a rat and mouse model of sterile abscess. *Shock* 2012,37,191–196.
- Sutinen, E.M.; Pirttilä, T.; Anderson, G.; Salminen, A.; Ojala, J.O. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer’s disease associated amyloid- β production in human neuron-like cells. *J. Neuroinflamm.* 2012, 9, 1–14

- Thundyil, J.; Pavlovski, D.; Sobey, C.G.; Arumugam, T.V. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br. J. Pharm.* 2012, 165, 313–327
- Yan, Q.W.; Yang, Q.; Mody, N.; Graham, T.E.; Hsu, C.H.; Xu, Z.; Houstis, N.E.; Kahn, B.B.; Rosen, E.D. The Adipokine Lipocalin 2 Is Regulated by Obesity and Promotes Insulin Resistance. *Diabetes* 2007, 56, 2533–254
- Yuwen Luo, Christine M. Burrington, Emily C. Graff, Jian Zhang, Robert L. Judd, Promporn Suksaranjit, Quanhathai Kaewpoowat, Samantha K. Davenport, Ann Marie O’Neill, and Michael W. Greene. Metabolic phenotype and adipose and liver features in a high-fat Western diet-induced mouse model of obesity-linked NAFLD. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 310: E418–E439, 2016
- Wang, Y.; Lam, K.S.; Kraegen, E.W.; Sweeney, G.; Zhang, J.; Tso, A.W.; Chow, W.S.; Wat, N.M.; Xu, J.Y.; Hoo, R.L.; et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clin. Chem.* 2007, 53, 34–41
- Wilkinson, M.; Brown, R.; Imran, S.A.; Ur, E. Adipokine gene expression in brain and pituitary gland. *Neuroendocrinology* 2007, 86, 191–209.
- Zatterale F, Longo M, Naderi J, Raciti GA, Desiderio A, Miele C and Beguinot F (2020) Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front. Physiol.* 10:1607
- Zhang, J.Z.; Jing, L.; Guo, F.Y.; Ma, Y.; Wang, Y.L. Inhibitory effect of ketamine on phosphorylation of the extracellular signal regulated kinase1/2

following brain ischemia and reperfusion in rats with hyperglycemia. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2007, 59, 227–235

- Zhang, J.; Wu, Y.; Zhang, Y.; LeRoith, D.; Bernlohr, D.A.; Chen, X. The Role of Lipocalin 2 in the Regulation of Inflammation in Adipocytes and Macrophages. *Mol. Endocrinol.* 2008, 22, 1416–1426
- Zhang, D.; Wang, X.; Lu, X.Y. Adiponectin exerts neurotrophic effects on dendritic arborization, spinogenesis, and neurogenesis of the dentate gyrus of male mice. *Endocrinology* 2016, 157, 2853–2869

Elenco pubblicazioni inerenti al progetto

- R. Crescenzo, M. S. Spagnuolo, R. Cancelliere, L. Iannotta, A. Mazzoli, **C. Gatto**, S. Iossa, L. Cigliano. Effect of initial aging and high-fat/high-fructose diet on mitochondrial bioenergetics and oxidative status in rat brain. *Molecular Neurobiology* (2019). Nov;56(11):7651-7663 doi: 10.1007/s12035-019-1617-z
- A. Mazzoli, R. Crescenzo, L. Cigliano, M.S. Spagnuolo, R. Cancelliere, **C. Gatto**, S. Iossa. Early hepatic oxidative stress and mitochondrial changes following western diet in middle aged. *Nutrients* (2019) 11(11):2670 doi: 10.3390/nu11112670
- A. Mazzoli, M.S. Spagnuolo, **C. Gatto**, M. Nazzaro, R. Cancelliere, R. Crescenzo, S. Iossa, L. Cigliano. Adipose tissue and brain metabolic responses to western diet-is there a similarity between two? *International Journal of Molecular Science* (2020) 21(3):786. doi: 10.3390/ijms21030786

Altre pubblicazioni

- R. Cancelliere, S. Leone, **C. Gatto**, A. Mazzoli, C. Ercole, S. Iossa, G. Liverini, D. Picone, R. Crescenzo. Metabolic effects of the sweet protein MNEI as a sweetener in drinking water. A pilot study of high fat dietary regimen in a rodent model. *Nutrients* (2019) 11(11):2643 doi: 10.3390/nu11112643.
- A. Mazzoli, M.S. Spagnuolo, M. Nazzaro, **C. Gatto**, S. Iossa, L. Cigliano. Fructose-rich diet promotes Inflammation, Mitochondrial dysfunction and Oxidative stress in hippocampus that are reversed by switching to a control diet. *Antioxidants* (2021) 10(3):487 doi: 10.3390/antiox10030487
- A. Mazzoli, **C. Gatto**, R. Crescenzo, L. Cigliano S. Iossa, Prolonged changes in hepatic mitochondrial activity and insulin sensitivity by high fructose intake in young rats. *Nutrients* (2021) 13(4):1370 doi: 10.3390/nu13041370

- A. Mazzoli, **C. Gatto**, R. Crescenzo, M.S. Spagnuolo, M. Nazzaro, L. Cigliano, S. Iossa. Gut and liver metabolic responses to dietary fructose- are they reversible or persistent after switching to a healthy diet? *Food and function* (accettato 2021)