

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



Scuola Politecnica e delle Scienze di Base

Dottorato di ricerca in Biologia Applicata

XXVII Ciclo

Tesi di Dottorato

“Fruttosio: un nutriente altamente lipogenico implicato nella resistenza all’insulina,
nella steatosi epatica e nella sindrome metabolica”

“Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic
steatosis, and the metabolic syndrome”

Coordinatore

Candidata

Tutor

Ch.mo Prof.

Dott.ssa

Ch.ma Prof.ssa

Ezio Ricca

Arianna Mazzoli

Susanna Iossa

INDICE

INTRODUZIONE	p. 5
Capitolo 1: Il fruttosio	p. 7
1.1. Il metabolismo del fruttosio	p. 7
1.2. Gli effetti a lungo termine del fruttosio	p. 11
1.3. Depositi ectopici di lipidi nel fegato e nel muscolo.....	p. 13
1.4. Compromessa omeostasi glicemica ed insulino-resistenza	p. 15
Capitolo 2: Il muscolo scheletrico	p. 18
2.1. Efficienza mitocondriale ed insulino-resistenza	p. 18
Capitolo 3: Ruolo del tessuto adiposo nello sviluppo dell'obesità	p. 24
3.1. Il tessuto adiposo: funzioni e caratteristiche	p. 24
3.2. Eterogeneità morfologica e funzionale tra i depositi adiposi.....	p. 26
3.3. Rimodellamento del tessuto adiposo.....	p. 28
3.4. Ruolo dell'insulina nel tessuto adiposo	p. 29
SCOPO DELLA TESI	p. 32
MATERIALI E METODI	p. 35
Primo disegno sperimentale	p. 35
Secondo disegno sperimentale	p. 36

Terzo disegno sperimentale	p. 36
Misura della composizione corporea	p. 39
a) Misura del contenuto energetico della carcassa.....	p. 39
b) Misura del contenuto lipidico, proteico e di acqua della carcassa.....	p. 40
Misura del bilancio energetico	p. 41
Parametri plasmatici.....	p. 42
a) Test di tolleranza al glucosio	p. 42
b) Parametri plasmatici	p. 43
Calorimetria indiretta	p. 44
Composizione del fegato e del muscolo scheletrico	p. 45
Preparazione dell'omogenato di fegato ed isolamento dei mitocondri	p. 46
Preparazione dell'omogenato del muscolo scheletrico ed isolamento dei mitocondri.....	p. 47
Attività epatica dell'SCD e della FAS.....	p. 48
Attività della COX	p. 50
Attività respiratoria dei mitocondri isolati dal fegato e dal muscolo scheletrico	p. 51
Grado di accoppiamento ed effetto disaccoppiante del palmitato in mitocondri isolati.....	p. 53
Quantificazione della p-Akt e dell'Akt nel fegato, nel muscolo schletrico e nel tessuto adiposo	p. 54
Perossidazione lipidica mitocondriale nel fegato e nel muscolo scheletrico	p. 55

Attività specifica della SOD nel fegato e nel muscolo scheletrico	p. 56
Preparazione ed analisi del tessuto adiposo	p. 58
Misura del diametro degli adipociti	p. 58
Isolamento degli adipociti sottocutanei e viscerali e misura della capacità lipolitica in vitro	p. 59
Analisi statistiche	p. 60
RISULTATI.....	p. 61
Primo disegno sperimentale	p. 61
Secondo disegno sperimentale	p. 68
Terzo disegno sperimentale	p. 78
DISCUSSIONE.....	p. 90
CONCLUSIONI.....	p. 101
BIBLIOGRAFIA CITATA	p. 104
BIBLIOGRAFIA CONSULTATA	p. 120

INTRODUZIONE

Gli esseri umani e molti mammiferi tendono a sovralimentarsi se sottoposti ad una dieta gustosa e questa semplice osservazione sottolinea l'importanza delle proprietà sensoriali dei cibi nella nostra alimentazione. Tra i fattori che rendono un alimento appetibile, il sapore dolce è preferito da molti. Questa naturale attrazione per i cibi dolci è responsabile del notevole consumo di zuccheri da parte degli uomini moderni.

Gli zuccheri sono dolcificanti naturali e i più comuni nella nostra alimentazione sono il saccarosio, il fruttosio ed il glucosio. Il fruttosio ed il glucosio sono monosaccaridi presenti in piccole quantità nella frutta e nel miele, mentre il saccarosio, un disaccaride formato da una molecola di glucosio legata ad una molecola di fruttosio attraverso un legame α -1,2-glicosidico, si trova in notevoli quantità nella canna da zucchero e nelle barbabietole. Il fruttosio è utilizzato dalle industrie alimentari per il suo potere dolcificante superiore del 33% rispetto a quello del glucosio, mentre lo sciroppo di mais ad alto contenuto di fruttosio (HFCS) è utilizzato, oltre che per il suo potere dolcificante, per il suo basso costo. L'HFCS è costituito per il 55% di fruttosio e per il 45% di glucosio, si ricava dal mais ed è presente nel pane fabbricato, nelle merendine, nei biscotti, nello yogurt e nelle bevande gasate. Il consumo di fruttosio libero è notevolmente aumentato tra il 1970 e il 2007, come illustrato da curve esponenziali impressionanti [Bray GA et al, 2004]. Tuttavia, questo incremento si è verificato solo a causa del maggiore consumo di HFCS, in cui il fruttosio è nella sua forma libera, ed è stato accompagnato da una diminuzione del consumo di fruttosio legato al glucosio nel saccarosio. Inoltre dato il basso indice glicemico del fruttosio e il fatto che il suo metabolismo non richiede strettamente la secrezione di insulina, diversi studi hanno valutato la possibilità di sostituire il glucosio con il fruttosio come dolcificante per i pazienti diabetici. Questi studi hanno riportato risultati contrastanti, in parte spiegati con le variazioni delle condizioni sperimentali (durata del trattamento, tipo di carboidrati sostituiti con il fruttosio nella dieta, ecc.).

Solo circa la metà di essi ha riportato una significativa riduzione della glicemia. Tuttavia, questi studi sottolineano che il fruttosio induce un sostanziale aumento dei trigliceridi e un abbassamento delle lipoproteine ad alta densità (HDL-colesterolo).

Gli studi condotti sull'epidemiologia dell'obesità indicano che l'incremento nel consumo di fruttosio o di HFCS nell'alimentazione corrisponde ad un aumento dell'obesità e di conseguenza ad un aumento nello sviluppo della sindrome metabolica.

CAPITOLO 1. IL FRUTTOSIO

1.1. Il metabolismo del fruttosio

Il fruttosio è un esoso con formula chimica ($C_6H_{12}O_6$) identica a quella del glucosio, vi differisce solo per la presenza di un gruppo chetonico in posizione 2 della sua catena carboniosa, al posto di un gruppo aldeidico in posizione 1 della catena carboniosa del glucosio. In soluzione può presentarsi o come α - o β - piranoside e furanoside.

Il fruttosio proveniente dall'ingestione di fruttosio puro, saccarosio o di HFCS, giunto nel lume intestinale, è trasportato all'enterocita attraverso un trasportatore specifico, il GLUT-5, localizzato a livello della membrana apicale dell'enterocita. Contrariamente al glucosio non richiede l'idrolisi di ATP ed è indipendente dall'assorbimento di Na. Una volta all'interno dell'enterocita diffonde nei vasi sanguigni grazie ad un altro trasportatore, il GLUT-2, presente sulla membrana basolaterale dell'enterocita. Nell'enterocita una parte del fruttosio viene convertita in lattato e rilasciata nella circolazione portale. Questa produzione intestinale di lattato appare specifica per il fruttosio. La somministrazione di fruttosio induce anche un lieve aumento della produzione intestinale di glucosio, suggerendo che i triosi fosfati sono convertiti in glucosio nell'enterocita. La presenza della glucosio-6-fosfatasi attiva nell'intestino dell'uomo e dei roditori è, infatti, coerente con l'attività gluconeogenica presente nell'intestino [Rajas F et al, 1999]. Il significato funzionale di questo meccanismo intestinale del fruttosio resta tuttora sconosciuto. Esso, tuttavia, suggerisce che la gluconeogenesi intestinale può esercitare effetti sul metabolismo periferico e sull'introito di cibo attraverso riflessi neurali suscitati dall'attivazione di sensori portali del glucosio [Mithieux G et al, 2005].

In seguito all'assorbimento intestinale, il fruttosio attraversa la circolazione portale e giunge rapidamente al fegato. L'assorbimento a livello epatico è mediato da un trasportatore, il GLUT-2. Nell'epatocita il fruttosio viene convertito in fruttosio-6-fosfato dall'enzima fruttochinasi, altamente specifico per il fruttosio ($K_m=0.5$ mM). La deficienza ereditaria della fruttochinasi conduce ad una lieve patologia, la "fruttosuria", caratterizzata dall'escrezione di fruttosio nelle urine [Hommes FA et al, 1993]. La fruttosuria rende chiaro che il fruttosio, sfuggito al metabolismo epatico, è scarsamente metabolizzato nei tessuti extraepatici.

Il fruttosio è ulteriormente convertito in trioso fosfato attraverso l'azione dell'aldolasi B. Il deficit dell'aldolasi B determina l'"intolleranza ereditaria al fruttosio", caratterizzata dalla presenza di ipoglicemia, in caso di ingestione di fruttosio, e dallo sviluppo di steatosi e cirrosi epatica.

Il metabolismo epatico del fruttosio differisce notevolmente da quello del glucosio per diversi motivi: in primo luogo, l'ingresso del glucosio nella via glicolitica è regolato dall'esochinasi IV, o glucochinasi. Quest'enzima ha una bassa affinità per il glucosio e di conseguenza il tasso di fosforilazione del glucosio cambia al variare della concentrazione portale di glucosio [Iynedjian PB et al, 1993]. Il glucosio-6-fosfato viene convertito a fruttosio-1,6-difosfato attraverso una reazione catalizzata dalla fosfofruttochinasi. L'attività della fosfofruttochinasi è inibita da ATP e citrato, e ciò permette di regolare la reazione in base allo stato energetico della cellula [Tornheim K et al, 1976]. Il fruttosio-1,6-difosfato è ulteriormente convertito in piruvato prima dell'entrata nel ciclo di Krebs. Complessivamente la conversione del glucosio in piruvato è regolata dall'insulina, che stimola l'espressione genica della glucochinasi e l'attivazione degli enzimi glicolitici in base allo stato energetico cellulare. Al contrario, la conversione di fruttosio a trioso fosfato si verifica indipendentemente dall'insulina, rapidamente per l'elevata affinità della fruttochinasi e in assenza di feedback negativo da ATP e citrato. Ciò porta ad una deplezione transitoria di fosfato libero e ad una diminuzione di ATP negli epatociti in risposta al fruttosio [Cortez-Pinto H et al, 1999]. Il trioso

fosfato prodotto dal fruttosio può essere successivamente convertito in piruvato ed ossidato a CO_2 e H_2O nel ciclo di Krebs. Una parte dei triosi fosfati prodotti viene convertita in lattato e rilasciata nella circolazione sistemica. Questo probabilmente spiega il notevole aumento delle concentrazioni plasmatiche di lattato osservate in seguito all'ingestione di fruttosio. La produzione di lattato indotta dal fruttosio può aumentare considerevolmente in seguito alla somministrazione intravenosa di fruttosio ed, occasionalmente, è associata all'acidosi lattica [Woods HF et al, 1972]. La maggior parte dei triosi fosfati prodotti dal fruttosio viene convertita in glucosio e glicogeno attraverso la gluconeogenesi. La produzione di glucosio non può essere considerata completamente indipendente dalla produzione di lattato. Infatti è stato dimostrato che nei ratti la maggior parte del fruttosio, raggiunta la circolazione portale, viene assorbita dagli epatociti periportalì, dove il fruttosio è trasformato per buona parte in glucosio, mentre il lattato è rilasciato negli epatociti perivenosi. Ciò suggerisce che la produzione di lattato, indotta dal fruttosio, deriva dalla conversione, negli epatociti periportalì, di fruttosio in glucosio, che, successivamente, passa negli epatociti perivenosi e viene convertito tramite la glicolisi a lattato [Burns SP et al, 2000].

Infine negli epatociti una parte del fruttosio può essere convertita in acidi grassi attraverso la lipogenesi de novo. L'esistenza di questo processo è dimostrata dall'osservazione che nel ratto in vivo e negli epatociti di ratto isolati la somministrazione di fruttosio marcato con ^{14}C porta all'immagazzinamento di lipidi nel fegato. Infatti la stimolazione della lipogenesi de novo epatica può essere comprovata, in seguito ad un'elevata somministrazione di fruttosio e di una miscela di fruttosio e glucosio, andando a monitorare l'incorporazione di acetato marcato con ^{14}C nelle VLDL [Parks EJ et al, 2008]. I dati in vitro indicano che, in seguito a somministrazione di fruttosio, il lattato, piuttosto che il trioso fosfato, è il principale precursore lipogenico e che l'attivazione della piruvato-deidrogenasi è un passo importante in questo processo. Allo stesso tempo il fruttosio inibisce l'ossidazione epatica dei lipidi in modo da favorire la riesterificazione degli acidi grassi e la sintesi delle VLDL.

Un altro effetto metabolico dell'eccessiva assunzione del fruttosio è l'aumento della concentrazione intraepatica di fruttosio-1-fosfato. Questo incremento esplica importanti effetti indiretti sul metabolismo epatico del glucosio attraverso la modulazione dell'attività della glucochinasi. La glucochinasi epatica è l'enzima che catalizza la formazione di glucosio-6-fosfato ed ha un ruolo regolatorio chiave nel metabolismo epatico del glucosio. Una diminuzione dell'attività della glucochinasi, in soggetti con mutazioni eterozigoti del gene che codifica per l'enzima, induce un decremento della glicogenosintesi postprandiale epatica [Velho G et al, 1996]. La glucochinasi agisce anche come sensore epatico della glicemia ed inibisce, in condizioni di iperglicemia portale, il rilascio del glucosio epatico, un processo compromesso nei pazienti con mutazioni della glucochinasi. L'attività della glucochinasi è modulata dalla concentrazione di glucosio e da una proteina regolatoria che agisce da inibitore competitivo del glucosio nel legame con la glucochinasi. Il fruttosio-1-fosfato, a basse concentrazioni, funge da antagonista della proteina regolatoria incrementando l'attività della glucochinasi. Di conseguenza, l'assunzione di piccole quantità di fruttosio insieme al glucosio può migliorare lo smaltimento epatico del glucosio [Donmoyer CM et al, 2001].

L'aumento della concentrazione plasmatica del fruttosio, in seguito alla sua ingestione, rimane nel range micromolare, indicando che l'assorbimento epatico è circa del 100%. Di conseguenza il metabolismo del fruttosio in condizioni normali non si verifica in misura significativa nelle cellule extraepatiche. Quando il fruttosio è somministrato per via parenterale, la sua concentrazione plasmatica aumenta a 1-2 mM; anche in tali condizioni il metabolismo extraepatico del fruttosio si verifica a bassissimi livelli, poiché le cellule extraepatiche non esprimono la fruttochinasi e l'esochinasi presenta una bassa affinità [Mayes PA et al, 1993]. Pertanto, la funzionalità del GLUT 5, espresso anche nel rene e nel tessuto adiposo, resta sconosciuta. Da vari studi è emerso che, in seguito all'infusione di alte dosi di fruttosio, la sua concentrazione plasmatica aumenta a 3 mM e il rene assorbe il 20% del fruttosio totale [BjorKman

O et al, 1989]. Tuttavia tale assorbimento extraepatico di fruttosio è improbabile che si verifichi in condizioni fisiologiche.

1.2. Gli effetti a lungo termine del fruttosio

Numerosi studi hanno dimostrato che le diete ad elevato contenuto di fruttosio/saccarosio portano a diversi effetti negativi, come la dislipidemia, l'ipertensione e l'iperuricemia [Bizeau ME, Pagliassotti MJ, 2005].

E' da tempo riconosciuto che la somministrazione di una dieta ad elevato contenuto di fruttosio per più di 1 settimana aumenta i livelli di trigliceridi totali e delle VLDL all'interno del plasma, sia nei volontari sani che nei pazienti con insulino-resistenza o diabete di tipo 2. In alcuni di questi studi è stato anche riscontrato un aumento del colesterolo totale [Bantle JP et al, 1986]. Il fruttosio è altamente lipogenico, poiché fornisce grandi quantità di triosofosfati epatici come precursori per la sintesi degli acidi grassi. Infatti, in diversi studi è stato osservato che la lipogenesi de novo epatica viene stimolata dopo l'ingestione acuta di fruttosio, con il contributo del fruttosio alla sintesi di entrambe le parti dei trigliceridi delle VLDL, il glicerolo e gli acil-CoA [Chong MF et al, 2007]. Inoltre, il fruttosio potrebbe aumentare l'espressione di enzimi lipogenici chiave nel fegato: è stato dimostrato che stimola l'espressione del fattore di trascrizione SREBP-1c, l'induttore principale della lipogenesi de novo epatica [Matsuzaka T et al, 2004], e questo fenomeno sembra essere indipendente dai cambiamenti della concentrazione di insulina [Matsuzaka T et al, 2004]. E' stato ulteriormente dimostrato che questo effetto del fruttosio su SREBP-1c richiede il coattivatore 1β del recettore γ attivato da proliferatori perossisomali (PGC- 1β). Il fruttosio attiva anche il fattore di trascrizione epatico noto come proteina legante elementi di risposta ai carboidrati (ChREBP), che fa aumentare l'espressione della sintasi epatica degli acidi grassi e dell'acetil-CoA carbossilasi [Denechaud PD et al, 2008]. Una dieta ad elevato contenuto di fruttosio aumenta l'espressione

dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi, il primo enzima coinvolto nella via dell'esoso monofosfato, e si ritiene che i substrati intermedi dello shunt dell'esoso monofosfato siano fattori responsabili dell'attivazione di ChREBP [Koo HY et al, 2008].

Il ruolo svolto dalla stimolazione della lipogenesi de novo epatica nell'ipertrigliceridemia indotta dal fruttosio è supportato, innanzitutto, dalla correlazione positiva osservata tra la lipogenesi de novo epatica ed i trigliceridi a digiuno in soggetti sani alimentati con una dieta isocalorica ad elevato contenuto di zucchero [Hudgins LC et al, 2000] o con una dieta ipercalorica ad elevato contenuto di fruttosio ed inoltre dal fatto che una supplementazione con olio di pesce per 2 settimane riduce sia la lipogenesi de novo epatica che i trigliceridi a digiuno in soggetti sani sovralimentati con fruttosio [Faeh D et al, 2005]. Oltre a questo aumento del livello di trigliceridi plasmatici a digiuno, l'acuta somministrazione di fruttosio porta anche ad un incremento post-prandiale dei trigliceridi nel plasma attraverso l'alterazione della clearance delle lipoproteine ricche in trigliceridi [Chong MF et al, 2007]. Lo stesso effetto è stato osservato con un apporto cronicamente elevato di fruttosio. Nelle donne in sovrappeso, la circolazione dei trigliceridi post-prandiali viene aumentata dal consumo di bevande zuccherate con fruttosio per un periodo di 10 settimane, indicando che il fruttosio compromette effettivamente la clearance dei trigliceridi [Swarbrick MM et al, 2008]. Ciò suggerisce che l'alterata clearance delle lipoproteine ricche in trigliceridi contribuisce alla iperlipidemia indotta da diete ad elevato contenuto di zucchero e ad elevato contenuto di fruttosio [Parks EJ, Hellerstein MK, 2000]. Questo effetto del fruttosio risulta significativamente aumentato in donne obese iperinsulinemiche rispetto a donne normopeso, suggerendo che il fruttosio potrebbe danneggiare l'omeostasi dei lipidi maggiormente negli individui insulino-resistenti [Teff KL et al, 2009]. E' interessante notare che la somministrazione di quantità equivalenti di fruttosio puro, saccarosio, miscele di glucosio e fruttosio o HFCS porta ad un aumento simile dei trigliceridi post-prandiali; dal momento che il saccarosio, la miscela di glucosio e fruttosio e HFCS contengono approssimativamente la metà della quantità di fruttosio

somministrata con fruttosio puro, si deduce che la coingestione di glucosio e fruttosio potenzia significativamente l'effetto ipertrigliceridemico del fruttosio [Stanhope KL et al, 2008].

I vari studi di cui si è discusso in precedenza hanno affrontato gli effetti iperlipidemici del fruttosio somministrando diverse quantità di fruttosio/saccarosio con l'alimentazione. Poiché molti degli studi sopra menzionati hanno utilizzato una quantità elevata di fruttosio alimentare, gli effetti dell'assunzione abituale di fruttosio sui trigliceridi del plasma rimangono controversi. Una meta analisi [Livesey G, Taylor R, 2008], che tiene conto dei risultati di tutti gli studi pubblicati che hanno valutato gli effetti del fruttosio alimentare (esclusi gli studi fatti con HFCS), conclude che un apporto di fruttosio maggiore di 50 g/giorno (cioè vicino all'assunzione giornaliera media negli Stati Uniti) è associato ad un aumento post-prandiale dei trigliceridi circolanti, mentre un apporto di fruttosio maggiore di 100 g/giorno è associato ad un aumento dei trigliceridi a digiuno.

1.3. Depositi ectopici di lipidi nel fegato e nel muscolo

Oltre ad alterare il profilo dei lipidi plasmatici, il fruttosio può anche modulare la deposizione intracellulare ectopica di lipidi (cosiddetti "lipidi ectopici"), cioè la deposizione di trigliceridi nel citoplasma delle cellule non adipose, come epatociti, fibre muscolari o cellule endocrine [Unger RH, 2003]. Questa deposizione ectopica di lipidi nel fegato e nel muscolo scheletrico è strettamente associata all'insulino-resistenza tessuto-specifica [Unger RH, 2003]. Nel caso della somministrazione di fruttosio, questo effetto potrebbe coinvolgere una stimolazione della lipogenesi de novo, sia attraverso una aumentata sintesi intraepatica di triosofosfati precursori, sia attraverso una incrementata espressione di geni lipogenici. A livello molecolare, è stato suggerito che i meccanismi potrebbero coinvolgere una inibizione del PPAR α nelle cellule del fegato, una stimolazione della lipogenesi de novo epatica e una ridotta ossidazione lipidica epatica [Roglans N et al, 2007]. E' stato dimostrato che questa deposizione di grasso intraepatico in risposta al fruttosio richiede PGC-1 β , che potrebbe servire da coattivatore di SREBP-1c.

Negli esseri umani, l'accumulo di grasso seguente l'ingestione di fruttosio sembra essere poco documentato. E' stato riferito che la sovralimentazione di volontari maschi sani con 1.5 g di fruttosio per Kg di peso corporeo al giorno (corrispondente grossomodo al contenuto di 2 litri di bevanda soda standard) non altera in modo significativo il contenuto di grasso nel muscolo o nel fegato [Lê KA et al, 2006]. Tuttavia, la somministrazione di una dose doppia di fruttosio, per più di soli 7 giorni, induce un significativo aumento del contenuto di grasso epatico ed intramiocellulare [Lê KA et al, 2009]. L'aumento del grasso intraepatico correla positivamente con l'aumento dei trigliceridi (TG) delle VLDL a digiuno, suggerendo che questi due eventi potrebbero essere azionati da un meccanismo comune, presumibilmente la stimolazione della lipogenesi de novo epatica. E' interessante notare che l'aumento del contenuto dei trigliceridi delle VLDL nel plasma e del grasso intraepatico risulta maggiore nella progenie non diabetica dei pazienti con diabete mellito di tipo 2. Ciò suggerisce che gli effetti metabolici del fruttosio potrebbero dipendere dal contesto genetico. Tenuto conto del fatto che i figli di soggetti affetti da diabete hanno una sensibilità all'insulina inferiore rispetto agli individui senza una storia familiare di diabete, è legittimo pensare che gli effetti dislipidemici del fruttosio siano favoriti dalla presenza di insulino-resistenza [Lê KA et al, 2009].

La stimolazione della sintesi di acidi grassi dipende dalla non regolata produzione di trioso-P, e secondariamente di acetyl-CoA, e dall'aumento dell'espressione di geni lipogenici chiave indotto da assunzioni cronicamente elevate di fruttosio. Una dieta ad elevato contenuto di fruttosio stimola SREBP-1c e ChREBP attraverso meccanismi sconosciuti; sono stati proposti la stimolazione della via dell'esoso-monofosfato e l'aumentata concentrazione di metaboliti come lo xilulosio-5-fosfato. La coattivazione di SREBP-1c da parte di PGC-1 β sembra essere coinvolta.

1.4. Compromessa omeostasi glicemica ed insulino-resistenza

La relazione tra l'alterato metabolismo lipidico e la resistenza all'insulina è ormai ben documentata. Mentre inizialmente si pensava che l'aumento della concentrazione degli acidi grassi non esterificati (NEFA) fosse l'attore principale nell'insulino-resistenza indotta dai lipidi, oggi è generalmente ammesso che sia l'elevata concentrazione di NEFA che di trigliceridi plasmatici sono correlate alla resistenza all'insulina [Shulman GI, 2000]. Diversi studi hanno evidenziato l'effetto deleterio del fruttosio sul metabolismo del glucosio e sulla sensibilità all'insulina.

In effetti, una dieta ad elevato contenuto di fruttosio aumenta la risposta glicemica e quella insulinemica ad un carico di saccarosio [Hallfrisch J et al, 1983], aumenta la glicemia a digiuno [Liu J et al, 2006] e porta alla resistenza epatica all'insulina in uomini sani [Faeh D et al, 2005]. L'insulino-resistenza è strettamente legata ai disturbi del metabolismo lipidico, più specificamente i soggetti insulino-resistenti hanno una maggiore deposizione ectopica di lipidi che potrebbero generare metaboliti tossici, come diacilglicerolo, acil-CoA, e ceramidi. La presenza di questi metaboliti nell'ambiente intracellulare porta ad una maggiore fosforilazione su serina/treonina del substrato di risposta all'insulina 1 (IRS-1), riducendo, in tal modo, l'effetto dell'insulina a livello cellulare [Shulman GI, 2000].

Anche se nella maggior parte degli studi il fruttosio induce sia l'insulino-resistenza epatica che l'alterato metabolismo lipidico epatico/extraepatico, alcune osservazioni suggeriscono che questi due effetti potrebbero essere indipendenti. Infatti, nei maschi sani, la sovralimentazione con fruttosio incrementa la lipogenesi de novo epatica e i trigliceridi plasmatici e riduce la sensibilità epatica all'insulina; in tali condizioni la supplementazione con olio di pesce, che inibisce la lipogenesi de novo, riduce i trigliceridi del plasma in modo efficiente, ma non riesce a normalizzare la sensibilità epatica all'insulina [Faeh D et al, 2005]. Inoltre, negli esseri umani, una dieta ad

elevato contenuto di fruttosio può aumentare la deposizione lipidica intraepatica, anche se la sensibilità epatica all'insulina rimane invariata [Le KA et al, 2009].

E' stato anche dimostrato che la somministrazione di fruttosio esercita un marcato stress ossidativo sull'organismo [Busserolles J et al, 2003]. Fornendo il fruttosio con il miele, che è naturalmente ricco di sostanze antiossidanti, si ostacolano sia lo stress ossidativo indotto dal fruttosio sia la riduzione della sensibilità all'insulina [Busserolles J et al, 2002].

Il fruttosio potrebbe eventualmente anche diminuire la sensibilità all'insulina attraverso cambiamenti della flora microbica intestinale e/o alterazioni della permeabilità intestinale. E' ormai riconosciuto che la resistenza all'insulina nei pazienti obesi è associata a markers di infiammazione, come la proteina C-reattiva o citochine proinfiammatorie, e con l'infiammazione del tessuto adiposo [Grimble RF, 2002]. Recentemente è stato osservato che una dieta ad elevato contenuto di grassi può portare ad una maggiore permeabilità intestinale e ad alterazioni della flora batterica intestinale, così comportando un aumento della concentrazione plasmatica di lipopolisaccaridi batterici o endotossine. A sua volta, un basso grado di endotossinemia attiva vie infiammatorie e danneggia l'azione dell'insulina, portando allo sviluppo di insulino-resistenza [Cani PD et al, 2007]. Come una dieta ricca di grassi, una dieta ad elevato contenuto di fruttosio ha mostrato di aumentare la concentrazione plasmatica di endotossine [Thuy S et al, 2008]. Inoltre, i topi nutriti con una dieta ad elevato contenuto di fruttosio sembrano protetti sia contro l'endotossinemia che contro l'infiltrazione epatica di grasso in seguito ad un trattamento antibiotico, suggerendo che parte degli effetti metabolici del fruttosio sono mediati da cambiamenti della flora microbica intestinale [Bergheim I et al, 2008].

In sintesi, non c'è dubbio che un'alimentazione ad elevato contenuto di fruttosio possa causare resistenza all'insulina, però le interazioni tra assunzione di fruttosio e di grasso o apporto energetico totale devono essere ben valutate. L'alterato metabolismo lipidico e la lipotossicità secondaria alla stimolazione della lipogenesi de novo o lo stress ossidativo indotto dal fruttosio

potrebbero essere fattori che mettono in relazione il fruttosio e la resistenza all'insulina. Inoltre, il fruttosio potrebbe compromettere la funzione endoteliale attraverso un incremento della produzione di acido urico, contribuendo così alla cosiddetta insulino-resistenza “pre-recettoriale”.

CAPITOLO 2. IL MUSCOLO SCHELETRICO

Un'elevata introduzione di fruttosio induce profonde conseguenze metaboliche che predispongono gli individui al diabete di tipo 2 e patologie cardiovascolari: a livello epatico si sviluppano insulino-resistenza, un'elevata lipogenesi de novo e deposizione di lipidi ectopici; quest'aumento della lipogenesi de novo comporta un aumento dei lipidi circolanti ed un aumento del loro apporto al muscolo scheletrico; in più, diversi dati in letteratura hanno definito un potenziale collegamento tra la condizione di insulino-resistenza e le alterazioni mitocondriali nel muscolo scheletrico [Boushel R et al, 2007]; il muscolo scheletrico risulta essere parte integrante del processo che porta all'insulino-resistenza e rappresenta un importante deposito di glucosio nella fase postprandiale [Karlsson HK et al, 2006]. Nel muscolo scheletrico l'alterazione della biologia mitocondriale si è riscontrata in alcuni soggetti con insulino-resistenza diversi anni prima del manifestarsi del diabete [Patti ME et al, 2003]. Inoltre, l'alterazione dei mitocondri in tale tessuto è stata definita come una condizione necessaria e sufficiente per lo stabilirsi dello stesso diabete mellito di tipo 2 (T2DM). Tuttavia, è ancora da chiarire se le alterazioni relative a questo organello risultino essere centrali nella fisiopatologia dell'insulino-resistenza [Holloszy JO, 2009].

2.1. Efficienza mitocondriale ed insulino-resistenza

L'accumulo di lipidi in una cellula muscolare può interferire con la segnalazione dell'insulina, causando così insulino-resistenza. In accordo con questa ipotesi è stata trovata negli uomini una forte correlazione tra l'accumulo di grasso nei muscoli scheletrici e la resistenza all'insulina [McGarry LY, 2002]. Inoltre alti livelli di lipidi intramiocellulari (IMCL) ed insulino-resistenza sono stati trovati in pazienti con diabete di tipo 2 [Goodpaster BH et al, 2001] e in

soggetti non diabetici ad alto rischio, con una storia familiare di diabete [Jacob R et al, 1999]. Tuttavia gli elevati livelli di IMCL non portano necessariamente alla resistenza all'insulina, dal momento che sono presenti anche nel muscolo di atleti di resistenza allenati, che sono altamente sensibili all'insulina [Goodpaster BH et al, 2001]. L'ipotesi emergente è che l'accumulo di grasso intramuscolare è deleterio quando l'apporto di lipidi al muscolo scheletrico non è compensato da un aumento dei percorsi ossidativi, il che porta alla formazione e all'accumulo nella cellula di intermedi tossici, come ceramidi e diacilglicerolo, che interferiscono con il sistema di segnalazione dell'insulina [Kelley DE, Mandarino LJ, 2000]: per questo un ruolo chiave viene svolto dalla capacità ossidativa cellulare. I mitocondri sono il sito cellulare principale per l'ossidazione degli acidi grassi ed è quindi stato proposto un ruolo della disfunzione mitocondriale nell'insorgenza della resistenza all'insulina nel muscolo scheletrico; diversi studi hanno valutato le possibili alterazioni mitocondriali in condizioni di obesità e diabete, sia negli esseri umani che nel modello animale.

Gli studi sull'uomo hanno dimostrato che i soggetti con diabete di tipo 2 esibiscono alterazioni nella morfologia mitocondriale, nonché una diminuzione dell'attività della catena respiratoria [Kelley DE et al, 2002]. Altri studi hanno mostrato una riduzione coordinata nell'espressione di geni che codificano per enzimi chiave del metabolismo ossidativo mitocondriale in pazienti diabetici e in soggetti non diabetici ad alto rischio con una storia familiare di diabete [Mootha VK et al, 2003]. Petersen et al (2003) hanno riportato una diminuzione del 40% del metabolismo ossidativo in soggetti anziani, che presentavano alti livelli di grasso intramuscolare ed insulino-resistenza muscolare, suggerendo che un declino della funzionalità mitocondriale associato all'età potrebbe contribuire allo sviluppo di resistenza all'insulina; hanno anche trovato che i livelli di IMCL e ATP sintasi erano rispettivamente dell'80% più alti e del 30% più bassi nei soggetti insulino-resistenti [Petersen KF et al, 2004]. Szendroedi et al (2007) hanno osservato che in vivo la velocità di sintesi dell'ATP diminuiva del 27% in pazienti diabetici, mentre in altri studi in vivo la

funzione mitocondriale era compromessa del 45% in pazienti con diabete di tipo 2, anche se il contenuto di IMCL era simile tra i gruppi, suggerendo che una compromessa funzione mitocondriale può essere più determinante nell'insorgenza del diabete di tipo 2, rispetto ai livelli di IMCL [Schrauwen-Hinderling VB et al, 2007]. Presi insieme, questi studi dimostrano che in vivo la funzione mitocondriale è ridotta nei soggetti insulino-resistenti e/o in pazienti con diabete di tipo 2. Questa diminuzione potrebbe portare ad un accumulo di grasso nel muscolo, ma anche ad una minore disponibilità di ATP per i trasporti di membrana e per le vie di trasduzione del segnale, contribuendo in tal modo allo sviluppo di resistenza all'insulina. Tuttavia altre osservazioni non sostengono l'ipotesi che la disfunzione mitocondriale sia alla base dello sviluppo di diabete mellito di tipo 2 o dell'accumulo di grasso intramuscolare [Hancock CR et al, 2008]. Infatti numerosi studi sostengono l'ipotesi che l'accumulo di grasso muscolare può precedere lo sviluppo della disfunzione mitocondriale e/o che la resistenza all'insulina si verifica quando la funzione mitocondriale non è danneggiata o addirittura è migliorata [Turner N et al, 2007]. Ad esempio una capacità ossidativa immutata o migliorata è stata riscontrata in topi o ratti che presentano resistenza all'insulina dopo la somministrazione di una dieta ricca in grassi [Turner N et al, 2007]. Questi dati suggeriscono che diete ad alto contenuto di grassi nei roditori, anche se portano insulino-resistenza, non determinano la disfunzione mitocondriale, ma piuttosto conducono al miglioramento della capacità ossidativa mitocondriale. Altri ricercatori hanno osservato il periodo di tempo in cui cambia la funzionalità dei mitocondri del muscolo scheletrico in risposta ad un'alimentazione ad alto contenuto di grassi. Chanseume et al (2007) hanno mostrato un aumento transitorio dell'attività della fosforilazione ossidativa dopo 14 giorni di trattamento dietetico, ma un calo significativo a 40 giorni. Laurent et al (2007) hanno dimostrato nei ratti che i tassi di sintesi di ATP sono diminuiti del 50% entro 24 ore, e tornati a valori normali dopo 2/3 settimane di dieta ricca in grassi, e di nuovo diminuiti del 30-50% dopo 1 mese. Infine Bonnard et al (2008) hanno mostrato che 1 mese di alimentazione con dieta ricca di grassi e saccarosio induce intolleranza al glucosio nei

topi senza disfunzione mitocondriale, evidente dopo 16 settimane di trattamento. Presi insieme questi studi sono coerenti con l'ipotesi che la disfunzione mitocondriale può essere una conseguenza piuttosto che una causa dell'accumulo di grasso a livello muscolare, ma questo non esclude la possibilità che la disfunzione mitocondriale potrebbe a sua volta indurre resistenza all'insulina.

L'attività fisica è uno dei principali regolatori della funzione mitocondriale nel muscolo scheletrico e l'esercizio fisico attiva fortemente la biogenesi mitocondriale, mentre l'inattività cronica è associata ad un ridotto numero di mitocondri [Hoppeler H, Fluck M, 2003]. Obesità e altri disturbi metabolici sono collegati con ridotta attività fisica e un aumento di comportamenti sedentari [Hamilton MT et al, 2007]. Così è possibile che alcuni difetti mitocondriali riportati in soggetti sovrappeso o obesi o insulino-resistenti possono in parte essere spiegati da bassi livelli di attività fisica. A questo proposito i modelli animali sono strumenti di studio molto utili, poiché i ratti tenuti in laboratorio mostrano un comportamento sedentario, a causa delle condizioni standard di stabulazione [Spangenberg EM et al, 2005] e pertanto è possibile effettuare studi volti a chiarire il legame tra la resistenza all'insulina ed il funzionamento mitocondriale, senza l'effetto che confonde dei cambiamenti nell'attività fisica.

Un'altra possibile ragione della discrepanza tra i vari risultati pubblicati sull'argomento è la scelta del parametro da studiare nella valutazione della funzione mitocondriale. Infatti se l'ipotesi è che la ridotta ossidazione mitocondriale di acidi grassi provoca la deposizione ectopica di grasso, che a sua volta provoca l'insorgenza d'insulino-resistenza, tutti i fattori che contribuiscono all'ossidazione mitocondriale dei lipidi devono essere presi in considerazione. L'ossidazione mitocondriale di combustibili metabolici dipende non solo dal numero e dall'attività degli organelli, ma anche dall'efficienza energetica della macchina mitocondriale nel sintetizzare ATP a seguito dell'ossidazione dei combustibili. Cambiamenti in ciascuno di questi tre fattori potrebbe

teoricamente influenzare l'ossidazione dei lipidi, che deve essere quindi valutata per confermare o confutare quest'ipotesi. Molti studi sul tema della disfunzione mitocondriale nell'insulino-resistenza hanno focalizzato l'attenzione sulla compromissione mitocondriale in termini di riduzione della massa o della capacità ossidativa mitocondriale. Tuttavia è noto che la quantità di combustibile ossidato dalla cellula è determinata principalmente dal turnover dell'ATP piuttosto che dall'attività ossidativa mitocondriale [Boveris A et al, 2000] e quindi nel muscolo scheletrico a riposo le variazioni del numero e/o dell'attività degli organelli potrebbero non avere conseguenze sulla bioenergetica cellulare, mentre modifiche nell'efficienza energetica mitocondriale possono certamente alterare la quantità dei combustibili ossidati, anche se l'utilizzo di ATP non varia. Infatti l'efficienza con cui le calorie della dieta vengono convertite in ATP è determinata dall'efficienza di accoppiamento della fosforilazione ossidativa. Se la catena respiratoria è altamente efficiente nel pompare protoni al di fuori della membrana mitocondriale interna e la sintesi di ATP è efficace nel convertire il flusso di protoni in ATP (dall'ADP), allora i mitocondri genereranno massimo ATP e minimo calore per caloria: questi mitocondri sono detti "strettamente accoppiati". Al contrario se l'efficienza di pompaggio dei protoni è ridotta e/o più protoni sono richiesti per formare ogni molecola di ATP, allora ogni caloria produrrà meno ATP, ma più calore: tali mitocondri sono detti "scarsamente accoppiati". Pertanto l'efficienza di accoppiamento determina il bilancio delle calorie utilizzate per produrre ATP o per generare calore. Resta ancora da stabilire se, in condizioni di alto contenuto di grassi cellulari la domanda di ATP è alterata, un parametro che può essere valutato solo in animali vivi [Amara CE et al, 2008]. I dati noti relativi all'efficienza energetica dei mitocondri del muscolo scheletrico in condizioni di insulino-resistenza indotta dall'obesità sono scarsi. Utilizzando un modello di ratto con obesità indotta da una dieta ad alto contenuto di grassi, è stato dimostrato che dopo 1 e 2 settimane di trattamento dietetico l'efficienza mitocondriale del muscolo scheletrico è aumentata, dando così luogo ad una combustione ridotta dei substrati energetici [Crescenzo R et al, 2014 A, b]. Questa modifica dell'efficienza mitocondriale si svolge in

un momento in cui la sensibilità all'insulina è ancora mantenuta. Pertanto questi risultati potrebbero essere coerenti con un ruolo per il danneggiamento mitocondriale nell'insorgenza di resistenza all'insulina. Infatti, se i mitocondri sono più accoppiati, meno substrati devono essere bruciati per ottenere la stessa quantità di ATP. Allo stesso tempo l'alimentazione ad alta percentuale di grassi è associata con un aumento del rifornimento di lipidi al muscolo scheletrico [Crescenzo R et al, 2014b], in modo che potrebbe verificarsi una condizione di squilibrio, poiché l'introito di lipidi supera il loro utilizzo, dando luogo ad una deposizione ectopica. In accordo è stato trovato anche un accumulo di trigliceridi nel muscolo scheletrico [Crescenzo R et al, 2014b]. Un simile aumento dell'efficienza mitocondriale è evidente anche dopo 2 settimane di una dieta ad alto contenuto di grassi e fruttosio [Crescenzo R et al, 2014b], ma in presenza di insulino-resistenza. Dato che l'efficienza energetica mitocondriale è superiore sia nei ratti con sensibilità all'insulina normale (dieta ricca in grassi) sia nei ratti con una diminuita sensibilità all'insulina (dieta ricca in grassi e fruttosio) si può ipotizzare che questa modifica possa contribuire all'insorgere di resistenza all'insulina.

In sintesi, sono numerose le prove che dimostrano la presenza della disfunzione mitocondriale nel diabete di tipo 2, anche se il problema che questa ridotta funzionalità mitocondriale sia casuale nello sviluppo della malattia non è ancora stato risolto, anche perché gli studi condotti finora hanno tenuto in considerazione molti parametri. Valutando le alterazioni in termini di efficienza mitocondriale e del suo impatto sull'omeostasi metabolica delle cellule muscolari scheletriche si può ipotizzare che un aumento dell'efficienza mitocondriale precede e può quindi contribuire allo sviluppo di resistenza all'insulina nel muscolo scheletrico.

CAPITOLO 3. RUOLO DEL TESSUTO ADIPOSO NELLO SVILUPPO DELL'OBESITÀ

3.1. Il tessuto adiposo: funzioni e caratteristiche

Il tessuto adiposo è stato a lungo ignorato perché considerato unicamente come sede di riserva energetica. Negli ultimi vent'anni però c'è stato un aumento di interesse, dovuto all'incremento dell'incidenza dell'obesità e delle complicanze ad essa associate. Questo ha consentito di riconoscere che il tessuto adiposo, sito principale di insulino-resistenza, nonché vero e proprio organo endocrino, prende parte all'omeostasi di numerosi processi biologici, molti dei quali regolati dall'insulina. Esso è infatti coinvolto sia nella regolazione della massa grassa e nell'omeostasi dei nutrienti che nella risposta immunitaria, nel controllo della pressione sanguigna, nell'emostasi, nel controllo delle funzioni tiroidee e del sistema riproduttivo.

Il tessuto adiposo bianco (WAT) viene così chiamato perché al microscopio si presenta come una massa bianco-giallastra, la cui colorazione è dovuta alla presenza di carotenoidi. Esso è costituito da cellule uniloculari, il cui diametro varia da 50 μm a oltre 100 μm , contenenti una grande goccia lipidica priva di membrana che schiaccia il nucleo alla periferia della cellula e riduce il citoplasma ad un anello. Tutte queste cellule sono organizzate in gruppetti, chiamati lobuli, separati da tessuto connettivo.

Il WAT, presente nell'ipoderma, nel mesentere e nel mediastino, è il tipo di tessuto adiposo più diffuso nell'organismo e può essere diviso in due compartimenti, ovvero grasso sottocutaneo e viscerale, diversi fra loro per distribuzione e funzione, e rappresentanti, rispettivamente, l'80% ed il 20% del grasso corporeo totale [Arner P, 2003]. Il grasso viscerale, costituito essenzialmente dal grasso addominale, è la parte di tessuto adiposo concentrata all'interno della cavità addominale e

distribuita tra gli organi interni ed il tronco. Il grasso viscerale si differenzia da quello sottocutaneo, concentrato nell'ipoderma (lo strato più profondo della cute), e da quello intramuscolare, che è invece distribuito tra le fibre dei muscoli. L'eccesso di grasso addominale è definito dai termini "obesità centrale", "obesità addominale" ed "obesità androide"; con quest'ultimo termine si vuole sottolineare la tipica associazione del grasso viscerale con il sesso maschile ed i suoi ormoni (detti appunto androgeni). La necessità di differenziare questa forma di obesità da quella ginoide, tipica del sesso femminile e caratterizzata da accumuli adiposi concentrati nella metà inferiore dell'addome, nelle regioni dei glutei ed in quelle femorali, deriva dalla diversa influenza dei due fenotipi sul rischio di patologie. Tra i due tipi di obesità, quella addominale si è chiaramente dimostrata più pericolosa, tanto da essere considerata uno dei più importanti fattori di rischio di morbilità e mortalità per malattie cardiovascolari, nonché uno dei principali fattori di rischio per il diabete di tipo II. L'esagerato accumulo di grasso centrale è inoltre associato alle complicazioni tipiche della sindrome metabolica (ipertensione, iperlipidemia, steatosi epatica, aterosclerosi ed il già citato diabete di tipo II). La pericolosità del grasso viscerale è legata, almeno in parte, ad una differente velocità della lipolisi; infatti, negli adipociti viscerali il rilascio di acidi grassi liberi dai trigliceridi di deposito è più alto rispetto agli adipociti sottocutanei, sui quali l'insulina ha un effetto antilipolitico più pronunciato [Arner P, 2001]. Poiché gli acidi grassi liberi (FFA) rilasciati dal grasso viscerale addominale confluiscono nella vena porta, elevate quantità di FFA, derivanti dal metabolismo lipidico viscerale, sono inviate rapidamente e direttamente al fegato. Ciò stimola la produzione epatica di glucosio con aumento della gluconeogenesi e aumenta la sintesi dei trigliceridi e la produzione di VLDL con risultato ultimo dello sviluppo della dislipidemia.

3.2. Eterogeneità morfologica e funzionale tra depositi adiposi

Esistono delle differenze regionali nelle caratteristiche morfologiche e nella funzione del tessuto adiposo. I depositi differiscono nella composizione cellulare, nella micro vascolarizzazione, nell'innervazione, nelle caratteristiche metaboliche, nella composizione della matrice extracellulare, e nei prodotti secretori.

Generalmente, nelle donne gli adipociti viscerali sono più piccoli di quelli del sottocutaneo, mentre negli uomini e nelle donne estremamente obese hanno dimensioni simili. Il numero di cellule stromali (non adipociti) per grammo di tessuto adiposo è maggiore nell'omentale che nel sottocutaneo addominale. Sono state riportate inoltre differenze nelle popolazioni di preadipociti. Il tessuto adiposo sottocutaneo contiene il più alto numero di preadipociti [Tchkonina T et al, 2005].

Il WAT deposita più del 95% dei lipidi totali come lipidi neutrali, trigliceridi (TG), e li rilascia sottoforma di FFA e glicerolo in modi altamente regolati coinvolgendo diversi ormoni, enzimi e proteine.

3.2.1. Lipolisi

La lipolisi è definita come l'idrolisi dei TG in FFA e glicerolo. La lipasi (ATGL) idrolizza i trigliceridi in diacilglicerolo, che viene ulteriormente scisso in FFA e glicerolo dalla lipasi ormone sensibile (HSL, risponde agli stimoli beta-adrenergici) e dalla monoacilglicerolo lipasi. Una volta rilasciati dagli adipociti, gli FFA si legano all'albumina nella circolazione e sono trasportati al muscolo (ossidazione), fegato (sintesi o ossidazione di TG), e agli adipociti (riesterificazione). Il glicerolo è inviato al fegato e usato per la produzione di glucosio epatico, dal momento che nell'adipocita normalmente manca la glicerolochinasi.

Recenti studi indicano l'importanza delle proteine e delle lipasi associate alla goccia lipidica nell'alterata regolazione della lipolisi degli adipociti nell'obesità, ma il loro ruolo nelle differenze metaboliche tra adipociti dei vari depositi non è ancora chiaro. HSL e perilipina (una proteina della gocciolina lipidica che regola sia la lipolisi basale che stimolata), sono note essere differenzialmente espresse tra l'omentale e il sottocutaneo, contribuendo potenzialmente alle differenze della lipolisi tra i vari depositi [Wang Y et al, 2003].

Gli adipociti omentali presentano una lipolisi basale (spontanea) simile o più bassa, ma risposte più alte agli agonisti adrenergici [Bovin LF et al, 2007]. I livelli di espressione dei recettori adrenergici (AR) alfa 2 antilipolitici sono più bassi mentre i recettori (AR) beta lipolitici sono più alti nell'omentale, contribuendo a risposte più alte allo stimolo adrenergico in questi depositi [Lonnqvist F et al, 1997]. Gli adipociti omentali sono inoltre meno sensibili agli effetti antilipolitici dell'insulina in vivo; così, in alcune situazioni, cioè stress o stato post prandiale, il contributo degli FFA derivati dal tessuto adiposo viscerale può diventare più significativo, fino al 40% .

3.2.2. Sintesi e accumulo dei TG

Negli adipociti, i TG sono sintetizzati da FFA esterificati a glicerolo. La maggior parte degli FFA sono liberati tramite una lipoproteina lipasi (LPL) che rompe i TG in circolo (chilomicroni o VLDL), ma contribuisce anche l'assorbimento diretto degli FFA circolanti. L'attività dell'LPL nell'adipocita delle donne è più bassa nell'omentale che nel sottocutaneo addominale, mentre non c'è differenza di deposito in uomini obesi [Bovin LF et al, 2007]. In uomini non obesi o moderatamente obesi, la dimensione delle cellule adipose omentali e l'attività dell'LPL è più alta, soprattutto in quelli con un girovita intermedio. Una maggiore attività dell'LPL nell'uomo può favorire la preferenziale deposizione di grasso in depositi viscerali [Bovin LF et al, 2007]. Negli adipociti umani la sintesi de novo degli FFA a partire dal glucosio o da altri precursori è piuttosto

bassa nella maggior parte dei casi (ad eccezione di una rialimentazione dopo un digiuno o un periodo di sottanutrizione), poiché la maggior parte delle persone consuma una dieta ricca di grassi che bloccano tale processo.

Studi in vivo sull'assorbimento di acidi grassi (FA) dai pasti o l'assorbimento degli FFA forniscono la prova definitiva dell'eterogeneità nel metabolismo del tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo. A parità di massa grassa, l'assorbimento degli FA dai pasti è maggiore nell'intra-addominale rispetto a quello sottocutaneo addominale in entrambi i sessi [Jensen MD et al, 2003]. Nelle donne l'assorbimento diretto degli FFA plasmatici (FA marcati iniettati per via endovenosa) è maggiore (per unità di massa) nell'omentale rispetto al sottocutaneo addominale [Koustari C et al, 2011], così questo meccanismo può contribuire all'accumulo preferenziale di tessuto adiposo viscerale.

3.3. Rimodellamento del tessuto adiposo

Il tessuto adiposo può rispondere rapidamente ed in modo dinamico alla carenza e/o all'eccesso di nutrienti attraverso l'ipertrofia e l'iperplasia degli adipociti, assolvendo in tal modo al suo importante ruolo nell'omeostasi energetica corporea. L'iperplasia e l'ipertrofia degli adipociti possono contribuire all'espansione del tessuto adiposo. Tale crescita può portare a numerose conseguenze, inclusa l'ipossia, la morte cellulare degli adipociti, la secrezione intensa di chemochine e la disregolazione dei flussi degli acidi grassi [Sun K, Scherer PE, 2010].

È necessario distinguere l'espansione sana della massa lipidica da quella patologica: si definisce espansione sana l'aumento del pannicolo adiposo attraverso il maggior reclutamento dei precursori degli adipociti, che si differenziano in piccoli adipociti, insieme al reclutamento di altre tipologie di cellule stromali, alla conseguente vascolarizzazione e ad una lieve infiammazione.

In contrasto, l'espansione patologica del tessuto adiposo può essere descritta come una rapida crescita del pannicolo adiposo attraverso l'ingrossamento delle cellule lipidiche già esistenti, un alto grado di infiltrazione macrofagica, sviluppo vascolare limitato ed una fibrosi massiva. Tale espansione patologica è associata ad un'inflammatione cronica, la quale, infine, determina lo sviluppo di insulino-resistenza.

3.4. Ruolo dell'insulina nel tessuto adiposo

L'insulina è un ormone proteico, costituito da due catene amminoacidiche legate da ponti disolfuro; è prodotta dalle cellule beta delle isole pancreatiche di Langerhans ed ha importanti proprietà anaboliche. In particolare, l'insulina regola l'omeostasi del glucosio riducendone la produzione endogena a livello epatico, attraverso l'inibizione della gluconeogenesi e della glicogenolisi, e aumentandone la captazione da parte dei tessuti periferici, soprattutto tessuto adiposo e tessuto muscolare.

A livello del tessuto adiposo, essa è il principale ormone che ne regola il funzionamento e gli adipociti sono le cellule più altamente sensibili all'insulina. Essa, infatti, ha un ampio raggio di azione:

- stimola la differenziazione dei preadipociti ad adipociti;
- negli adipociti maturi stimola il trasporto del glucosio incrementando la disponibilità di glicerolo-3 fosfato per la sintesi dei trigliceridi;
- inibisce l'attività della lipasi ormone-sensibile (HSL), riducendo così la lipolisi intracellulare dei trigliceridi citoplasmatici;
- promuove la captazione degli acidi grassi derivanti dall'idrolisi delle lipoproteine circolanti per azione della lipasi lipoproteica (LPL).

Tuttavia, a causa di una maggiore secrezione di citochine infiammatorie, nei soggetti obesi si nota spesso una ridotta sensibilità del tessuto adiposo all'azione dell'insulina. Questa condizione di insulino-resistenza, inizialmente limitata al tessuto adiposo, col tempo può diventare sistemica, causando la comparsa del diabete di tipo II.

Infatti, quando le cellule diventano resistenti all'insulina, il pancreas cerca di compensare la ridotta sensibilità cellulare aumentando la sintesi ed il rilascio dell'ormone; si innesca pertanto una iperinsulinemia compensatoria. Quando tale condizione cronicizza, il superlavoro del pancreas e gli effetti negativi dell'iperinsulinemia stessa sulla sensibilità cellulare provocano un declino funzionale delle cellule adibite alla produzione di insulina e la comparsa di iperglicemia a digiuno; viene così a cadere il meccanismo compensatorio descritto in precedenza e si può parlare a tutti gli effetti di diabete mellito di tipo II. Pertanto, l'aumentata massa di tessuto adiposo, che sta alla base dell'obesità, causa insulino-resistenza; esistono inoltre molte prove a favore della possibilità che l'insulino-resistenza e l'iperinsulinemia, oltre ad essere causate dall'obesità, possano contribuire a loro volta allo sviluppo dell'obesità stessa. Infatti, gli alterati livelli di insulina producono una disfunzione del metabolismo dei lipidi.

Nel soggetto normale l'insulina stimola la produzione di acidi grassi e trigliceridi all'interno degli adipociti; essa svolge quindi un'attività lipogenica che favorisce la formazione di tessuto adiposo (il quale rappresenta una buona riserva energetica), cioè inibisce la lipasi impedendo l'idrolisi dei trigliceridi immagazzinati nell'adipocita. Queste azioni sono carenti in caso di diabete di tipo II, dove caratteristico è l'aumento dell'idrolisi dei trigliceridi, in quanto la lipasi non viene più correttamente inibita, e si registra un aumento della concentrazione di acidi grassi liberi (FFA) a livello del sistema portale.

Il fegato risponde all'iperafflusso di FFA con:

- aumento della gluconeogenesi;

- aumentata produzione di trigliceridi, apolipoproteina B e lipoproteine a densità molto bassa (VLDL).

L'eccessiva produzione epatica di VLDL e trigliceridi comporta un conseguente aumento della produzione di LDL piccole e dense e una riduzione delle particelle HDL. Proprio l'aumento di trigliceridi VLDL, la riduzione del colesterolo HDL e l'aumento delle particelle LDL piccole e dense costituiscono il profilo dislipidemico della sindrome metabolica causata da un eccesso di tessuto adiposo, soprattutto in sede viscerale.

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi decenni è stato osservato che l'aumento dell'incidenza dell'obesità ha coinciso con un aumento del 25% del consumo procapite di fruttosio [Bray GA et al, 2004]; inoltre il crescente consumo di bevande analcoliche sembra essere associato ad un aumento nel rischio di diabete, malattie cardiometaboliche, gotta e disordini lipidici. Poiché nell'uomo è difficile stabilire il contributo del solo fruttosio nello sviluppo di tali disordini metabolici, dal momento che nella vita quotidiana sono coinvolti fattori addizionali, come i ridotti livelli di attività fisica e l'aumento del consumo di cibi ricchi in grasso, lo studio sul modello animale aiuta a capire se il fruttosio dietetico da solo possa determinare un'eccessiva deposizione lipidica e le correlate malattie metaboliche.

Per questo motivo durante il mio primo anno di dottorato ho valutato l'impatto di una dieta ipolipidica ad alto contenuto di fruttosio a lungo termine sull'omeostasi energetica dell'intero organismo in ratti adulti e sedentari: ho condotto un'analisi dettagliata della composizione corporea e del bilancio dell'energia, nonché della funzionalità del sistema insulinemico per il controllo della glicemia al fine di evidenziare alterazioni metaboliche indotte da alti livelli di fruttosio nella dieta. Ho anche calcolato l'indice HOMA, determinando i livelli plasmatici di glucosio e di insulina a digiuno a 4 e 8 settimane del trattamento dietetico. Infine ho determinato sia il profilo lipidico plasmatico, per verificare se in seguito a questo trattamento dietetico si hanno variazioni nei livelli ematici di trigliceridi, colesterolo totale, colesterolo LDL e colesterolo HDL, sia i parametri infiammatori plasmatici.

Le variazioni riscontrate a livello dell'intero organismo riflettono parallele variazioni nell'attività metabolica dei singoli organi e tessuti, specialmente quelli che sono i principali contribuenti al metabolismo totale; dal momento che il fruttosio è maggiormente metabolizzato nel fegato, sito principale della lipogenesi de novo, durante il mio secondo anno di dottorato ho

analizzato l'attività dei markers epatici di questa via metabolica. Ho anche misurato il consumo di ossigeno (VO_2) e la produzione di anidride carbonica (VCO_2), per determinare i valori del quoziente respiratorio (RQ), del quoziente respiratorio non proteico (NPRQ) in modo da poter stimare l'intensità della lipogenesi de novo. Inoltre poiché i mitocondri sono la centrale energetica della cellula, ho indagato sull'eventuale alterazione delle funzioni mitocondriali epatiche, dato l'elevato consumo di ATP nella lipogenesi de novo. Queste analisi mi hanno permesso di osservare che ratti adulti sedentari ed alimentati con una dieta ad alto contenuto di fruttosio per 8 settimane presentano insulino-resistenza epatica, un'elevata lipogenesi de novo e deposizione lipidica, in accordo con il fatto che circa il 90% del fruttosio introdotto con la dieta è metabolizzato nel fegato [Tappy L et al, 2010]. L'aumentata sintesi epatica di lipidi implica una maggiore circolazione di questi ultimi e ciò potrebbe influenzare altri tessuti come il muscolo scheletrico; infatti diversi dati in letteratura hanno definito un potenziale collegamento tra la condizione di insulino-resistenza e le alterazioni mitocondriali nel muscolo scheletrico, sia nell'uomo che nel modello animale [Johannsen DL et al, 2009]; per questo durante il mio terzo anno di dottorato ho analizzato l'effetto a lungo termine di un'alimentazione ricca in fruttosio sull'energetica mitocondriale del muscolo scheletrico. A tal fine, ho valutato la capacità ossidativa e l'efficienza mitocondriale relativa al muscolo scheletrico stesso. Inoltre poiché il ruolo del tessuto adiposo bianco nella regolazione dell'omeostasi del glucosio e della sensibilità all'insulina nei ratti adulti alimentati con una dieta ricca di fruttosio non è ben definito, durante il terzo anno ho valutato anche l'effetto di questo trattamento dietetico sulle variazioni morfologiche e funzionali del WAT che potrebbero contribuire allo sviluppo di insulino-resistenza. Per raggiungere questo obiettivo ho analizzato il numero, la dimensione e la distribuzione delle cellule nel WAT sottocutaneo e viscerale, insieme alla sensibilità delle cellule all'insulina e all'attività lipolitica degli adipociti, al fine di rilevare un eventuale rimodellamento di questo tessuto in seguito all'elevato consumo di fruttosio: infatti, il rimodellamento del tessuto adiposo è un processo dinamico connesso con lo stato di obesità, che

può rappresentare in alcuni casi il legame tra l'obesità ed alcune gravi patologie ad essa collegate, come la resistenza all'insulina, l'ipertensione, il diabete di tipo II e le malattie cardiovascolari.

MATERIALI E METODI

Primo disegno sperimentale

Per il primo disegno sperimentale sono stati utilizzati ratti maschi Sprague Dawley (Charles River, Calco, Como, Italia), di 90 giorni di età, stabulati individualmente ad una temperatura di 24°C e sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce/buio con 12 ore di luce e 12 ore di buio (6.30-18.30). Gli animali sono stati divisi in 3 gruppi, tutti con un peso corporeo medio di circa 440 g. Trattamento, stabulazione ed eutanasia dell'animale sono stati eseguiti in conformità alle linee guida del Ministero della Sanità. Due gruppi di ratti sono stati alimentati rispettivamente con una dieta di controllo e con una dieta ricca in fruttosio per un periodo di otto settimane, mentre il terzo gruppo è stato sottoposto ad eutanasia all'inizio del periodo sperimentale per poter determinare il contenuto energetico e la composizione corporea iniziali.

La composizione delle diete è riportata in Tabella 1. Il contributo percentuale dei singoli macronutrienti al contenuto calorico della dieta di controllo è il 29 % per le proteine, il 10.6 % per i lipidi e il 60.4 % per i carboidrati. La dieta ricca in fruttosio presenta la stessa composizione calorica percentuale della dieta di controllo, tuttavia vi differisce nella composizione qualitativa dei carboidrati tra i quali prevale il fruttosio.

Quotidianamente, durante il trattamento, sono stati misurati il peso corporeo e l'introito calorico ed è stata effettuata la raccolta delle feci per determinare l'energia metabolizzabile assunta. Inoltre, a 4 settimane e al termine del trattamento, è stata effettuata la curva da carico di glucosio per valutare le variazioni della sensibilità del sistema insulinemico eventualmente indotte da una dieta ricca in fruttosio. Alla fine del periodo sperimentale i ratti sono stati sottoposti ad eutanasia e sono stati prelevate aliquote di sangue, per la misura dell'omeostasi glicemica, per le misure del profilo lipidico del siero e dei parametri infiammatori plasmatici. La carcassa è stata utilizzata per

valutarne la composizione corporea, il contenuto energetico e il guadagno corporeo di energia, lipidi e proteine.

Secondo disegno sperimentale

Per il secondo disegno sperimentale sono stati utilizzati ratti maschi Sprague Dawley (Charles River, Calco, Como, Italia), di 90 giorni di età, stabulati individualmente ad una temperatura di 24°C e sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce/buio con 12 ore di luce e 12 ore di buio (6.30-18.30). Gli animali sono stati divisi in due gruppi, tutti con un peso corporeo medio di circa 440 g. Trattamento, stabulazione ed eutanasia dell'animale sono stati eseguiti in conformità alle linee guida del Ministero della Sanità. Gli animali sono stati sottoposti agli stessi regimi di dieta descritti per i ratti del precedente disegno sperimentale. All'inizio del trattamento dietetico e dopo 2, 4, 6 e 8 settimane sono state eseguite le misure relative alla lipogenesi de novo. Alla fine del periodo di sperimentazione gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia, è stato prelevato il fegato per poter effettuare i dosaggi biochimici relativi alla determinazione della lipogenesi de novo e per poter procedere con l'isolamento dei mitocondri.

Terzo disegno sperimentale

Per il terzo disegno sperimentale sono stati utilizzati ratti maschi Sprague Dawley (Charles River, Calco, Como, Italia), di 90 giorni di età: così come descritto precedentemente, sono stati ripartiti in due gruppi di uguale peso medio (440 g), stabulati singolarmente per gabbia ad una temperatura di circa 24°C e sono stati sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce/buio di 12 ore (06.30-18.30). Questi due gruppi di animali sono stati sottoposti agli stessi regimi di dieta descritti per i ratti dei precedenti disegni sperimentali. Trattamento, stabulazione ed eutanasia dell'animale sono stati eseguiti in conformità alle linee guida del Ministero della Sanità. Alla fine del trattamento

i ratti sono stati sottoposti ad eutanasia ed è stato prelevato il muscolo scheletrico, che è stato ripulito dall'eccesso di connettivo, finemente sminuzzato, omogeneizzato in un'apposita soluzione fisiologica ed utilizzato per l'isolamento dei mitocondri, ed è stato prelevato e pesato il tessuto adiposo viscerale (epididimale) totale e sottocutaneo (addominale) per la valutazione di eventuali alterazioni che si verificano in caso di espansione del tessuto.

TABELLA 1. Composizione delle diete (100 g).

COMPONENTI DELLE DIETE	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
Mangime standard (g)	100.0	50.5
Olio di girasole (g)	---	1.5
Caseina (g)	---	9.2
Alphacel (g)	---	9.8
Fruttosio (g)	---	20.4
Acqua (g)	---	6.4
AIN-76 mineral mix (g)	---	1.6
AIN-76 vitamin mix (g)	---	0.4
Colina (g)	---	0.1
Metionina (g)	---	0.1
Densità energetica (KJ/g)	17.2	17.2
Proteine (J/100J)	29.0	29.0
Lipidi (J/100J)	10.6	10.6
Carboidrati (J/100J)	60.4	60.4
Di cui:		
Fruttosio (J/100J)	---	30.0
Amido (J/100J)	45.3	22.8
Zuccheri* (J/100J)	15.1	7.6

*Per zuccheri si intende una miscela di saccarosio, fruttosio, glucosio, lattosio.

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.

a) Misura del contenuto energetico della carcassa

Campioni dell'omogenato essiccato sono stati ridotti in polvere ed utilizzati per fare 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.

b) 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 J 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 HG 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.

Parametri plasmatici

a) Test di tolleranza al glucosio

Il test di tolleranza al glucosio è stato effettuato dopo 4 e 8 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 (Mercodia AB, Svezia) in un unico test per rimuovere le variazioni inter-saggio.

I valori basali postassorbitivi della glicemia e dell'insulina sono stati utilizzati per calcolare l'Homeostatic Model Assessment index (HOMA) con la formula $(\text{Glucosio (mg/dL)} \times \text{Insulina (mU/L)})/405$ [Cacho J et al, 2008]. 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 MA 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.

b) Parametri plasmatici

Le concentrazioni plasmatiche sistemiche dell'alanina aminotransferasi (ALT), dell'aspartato aminotransferasi (AST), dei trigliceridi e degli acidi grassi non esterificati (NEFA) sono state misurate con il metodo enzimatico colorimetrico utilizzando kit commerciali (SGM Italia, Italia e Randox Laboratories Ltd., Regno Unito).

La perossidazione lipidica è stata determinata secondo Fernandes et al, 2006, misurando sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS), utilizzando il saggio dell'acido tiobarbiturico. Aliquote di plasma 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 formatosi 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 / ml.

Le determinazioni dell'LPS nel plasma portale sono state eseguite utilizzando un kit basato su un estratto di *Limulus amaebocyte* (LAL kit, Lonza, Basilea, Svizzera). Le concentrazioni del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) nel plasma portale sono state determinate utilizzando un saggio ELISA (R & D Systems, 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 dei campioni (1: 2-1: 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 450 nm.

Calorimetria indiretta

VCO₂, VO₂, RQ e NPRQ sono stati misurati su un periodo di 24 h utilizzando un sistema di monitoraggio (srl Panlab, Cornella, Barcellona, Spagna), costituito da un calorimetro indiretto a circuito aperto composto da quattro camere. Le misure vengono effettuate ogni 15 minuti per 3 minuti in ogni gabbia. Per la misura del NPRQ sono state raccolte le urine per 24 h, in modo da poter procedere alla determinazione dei livelli urinari di azoto mediante un metodo enzimatico/colorimetrico (FAR s.r.l., Settimo di Pescantina, Verona, Italia). L'azoto urinario ha fornito la stima della quantità in grammi di proteine ossidate tramite moltiplicazione per il fattore 6.25. Conosciuta la quantità di proteine ossidate, si è potuto calcolare VO₂ e VCO₂ associate all'ossidazione proteica. Sottraendo tali valori dai valori totali di VO₂ e di VCO₂, si è giunti alla determinazione dei valori di VO₂ e VCO₂ non proteici e da questi si è potuto calcolare l'NPRQ riferito alle 24 h. Partendo da tale valore e con l'utilizzo di tabelle pubblicate [Elia M et al, 1988], è

possibile ricavare il valore del bilancio dei lipidi, espresso in g/giorno, che sarà positivo o negativo a secondo che prevalga la sintesi o l'utilizzo di questi macronutrienti. Conoscendo la quantità di lipidi introdotti dall'animale nel giorno in cui è stata effettuata la misura, è possibile procedere alla determinazione della lipogenesi de novo con l'utilizzo della seguente formula [Kovacs EMR et al, 2006]:

$$\text{Lipogenesi de novo netta} = \text{bilancio lipidico} - \text{introito lipidico}$$

Valori maggiori di zero saranno indicativi di una lipogenesi de novo netta.

Composizione del fegato e del muscolo scheletrico

Il contenuto lipidico del fegato e del muscolo scheletrico è stato determinato gravimetricamente in seguito all'estrazione dei lipidi in accordo con il metodo di Folch [Folch J et al, 1957], come descritto precedentemente.

La determinazione del contenuto di glicogeno epatico e muscolare è una procedura strutturata in due fasi [Roehrig KL, Allred JB, 1974]. Nella prima fase, i campioni di fegato e di muscolo scheletrico vengono acidificati in una soluzione contenente acido acetico 0,07 M ad una T di 55°, e poi segue l'aggiunta dell'enzima amiloglicosidasi (3,5 u/10 µl), il quale agisce sulla catena di glicogeno, liberando unità di glucosio. Al termine della conversione del glicogeno in glucosio, si può procedere con la seconda fase, nella quale si effettua il dosaggio del glucosio utilizzando il kit commerciale (Polker, Italia), descritto precedentemente.

La concentrazione dei trigliceridi relativi al fegato e al muscolo scheletrico è stata determinata mediante l'utilizzo di un dosaggio di tipo enzimatico-colorimetrico, come descritto precedentemente.

Il contenuto di ceramidi nel fegato e nel muscolo scheletrico è stata valutato mediante saggio ELISA [Crescenzo R 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.

Preparazione dell'omogenato di fegato ed isolamento dei mitocondri

Dopo essere stato prelevato, il fegato è stato finemente sminuzzato ed omogeneizzato in una soluzione contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, e 0.1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi (BSA) a pH 7.4, in un omogeneizzatore Potter Elvehjem settato a 500 rpm. L'omogenato è stato poi filtrato attraverso una garza sterile e suoi campioni sono stati usati per le misure della respirazione e per le misure dell'attività della acido grasso sintasi (FAS) e della stearyl-CoA desaturasi (SCD) epatiche. L'utilizzo dell'omogenato serve a collegare la capacità ossidativa mitocondriale con l'effettiva massa delle proteine mitocondriali. Tramite una centrifugazione a 1000 g per 10 minuti,

L'omogenato è stato privato di cellule intatte e nuclei; i surnatanti ottenuti sono stati ulteriormente centrifugati a 3000 g per 10 minuti. Quindi il pellet mitocondriale così ottenuto è stato lavato due volte ed infine risospeso in un tampone contenente LiCl 80 mM, HEPES 50 mM, Tris-P 5 mM, EGTA 1 mM, 0.1% (peso/volume) di BSA libera da acidi grassi, a pH 7.0. Caratterizzazioni enzimatiche e microscopiche hanno dimostrato che questa procedura utilizzata per l'isolamento dei mitocondri (centrifugazioni a 3000 g per 10 minuti) fornisce una frazione cellulare che è costituita essenzialmente da mitocondri.

Preparazione dell'omogenato del muscolo scheletrico ed isolamento dei mitocondri

I muscoli delle zampe posteriori, in particolare il gastrocnemio, il muscolo tibiale, il soleo ed il quadricipite, sono stati rapidamente prelevati ed utilizzati per la preparazione dei mitocondri isolati. Tali muscoli sono stati puliti dall'eccesso di tessuto connettivo, finemente tritati, lavati poi in una soluzione contenente 100 mM KCl, 50 mM TRIS, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.1% (w/v) di albumina di siero bovino (BSA) libera da acidi grassi, e poi trattati con proteasi (3.6 U/g di tessuto) per 4 minuti. I frammenti del tessuto ottenuto sono stati poi omogeneizzati nella soluzione precedentemente descritta (1:8, w/v) a 500 rpm (4 colpi al minuto). Gli omogenati quindi, sono stati centrifugati a 3000 g per 10 minuti, il surnatante è stato rapidamente scartato ed il pellet risospeso e centrifugato a 500 g per 10 minuti. Il surnatante ottenuto è stato poi centrifugato a 3000 g per ulteriori 10 minuti, il pellet è stato quindi lavato una volta e risospeso nel mezzo di sospensione (250 mM saccarosio, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.1 BSA libera da acidi grassi).

Attività epatica dell'SCD e della FAS

L'SCD è una delta-9 desaturasi degli acidi grassi che converte gli acidi grassi saturi in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) [Flowers MT et al, 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 K_2HPO_4 (pH 7.4) e 1 μ M mixotiazolo, in presenza di 0.12 mM NADH e 0.06 mM stearoil-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.

La 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.

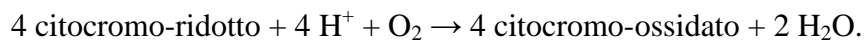
In particolare, secondo il protocollo sperimentale, i campioni in esame (1,5 mg di fegato) sono stati incubati in una soluzione contenente KH_2PO_4 0.1 mM a pH 6.5, acetil-CoA 57.9 μM , malonil-CoA 87.9 μM e NADPH 281.2 μM . Sono state, inoltre, effettuate delle misure in assenza del substrato enzimatico 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.

Attività della COX

La citocromo ossidasi (COX) è l'enzima costituente il quarto complesso della catena respiratoria ed è direttamente coinvolto nella cessione degli elettroni all'ossigeno. Nelle cellule questo enzima è unito ad un altro citocromo chiamato Cit a in un complesso macromolecolare che contiene un atomo di rame oltre al ferro porfirinico.

La citocromo ossidasi è una proteina integrale della membrana mitocondriale interna e catalizza la seguente reazione:



Dalla reazione si evince che quattro atomi di idrogeno reagiscono con l'ossigeno per formare acqua e contemporaneamente quattro elettroni attraversano la membrana mitocondriale interna passando dallo spazio intermembrana alla matrice. Ciò permette di mantenere il gradiente di pH ai due lati della membrana necessario per la produzione di ATP.

L'attività specifica della citocromo ossidasi è determinata polarograficamente utilizzando l'elettrodo di Clark. Le misure vengono effettuate al buio e ad alla temperatura di 30° C.

I mitocondri o gli omogenati vengono diluiti nella soluzione Chappel Perry modificata; per smascherare l'attività dell'enzima, si incubano per 30 minuti con il Lubrol PX (225 µg/mg di proteine mitocondriale). Il Lubrol serve a solubilizzare la membrana interna del mitocondrio e rende più semplice l'entrata dei substrati. I mitocondri vengono posti nella camera di misura dell'elettrodo di Clark ed incubati in un mezzo contenente:

1. Citocromo c 30 µM (proteina che trasporta gli elettroni dal complesso III al complesso IV);
2. Rotenone 4 µM (il rotenone è un inibitore del primo complesso della catena respiratoria);

3. Dinitrofenolo 0,5 mM (questo composto è un disaccoppiante chimico che permette di disaccoppiare la fosforilazione ossidativa: ciò determina un maggior flusso di elettroni lungo la catena respiratoria e quindi una maggior velocità di trasporto elettronico);
4. Na⁺-malonato 10 mM (il malonato è un inibitore del secondo complesso della catena respiratoria);
5. Hepes 75 mM.

Si aggiunge nella camera di misura ascorbato 4mM + TMPD 0.3 mM (substrati della respirazione) e si effettuano le letture relative al consumo di ossigeno. Si sottrae a queste letture quella relativa al bianco, cioè la stessa misura fatta però senza mitocondri. I risultati che si ottengono devono essere espressi in nmol di O/ min x mg di proteine incubate.



Attività respiratoria dei mitocondri isolati dal fegato e dal muscolo scheletrico

Il consumo di ossigeno è stato misurato polarograficamente. Le respirazioni sono state misurate con differenti substrati, allo scopo di ottenere informazioni sui diversi sistemi di trasporto e i vari siti d'ingresso degli equivalenti ridotti nella catena respiratoria. Le misure della respirazione con succinato, un substrato FAD-dipendente, sono state effettuate in presenza di rotenone, un inibitore specifico capace di bloccare il primo complesso respiratorio (NADH-deidrogenasi), in modo tale da evitare il cosiddetto “trasporto inverso degli elettroni” ed evidenziare così l'attività della catena di trasporto degli elettroni a partire dal secondo complesso. Il succinato è ossidato a fumarato dall'enzima succinico deidrogenasi (SDH), una flavoproteina che produce FADH₂ e, gli elettroni provenienti dalla sua ossidazione entrano nella catena di trasporto a livello del coenzima Q. Come substrati NAD-dipendenti sono stati utilizzati il glutammato e il piruvato, ambedue in presenza di malato. Il glutammato è trasformato in alfa-chetoglutarato che poi entra nel ciclo di

Krebs; la presenza di malato come co-substrato è utile per velocizzare l'ingresso del glutammato nel mitocondrio, che può attraversare la membrana mitocondriale interna utilizzando l'antiporto glutammato-aspartato. Il malato, infatti, nel mitocondrio dà origine all'ossalacetato, a questo punto l'enzima glutammico ossalacetico transaminasi trasferisce il gruppo amminico dal glutammato, che diventa alfa-chetoglutarato, all'ossalacetato, che diventa aspartato, e che fuoriesce dal mitocondrio in antiporto con il glutammato. Per quanto riguarda il piruvato, esso viene convertito ad Acetil-CoA dal complesso della piruvato deidrogenasi, enzima NAD-dipendente e sotto il controllo dell'ADP; l'Acetil-CoA così prodotto può però entrare nel ciclo di Krebs solo in presenza di ossalacetato. D'altra parte però, l'ossalacetato ad elevate concentrazioni inibisce l'enzima succinico-deidrogenasi ed è per questa ragione che come co-substrato è utilizzato il malato, in quanto questo, dopo essere entrato nei mitocondri, per azione dell'enzima malico deidrogenasi dà luogo alla formazione di ossalacetato, evitando in questo modo che la sua concentrazione all'interno del mitocondrio cresca tanto da influire sull'attività della succinico deidrogenasi e quindi di tutto il ciclo di Krebs.

Infine come substrati di natura lipidica sono stati utilizzati la palmitoil-carnitina + malato e il palmitoil-CoA. Questi substrati producono sia NAD ridotto che, FAD ridotto attraverso la β -ossidazione mitocondriale.

Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri vengono indotti a consumare i substrati endogeni mediante una pre-incubazione di tre minuti e, solo in seguito, sono aggiunti i substrati respiratori.

Le misure sono state effettuate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando, per i mitocondri epatici un mezzo di incubazione contenente KCl 80 mM, HEPES 50 mM, K_2HPO_4 5 mM, EGTA 1 mM, 0.1 % (peso/volume) di BSA libera da acidi grassi, a pH 7; per i mitocondri del muscolo scheletrico, un mezzo di incubazione contenente KCl 30 mM, $MgCl_2$ 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, KH_2PO_4 20 mM, 0.1% (peso/volume) di BSA libera da acidi

grassi ad un pH di 7.0. I substrati usati per la respirazione sono stati: succinato (10 mM) in presenza di rotenone (3.75 μ M); glutammato (10 mM) in presenza di malato (2.5 mM); palmitoil-CoA (40 μ M) in presenza di malato (2.5 mM) e di carnitina (2.0 mM), palmitoil-carnitina (40 μ M) in presenza di malato (2.5 mM) o piruvato (10 mM) in presenza di malato (2.5 mM). Le misure sono state fatte in assenza (Stato 4) e in presenza (Stato 3) di 0.3 mM di ADP. Il rapporto di controllo respiratorio (RCR) è stato calcolato come stato 3/stato 4.

Grado di accoppiamento ed effetto disaccoppiante del palmitato in mitocondri isolati

Il coefficiente di accoppiamento mitocondriale, q , rappresenta l'accoppiamento tra consumo di ossigeno e produzione di ATP nella fosforilazione ossidativa; tale parametro viene ad essere determinato sia nei mitocondri del fegato che nei mitocondri del muscolo scheletrico, applicando l'equazione 11 di Cairns [Cairns CB et al, 1998]:

$$q = \sqrt{1 - (J_o)_{sh} / (J_o)_{unc}}$$

dove, $(J_o)_{sh}$ rappresenta la velocità di consumo ossigeno in presenza di oligomicina, la quale inibisce l'ATP sintetasi, mentre $(J_o)_{unc}$ rappresenta il consumo ossigeno disaccoppiato dall' FCCP, il quale è in grado di dissipare il gradiente protonico transmitocondriale. I valori di $(J_o)_{sh}$ e $(J_o)_{unc}$ sono stati misurati utilizzando succinato 10 mM + rotenone 3.75 μ M in presenza di oligomicina 2 μ g/mL o di FCCP 1 μ M, rispettivamente, sia in assenza che in presenza di palmitato ad una concentrazione di 45 μ M.

L'effetto disaccoppiante del palmitato è stato valutato misurando il potenziale di membrana prima e dopo l'aggiunta di concentrazioni crescenti di palmitato. Le registrazioni del potenziale di membrana mitocondriale sono state eseguite con safranina O a doppia lunghezza d'onda (511-533

nm). Le misure sono state effettuate a 30° in un mezzo contenente LiCl 30 mM, MgCl₂ 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM Tris-PO₄ 20 mM, 0.1% (peso/volume) di BSA libera da acidi grassi ad un pH di 7.0, in presenza di succinato (10 mM), rotenone (3.75 μM), oligomicina (2 μg/L) e safranina O (83.3 nmol/mg), sia in assenza che in presenza dell'aggiunta di palmitato 15, 30 e 45 μM. Le assorbanze sono state convertite in potenziale di membrana in mV utilizzando l'equazione di Nernst:

$$\Delta\Psi = 61 \text{ mV} \times \log ([K^+]_{in}/[K^+]_{est})$$

Le curve di calibrazione fatte per ciascuna preparazione sono state ottenute da misure in cui la concentrazione di K⁺ extramitocondriale ([K⁺]_{est}) veniva alterata in un range di 0.1-20 mM. Il cambiamento nell'assorbanza causato dall'aggiunta di valinomicina 3 μM, un trasportatore specifico del potassio, è stato messo in grafico in funzione della [K⁺]_{est}. Poi la [K⁺]_{in} è stata calcolata per estrapolazione dell'intercetta con la retta al punto zero di assorbimento.

Quantificazione della p-Akt e dell'Akt nel fegato, nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo

L'Akt è una proteina chinasi serina/treonina specifica, implicata nel meccanismo di segnalazione dell'insulina. Il legame dell'ormone al suo recettore tirosin-chinasico attiva una via di segnalazione, di cui uno degli effettori è la proteina Akt, la cui conformazione fosforilata è responsabile degli effetti metabolici dell'insulina. La quantificazione della proteina p-Akt mediante Western Blot permette di valutare la sensibilità delle cellule all'insulina: a tale scopo sono state effettuate analisi di Western Blot [Crescenzo R et al, 2012] in cui i campioni di fegato, di muscolo scheletrico e di tessuto adiposo sono stati denaturati in un buffer (60.0 mM Tris pH 6.8, 10% saccarosio, 2% SDS, 4% β-mercaptoetanolo) e caricati in un gel di poliacrilammide-SDS 12%.

Dopo la corsa nell'electrode buffer (50 mM Tris, pH 8.3, 384 mM glicina, 0.1% SDS), i gel sono stati trasferiti su una membrana di PVDF (Immobilion-P, Millipore, MA, USA) a 0.8 mA/cm² per 90 minuti. Le membrane sono state prebloccate in un blocking buffer (TBS, 5% BSA, 0.1% Tween 20) per 1 ora e poi incubate tutta la notte a 4°C con un anticorpo policlonale per Akt o p-Akt (Cell signaling, MA USA, diluito 1:1000 nel blocking buffer). Le membrane sono poi state lavate 3 volte per 10 minuti in TBS / 0.1 Tween 20 e 3 volte per 10 minuti in TBS; ed ancora, sono state incubate 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario anti-topo coniugato ad una fosfatasi alcalina (Promega, WI, USA). In seguito, le membrane state nuovamente lavate come sopra descritto, sciacquate in acqua distillata ed incubate a temperatura ambiente con un substrato luminescente, il CDP-Star (Sigma-Aldrich, MO, USA). La rilevazione dei dati è stata effettuata esponendo delle lastre autoradiografiche (Kodak, Eastman Kodak Company, NY, USA) alle membrane. La quantificazione del segnale è stata effettuata con il software Un-Scan-It gel (Silk Scientific, UT, USA).

Perossidazione lipidica mitocondriale nel fegato e nel muscolo scheletrico

La perossidazione lipidica dei mitocondri epatici e muscolari è stata determinata in accordo a Fernandes [Fernandes MA et al, 2006], come descritto per il plasma. In piastra si pipettano 0.25 ml di tampone fosfato, 25 µg di proteine mitocondriali, 0.25 ml di acido tricloroacetico (TCA), 1ml di acido tiobarbiturico (TBA), 5 µl di idrossitoluene butilato (BHT). Si incuba il tutto in un bagnetto a 90°C per 15 minuti, poi si fa raffreddare in ghiaccio per 10 minuti. In seguito, le provette vengono centrifugate a 850 g per 10 minuti alla temperatura di 25°C, si preleva il surnatante da ogni provetta e si leggono le assorbanze dei campioni contro il bianco contenente acqua distillata alla lunghezza d'onda di 530 nm.

I TBARS formatisi durante la reazione vengono calcolati utilizzando il coefficiente di estinzione molare (ϵ) pari a $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ed espressi in nmolTBARS/ μg di proteine mitocondriali.

$$[\text{TBARS}] = A/(\epsilon \times \mu\text{g proteine mitocondriali})$$

Attività specifica della SOD nel fegato e nel muscolo scheletrico

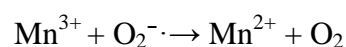
L'attività specifica della superossido dismutasi (SOD), è stata valutata in accordo con Flohè and Otting [Flohè L, Otting F, 1984].

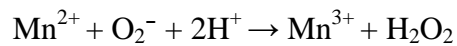
L'enzima superossido dismutasi catalizza la reazione di dismutazione di due molecole di anione superossido in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno.



Nella cellula, esistono due forme di SOD, una citosolica, che possiede nel sito attivo il complesso Cu-Zn, ed una mitocondriale, che possiede nel sito attivo un atomo di Mn^{3+} , e che è quella la cui attività è stata saggiata.

Nel meccanismo di reazione il Mn passa da uno stato di ossidazione 3^+ a 2^+ riducendosi mediante una reazione che coinvolge la prima molecola di anione superossido; in questa fase, l'enzima acquisendo un elettrone, diventa poi inattivo e può nuovamente reagire con il secondo anione superossido e i due protoni, fornendo perossido di idrogeno e, tornando nella forma attiva Mn^{3+} .





La SOD è un enzima antiossidante, in quanto la sua funzione primaria è quella di proteggere le componenti mitocondriali dagli anioni superossidi liberati durante i processi della respirazione cellulare.

Nello specifico, il rilascio dei radicali dell'ossigeno avviene a livello del complesso I e del complesso III della catena respiratoria, durante le fasi di trasporto degli elettroni all'ossigeno. È stimato, infatti, che circa l'1-5 % dell'ossigeno consumato viene liberato sotto forma di anione superossido. Da ciò sembra evidente che l'enzima della SOD risulta una delle prime difese cellulari contro i radicali liberi, annullandone gli effetti dannosi.

Al fine di valutare l'attività specifica di tale enzima, si è effettuato un dosaggio della SOD che si realizza spettrofotometricamente andando a monitorare la velocità di riduzione del citocromo c, utilizzando il sistema xantina-xantina ossidasi come produttore di ioni superossido.

Nel dosaggio della SOD, si effettua prima una misura del bianco, nella quale miscela di reazione è presente solo il complesso xantina-xantina ossidasi (responsabile della produzione di radicali liberi) ed il citocromo c, che quindi raggiunge la sua massima riduzione.

Nella misura successiva si aggiungono alla miscela di reazione anche i mitocondri, quindi la SOD, che competendo con il citocromo C per i radicali, induce una minore riduzione del citocromo, in funzione della sua attività: tanto maggiore sarà l'attività della SOD, tanto minore risulterà la riduzione di citocromo.

Per il calcolo si costruisce poi una curva di calibrazione in cui il reciproco delle variazioni di assorbanza al minuto del citocromo c ($1/\Delta A_{\text{min}}^{-1}$ ovvero, l'attività della SOD) è riportato in funzione della concentrazione di proteine del campione incubato e si ottiene una relazione di tipo lineare.

Sapendo che, per convenzione, una unità di superossido dismutasi è definita come la quantità di enzima che inibisce del 50% la velocità di riduzione del citocromo c (quindi, $\Delta A_{\text{min}}^{-1}/2$ che, sulle coordinate del grafico corrisponde a $2/\Delta A_{\text{min}}^{-1}$), è possibile ricavare per estrapolazione della retta, l'attività del campione espressa come Unità/mg di proteine.

Preparazione ed analisi del tessuto adiposo

Allo scopo di rilevare un eventuale rimodellamento del tessuto adiposo indotto dal consumo di diete ricche in fruttosio, campioni di tessuto adiposo viscerale (epididimale) e sottocutaneo (addominale) sono stati prelevati da ciascun ratto al momento del sacrificio. Essi sono stati fissati in paraformaldeide 4%, e successivamente sottoposti a inclusione in paraffina. Le sezioni di 10 μm di spessore, ottenute al microtomo, sono state poi colorate con la colorazione tricromica di Mallory e osservate con un microscopio Axioskop (Zeiss). Le immagini raccolte sono state dunque acquisite mediante il software Axiovision 4.7 (Zeiss). Il campionamento delle sezioni è stato eseguito secondo il metodo del "physical fractionator" per assicurare un campionamento sistematico ed uniformemente casuale [Gundersen HJG, 2002]. In seguito, le foto ottenute sono state processate con il software ImageJ 1.44. Dopo aver caricato le immagini nel programma, ne è stata delimitata l'area e sono stati conteggiati gli adipociti.

Misura del diametro degli adipociti

Per stimare il diametro degli adipociti sono state usate le foto precedentemente scattate: in questo modo tramite il programma Photoshop, si è potuto procedere con la conta degli adipociti, inserendo successivamente questi dati in un foglio excel e calcolando così le varie medie e

percentuali. La misura è stata effettuata mediante l'utilizzo di righelli "virtuali" di dimensioni di 50 μm , 75 μm e 100 μm . Col righello di 50 μm (colore blu) abbiamo individuato gli adipociti con un diametro inferiore a 50 μm ; col righello di 75 μm (colore rosso) abbiamo rilevato cellule adipose con un diametro compreso tra 50-75 μm ; infine il righello di 100 μm (colore nero) ci ha consentito di identificare gli adipociti con un diametro tra 75-100 μm . I dati così ottenuti sono stati espressi come percentuale del numero totale di adipociti.

Isolamento degli adipociti sottocutanei e viscerali e misura della capacità lipolitica in vitro

Gli adipociti sono stati isolati dal tessuto sottocutaneo e viscerale mediante una modifica del metodo di Wang et al [Wang T et al, 2010].

Questa tecnica si articola in diverse fasi:

- 1) 2.5 g di tessuto adiposo sono stati prelevati dall'animale al momento del sacrificio e posti nella seguente soluzione tampone (KRP), contenente 130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.24 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, pH 7.4, 2.5 mM KH₂PO₄, 2% albumina di siero bovino, 5 mM glucosio, 2 nM adenosina;
- 2) Il tessuto è stato finemente tritato con forbici e ad esso è stata aggiunta la collagenasi (10 mg/g di tessuto) che degrada il collagene e libera gli adipociti dal tessuto;
- 3) Il campione è stato incubato a 37°C per 45 minuti in un bagnetto termostatico con agitazione;
- 4) Al termine dell'incubazione è stato centrifugato a 1000 rpm per 3 minuti;
- 5) Il surnatante è stato prelevato e sottoposto a 2 lavaggi con la soluzione KRP;
- 6) Il surnatante contenente gli adipociti è stato usato per il conteggio e la successiva incubazione;

- 7) La conta cellulare è stata effettuata utilizzando una camera di Burker posizionata su un microscopio ottico (NIKON ECLIPSE E1000);
- 8) Per misurare la capacità lipolitica: aliquote corrispondenti a 15000 cellule sono state poi incubate in 1 ml di soluzione KRP in cui l'adenosina è stata sostituita da 1 μ M isoprotenerolo (farmaco simpatico-mimetico attivo sui recettori beta adrenergici, capace quindi di stimolare la lipolisi negli adipociti), in assenza o in presenza di 0.1 μ M insulina (inibitore della lipolisi) per 2 ore a 37°C in un bagnetto termostatico con agitazione;
- 9) Al termine dell'incubazione aliquote sono state utilizzate per determinare la produzione di glicerolo liberato dalla scissione dei trigliceridi, incubando i campioni con il reattivo del glicerolo Sigma a 37°C per 15 minuti e infine rilevate le assorbanze a 540 nm contro gli standard appropriati.

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 Bonferroni. 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

Primo disegno sperimentale

Nella tabella 2 sono riportati i risultati relativi alle variazioni del peso corporeo, del contenuto energetico corporeo e della composizione corporea nei ratti alimentati per otto settimane con la dieta ricca in fruttosio, rispetto ai ratti alimentati con la dieta di controllo. I risultati non mostrano variazioni significative del peso corporeo e delle proteine corporee. I ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio esibiscono un aumento dei lipidi corporei e del peso del tessuto adiposo epididimale, rispetto ai controlli; il contenuto di energia corporea risulta significativamente più alto nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli, mentre la percentuale di acqua è significativamente ridotta nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli.

Le misure del bilancio energetico (Tabella 3) indicano che i ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio manifestano un guadagno corporeo di energia e di lipidi significativamente maggiore rispetto a quello riscontrato nei ratti alimentati con la dieta di controllo. Non vi sono, invece, variazioni significative dell'energia metabolizzabile introdotta e della spesa energetica tra i due gruppi sperimentali. Infine, il valore dell'efficienza metabolica risulta incrementato significativamente nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai ratti alimentati con la dieta di controllo.

Dopo 4 settimane di trattamento, i ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio hanno mostrato valori significativamente più elevati di insulina plasmatica a digiuno (Fig. 1b) e dell'indice HOMA (Fig. 1c), rispetto ai ratti di controllo. I risultati del test di tolleranza al glucosio indicano che la risposta insulinica è significativamente maggiore nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli (Fig. 1 f, h). Inoltre, l'indice epatico di insulino-resistenza, calcolato

durante la prima fase del test di tolleranza al glucosio, è risultato significativamente più alto nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio (Fig. 1d).

Dopo 8 settimane di trattamento, il quadro dell'omeostasi glicemica era simile, eccetto che per la comparsa di un incremento significativo del glucosio plasmatico a digiuno e dell'AUC glucosio (Fig. 2 a, g)

Nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio, i livelli plasmatici di NEFA, trigliceridi, ALT, AST, e TBARS erano significativamente più alti rispetto ai controlli, così come le concentrazioni portalì di TNF- α e LPS (Tabella 4).

TABELLA 2. Composizione corporea in ratti alimentati con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio per otto settimane.

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
Peso corporeo finale (g)	527 ± 31	528 ± 32
Energia corporea (KJ/g)	8.9 ± 0.3	9.9 ± 0.3*
Lipidi corporei (%)	12.2 ± 0.5	14.7 ± 0.5*
Grasso epididimale (g/100g b.w.)	0.79 ± 0.03	1.05 ± 0.04 *
Proteine corporee (%)	17.4 ± 1.0	17.8 ± 0.4
Acqua corporea (%)	63.7 ± 0.6	61.4 ± 0.6*

I valori sono riportati come medie ± SEM di sei differenti esperimenti.

*P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

TABELLA 3. Bilancio energetico in ratti alimentati con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio per otto settimane.

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
Energia introdotta (kJ)	25700 ± 1235	25590 ± 388
Energia persa con le feci (kJ)	6002 ± 230	6050 ± 201
Energia guadagnata (kJ)	966 ± 70	1284 ± 60*
Lipidi guadagnati (kJ)	753 ± 70	1015 ± 70*
Energia spesa (kJ)	18700 ± 1292	18154 ± 517
Efficienza metabolica (%)	4.9 ± 0.2	7.1 ± 0.2*

I valori sono riportati come medie ± SEM di sei differenti esperimenti.

*P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

FIGURA 1. Parametri dell'omeostasi del glucosio in ratti alimentati con una dieta di controllo o ricca in fruttosio dopo 4 settimane di trattamento. I ratti sono stati privati di cibo e dopo 6 ore sono stati determinati il glucosio plasmatico (a), l'insulina (b) e l'indice HOMA (c). Poi è stato iniettato glucosio (2 g / kg peso corporeo) per via intraperitoneale e sono stati misurati a intervalli di 20 minuti per 2 ore sia il glucosio plasmatico (e-g) sia l'insulina (f-h) insieme all'indice di resistenza epatica all'insulina (d). I valori sono riportati come le medie \pm SEM di 6 ratti differenti. *P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

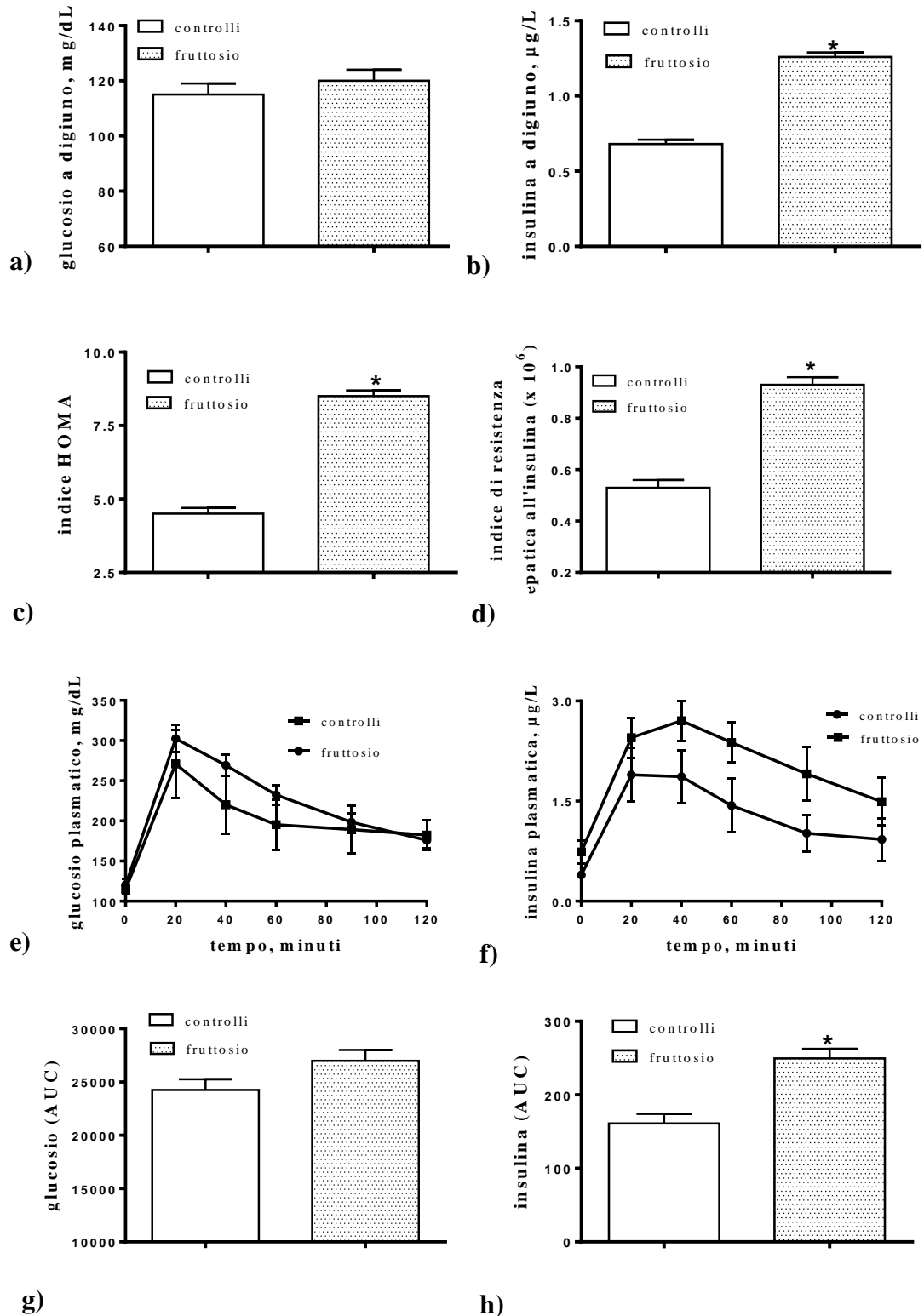


FIGURA 2. Parametri dell'omeostasi del glucosio in ratti alimentati con una dieta di controllo o ricca in fruttosio dopo 8 settimane di trattamento. I ratti sono stati privati di cibo e dopo 6 ore sono stati determinati il glucosio plasmatico (a), l'insulina (b) e l'indice HOMA (c). Poi è stato iniettato glucosio (2 g / kg peso corporeo) per via intraperitoneale e sono stati misurati a intervalli di 20 minuti per 2 ore sia glucosio plasmatico (e-g) sia insulina (f-h) insieme all'indice di resistenza epatica all'insulina (d). I valori sono riportati come le medie \pm SEM di 6 ratti differenti. * $P < 0.05$ rispetto alla dieta di controllo.

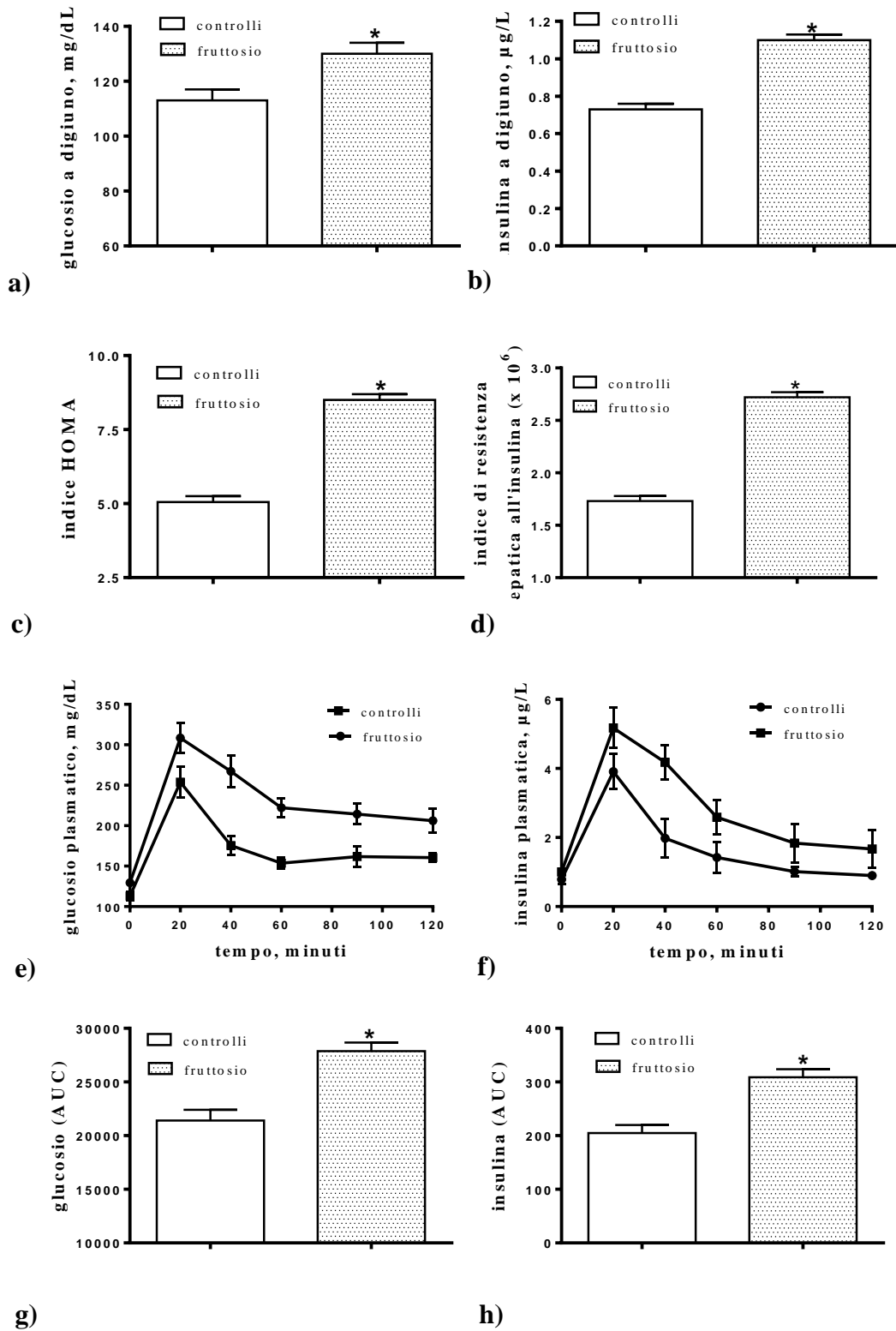


TABELLA 4. Parametri plasmatici e markers infiammatori in ratti alimentati con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio per otto settimane

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
NEFA nel plasma sistemico (mM)	0.23 ± 0.02	0.34 ± 0.02*
Trigliceridi nel plasma sistemico (mg/100 ml)	112 ± 4	191 ± 5*
ALT nel plasma sistemico (U/L)	16.5 ± 1.0	27.0 ± 1.0*
AST nel plasma sistemico (U/L)	42.7 ± 3.0	64.8 ± 3.0*
Perossidazione lipidica nel plasma sistemico (nmol TBARS/ml)	9.8 ± 0.9	14.2 ± 0.5*
TNF-α nel plasma portale (pg/ml)	48.3 ± 3.2	93.5 ± 5.1*
LPS nel plasma portale (EU/ml)	0.563 ± 0.015	0.980 ± 0.029*

I valori sono riportati come le medie \pm SEM di 6 ratti differenti. *P < 0.05 rispetto ai controlli.

EU= unità di endoxina;

NEFA= acidi grassi non esterificati;

ALT= transaminasi dell'alanina;

AST= transaminasi dell'aspartato;

TBARS= sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico;

TNF= fattore di necrosi tumorale;

LPS= lipopolisaccaride.

Secondo disegno sperimentale

In tabella 5 i risultati relativi alla composizione del fegato hanno mostrato che i livelli dei lipidi, dei trigliceridi, delle ceramidi e del glicogeno erano significativamente più alti nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio, rispetto ai controlli, con un aumento significativo della perossidazione dei lipidi epatici.

Le misure della spesa energetica delle 24 h, effettuate a 0, 2, 4, 6 e 8 settimane del trattamento dietetico (Fig. 3a), così come l'area sotto la curva della spesa energetica delle 24 h di tutto il periodo sperimentale (Fig. 3b), non mostrano nessuna significativa variazione dovuta all'alimentazione con il fruttosio, sebbene i valori dei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio siano leggermente più bassi. Invece i valori dell'NPRQ ed i tassi di lipogenesi de novo netta risultano significativamente più alti nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli, già dalla seconda settimana di trattamento (Fig. 4a). Infine dopo il trattamento dietetico i ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli mostrano una maggiore attività degli enzimi epatici lipogenici, FAS e SCD-1 (Fig. 4b).

La sensibilità epatica all'insulina è stata valutata alla fine del trattamento attraverso la determinazione del grado di fosforilazione della chinasi Akt, un effettore distale di segnalazione dell'insulina, che è stato riscontrato significativamente più basso nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio, rispetto ai controlli (Fig. 5).

Le misure dell'attività respiratoria sono state effettuate sia nell'omogenato del tessuto che nei mitocondri isolati per prendere in considerazione cambiamenti nella massa e nella capacità respiratoria mitocondriale: i risultati relativi allo stato 3 della respirazione nell'omogenato (Fig. 6a) mostrano valori significativamente più alti con tutti i substrati utilizzati nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli, mentre nessuna variazione è stata trovata nelle misure effettuate nei mitocondri isolati (Fig. 6b).

La massa proteica mitocondriale è stata valutata misurando l'attività della COX, enzima marker mitocondriale, e valutando la resa mitocondriale: i risultati (Fig. 6c) mostrano che l'attività della COX negli omogenati è significativamente maggiore nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli, mentre nessuna variazione nell'attività specifica della COX è stata trovata nei mitocondri isolati. Di conseguenza, la massa proteica mitocondriale calcolata dal rapporto tra l'attività nell'omogenato e l'attività nei mitocondri isolati è significativamente maggiore nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli. Infine la resa mitocondriale è più alta nei ratti trattati rispetto ai controlli.

Il grado di accoppiamento dei mitocondri epatici degli animali alimentati con dieta ricca di fruttosio per otto settimane rispetto agli animali alimentati con dieta di controllo è mostrato in figura 7: in presenza di oligomicina, sia in assenza di palmitato sia in seguito all'aggiunta di palmitato, i valori della respirazione dei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio sono significativamente più bassi (Fig. 7b), mentre nessuna variazione è stata riscontrata in presenza di FCCP (Fig. 7c); ne consegue che i valori di accoppiamento sono significativamente più alti nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli, sia in assenza che in presenza di palmitato (Fig. 7a). In più, i mitocondri epatici di ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio risultano meno responsivi all'effetto disaccoppiante degli acidi grassi, poiché il potenziale di membrana nello stato 4 della respirazione risulta significativamente maggiore nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli, sia in assenza di palmitato che dopo l'aggiunta di concentrazioni crescenti di palmitato (Fig. 7d).

Per valutare il danno da ROS e le difese antiossidanti nei mitocondri epatici, sono state misurate la perossidazione lipidica e l'attività specifica della SOD (Tabella 6). L'attività della SOD diminuisce significativamente nei ratti alimentati con dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli; in più i valori della perossidazione lipidica sono significativamente maggiori nei ratti alimentati con

fruttosio rispetto ai controlli. Tali risultati sono indicativi di un aumento del danno ossidativo negli animali alimentati con la dieta ricca in fruttosio.

TABELLA 5. Composizione epatica in ratti alimentati con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio per otto settimane.

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
Glicogeno (mg/g)	25.3 ± 1.2	30.3 ± 1.1*
Lipidi totali (mg/g)	40.5 ± 1.2	51.5 ± 2.3*
Trigliceridi (mg/g)	14.9 ± 0.8	21.9 ± 1.1*
Ceramidi (AU/g)	239 ± 27	346 ± 21*
Perossidazione lipidica (nmol TBARS/g di fegato fresco)	61.9 ± 2.1	75.4 ± 2.0*

I valori sono riportati come medie ± SEM di sei differenti esperimenti.

*P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

TBARS= sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico.

AU= unità di assorbanza.

FIGURA 3. Andamento temporale della spesa energetica delle 24 ore (a) e area sotto la curva (AUC) della spesa energetica delle 24 ore (b). I valori sono riportati come medie \pm SEM di sei differenti esperimenti. *P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

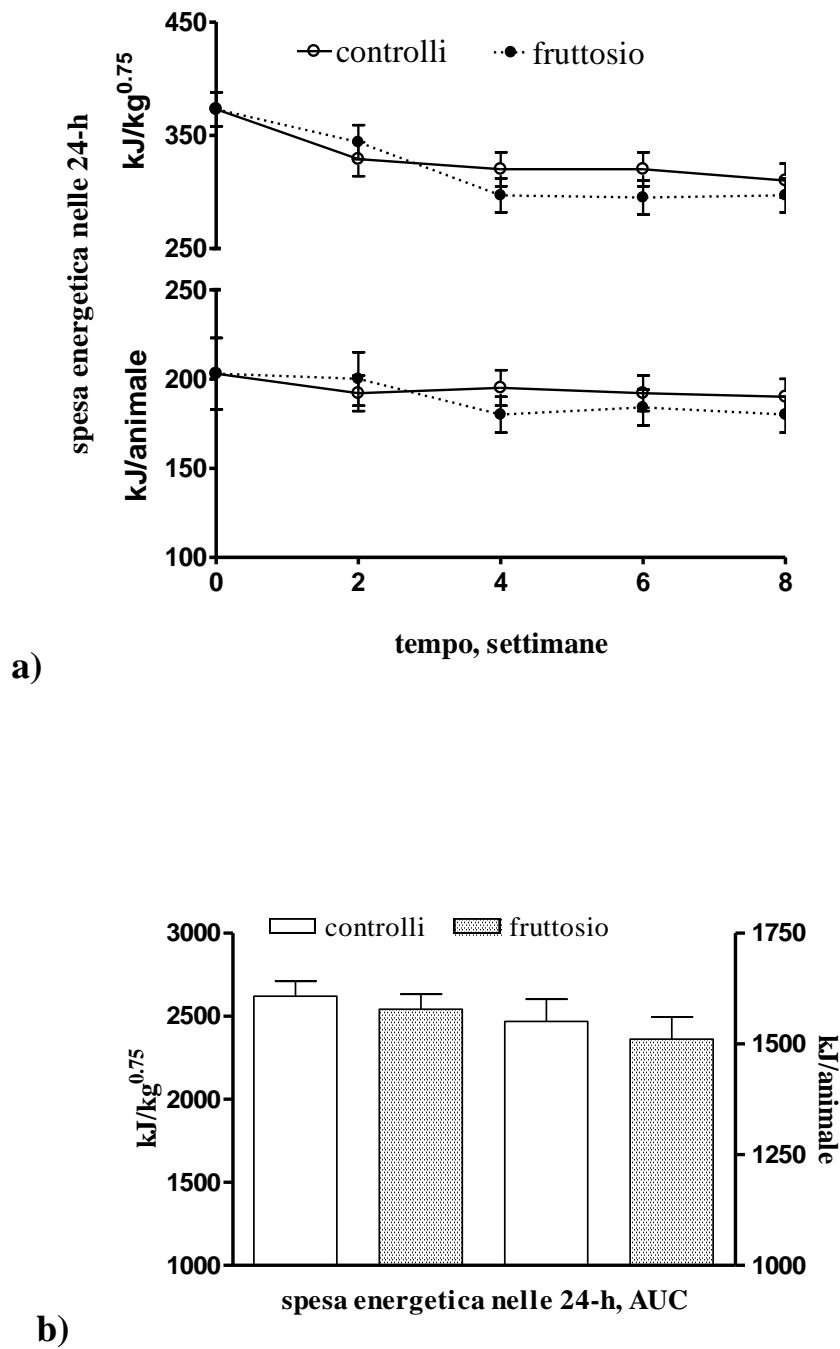


FIGURA 4. Andamento temporale dell’NPRQ delle 24 ore e della lipogenesi de novo netta (a) e attività specifica della FAS e dell’SCD-1 (b). I valori sono riportati come medie \pm SEM di sei differenti esperimenti. *P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

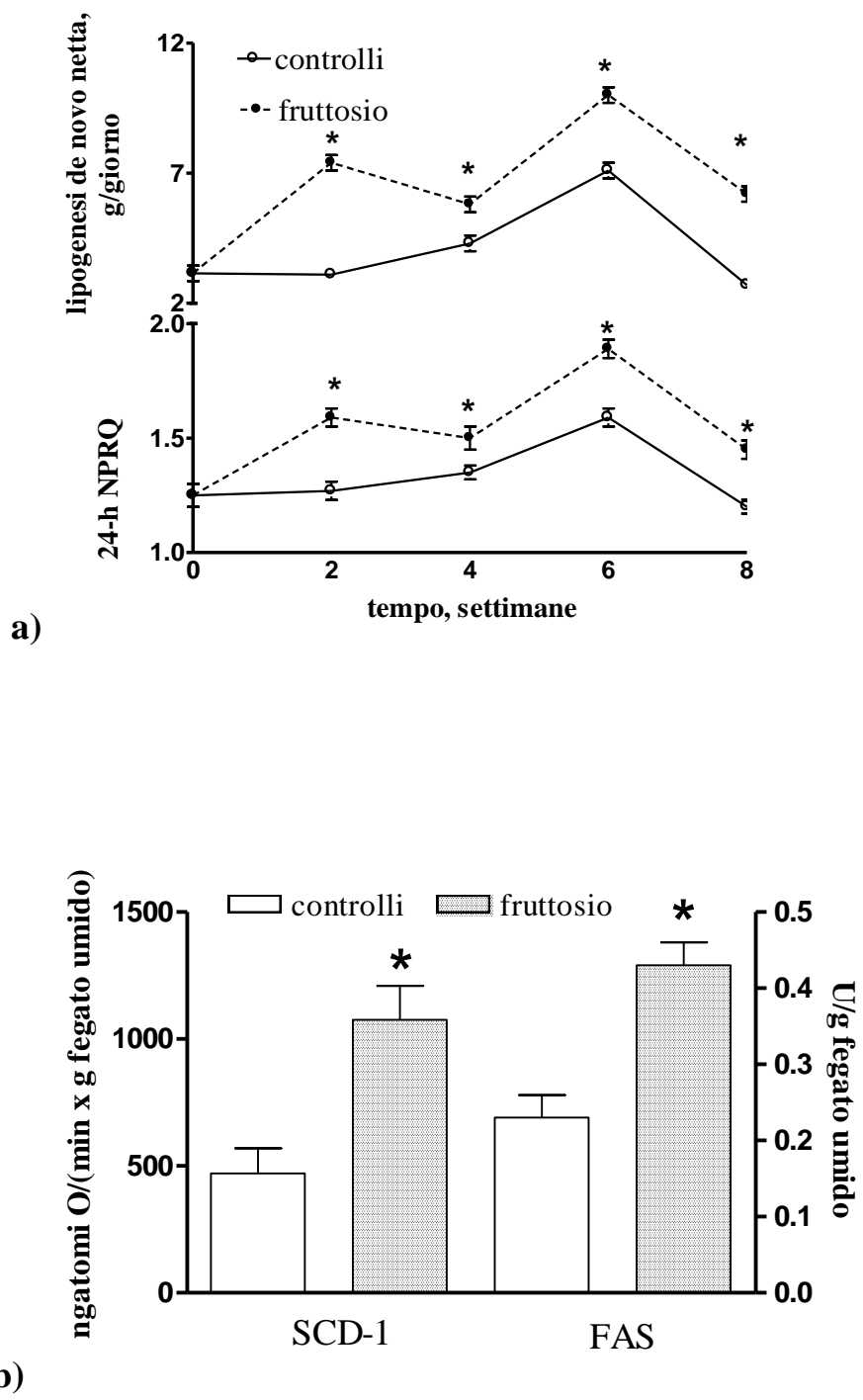


FIGURA 5. Rapporto p-Akt/Akt nel fegato in ratti alimentati con una dieta di controllo o ricca di fruttosio dopo otto settimane di trattamento. I valori sono riportati come le medie \pm SEM di 6 ratti differenti. *P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

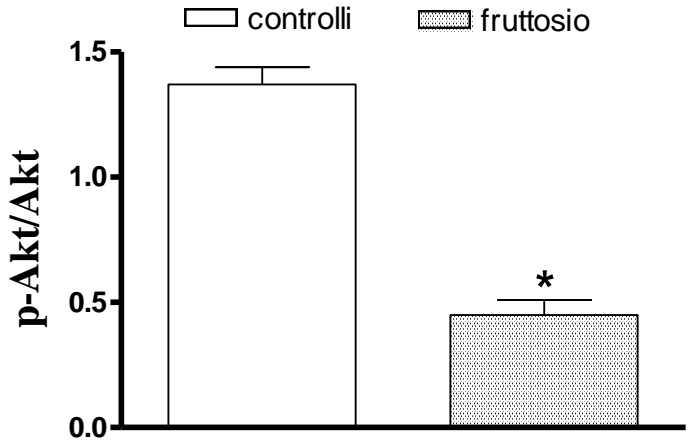


FIGURA 6. Respirazione epatica mitocondriale negli omogenati (a), nei mitocondri isolati (b), e massa proteica mitocondriale (c) di ratti alimentati per otto settimane con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio. I valori sono riportati come medie \pm SEM di sei differenti esperimenti. * $P < 0.05$ rispetto alla dieta di controllo.

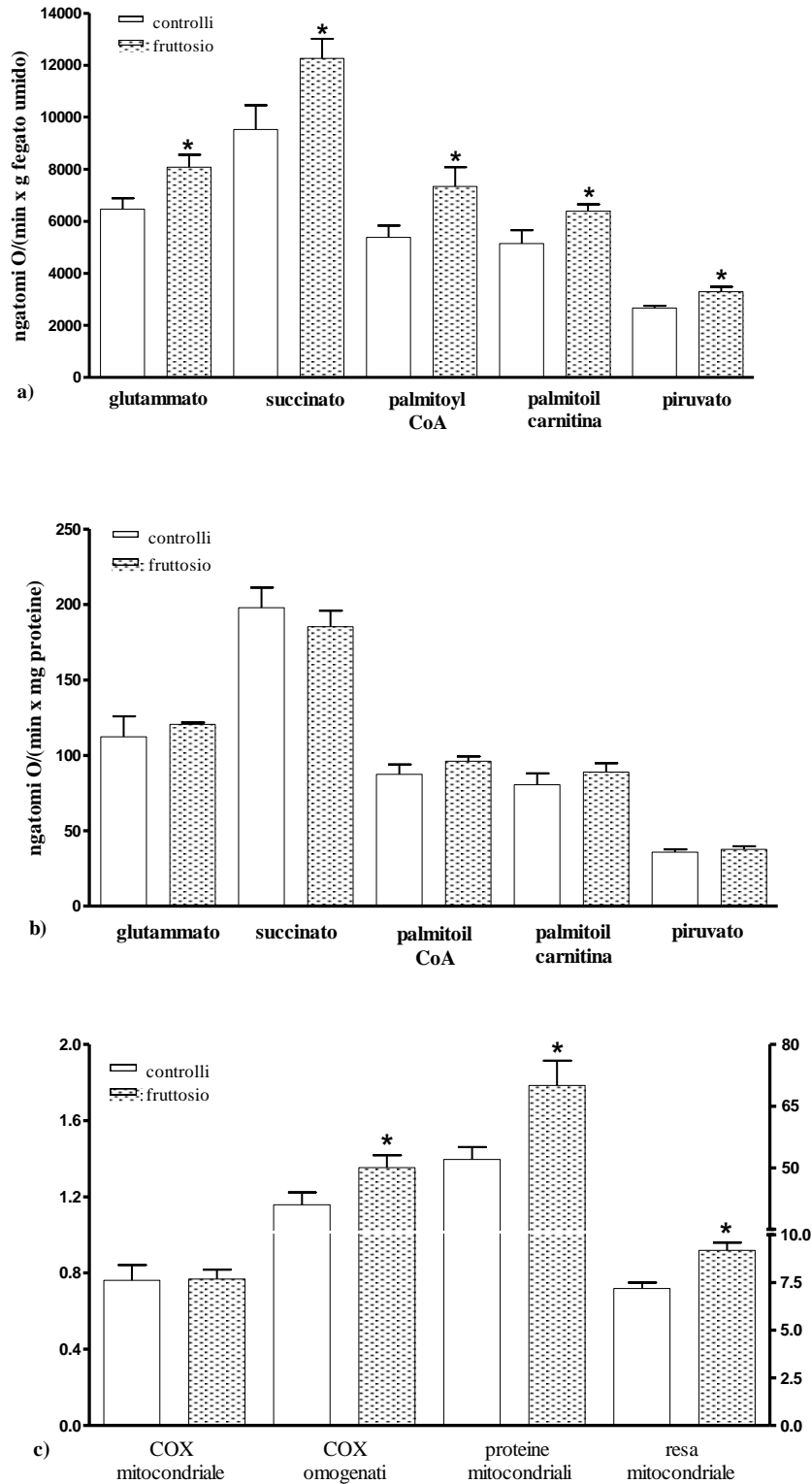


Figura 7. Grado di accoppiamento calcolato dal consumo di ossigeno in presenza di oligomicina e dallo stato disaccoppiato in presenza di FCCP (a), consumo di ossigeno in presenza di oligomicina (b), stato disaccoppiato in presenza di FCCP (c), potenziale di membrana nello stato 4 (d), in presenza e in assenza di palmitato nei mitocondri epatici di ratti alimentati per otto settimane con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio. I valori sono riportati come medie \pm SEM di sei differenti esperimenti. * $P < 0.05$ rispetto alla dieta di controllo. Le linee di regressione in d hanno valori di intercetta significativamente differenti ($P < 0.0001$).

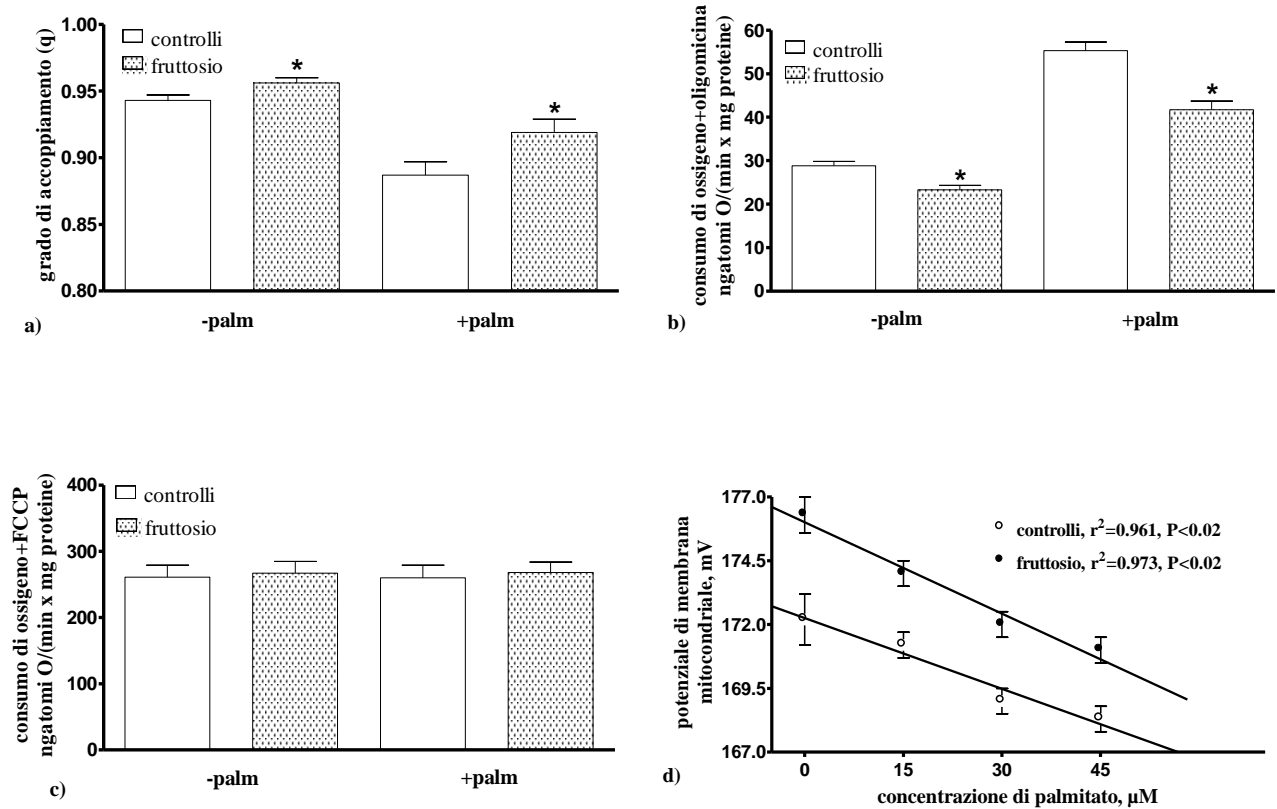


TABELLA 6. Stato ossidativo dei mitocondri epatici in ratti alimentati con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio per otto settimane.

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
Superossido dismutasi (U/mg proteine)	111 ± 7	83 ± 8*
Perossidazione lipidica (nmol TBARS/mg proteine)	0.56 ± 0.02	0.73 ± 0.02*

I valori sono riportati come medie ± SEM di sei differenti esperimenti.

*P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

TBARS= sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico.

Terzo disegno sperimentale

Le misure relative alla composizione del muscolo scheletrico, effettuate al termine delle 8 settimane di trattamento dietetico, mostrano che nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto a quelli di controllo si verifica un significativo aumento dei lipidi totali, dei trigliceridi e delle ceramidi, mentre non è stata riscontrata nessuna variazione nei livelli di glicogeno (Tabella 7).

Le analisi di western blot sul rapporto p-Akt/Akt nel muscolo scheletrico mostrano una variazione significativa tra i due gruppi di ratti (Fig. 8).

La capacità ossidativa mitocondriale è stata valutata nei mitocondri isolati dal muscolo scheletrico utilizzando substrati lipidici e NAD e FAD dipendenti (Tabella 8) e i risultati ottenuti non mostrano nessuna significativa variazione nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli: i tassi dello stato 3 della respirazione mitocondriale, misurata negli omogenati del tessuto, risultano significativamente maggiori nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli (Tabella 8).

Per valutare il danno ossidativo cellulare e le difese antiossidanti, sono state misurate la perossidazione lipidica e l'attività specifica della SOD (Tabella 8). I ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio esibiscono rispettivamente un aumento ed una diminuzione significativi della perossidazione lipidica e dell'attività della SOD, rispetto ai controlli.

L'efficienza energetica mitocondriale è stata valutata sia misurando lo stato 4 della respirazione in presenza di oligomicina e lo stato disaccoppiato in presenza di FCCP, sia valutando il potenziale di membrana nello stato 4 della respirazione, sia in presenza che in assenza di concentrazioni fisiologiche di palmitato. Lo stato 4 della respirazione indotto dall'oligomicina è significativamente più basso, sia in assenza che in presenza di palmitato (Fig. 9b), mentre la respirazione massima stimolata dall'FCCP non è influenzata dal trattamento dietetico, sia in presenza che in assenza di palmitato (Fig. 9c), così che l'efficienza mitocondriale, misurata come grado di accoppiamento q , è significativamente più alta nei ratti alimentati con il fruttosio rispetto ai

controlli, sia in assenza che in presenza di palmitato (Fig. 9a). I mitocondri muscolari dei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio sono meno responsivi all'effetto disaccoppiante degli acidi grassi, rispetto ai controlli, poiché il potenziale di membrana nello stato 4 risulta significativamente maggiore nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli, sia in assenza che in presenza di concentrazioni crescenti dell'acido grasso palmitato (Fig. 9d).

La caratterizzazione strutturale del WAT ha mostrato che il volume medio degli adipociti è significativamente più basso nel WAT sottocutaneo dei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli, mentre il numero di cellule per unità di volume è significativamente più alto (Tabella 9). Al contrario nel WAT viscerale dei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli, il volume medio degli adipociti è significativamente più alto, mentre il numero di cellule per unità di volume è significativamente più basso (Tabella 9). Le analisi della distribuzione dei diametri degli adipociti viscerali ha mostrato un significativo aumento nella proporzione degli adipociti più grandi, ed una significativa diminuzione nella proporzione degli adipociti più piccoli nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli (Tabella 10).

Analisi di regressione lineare hanno rivelato che il volume medio degli adipociti viscerali è fortemente correlato positivamente con la risposta dell'insulina plasmatica al carico di glucosio, così come ai lipidi corporei (Fig. 10a e 10b), mentre nessuna correlazione è stata riscontrata tra il volume medio degli adipociti sottocutanei e i livelli plasmatici di insulina o di lipidi corporei (dati non mostrati).

La sensibilità all'insulina del WAT sottocutaneo e viscerale è stata valutata effettuando analisi di western blot del rapporto p-Akt/Akt e i risultati ottenuti mostrano una significativa diminuzione di tale rapporto nel WAT viscerale, ma non nel sottocutaneo (Fig. 11a e 11b). Quando tale rapporto è normalizzato ai livelli di insulina plasmatici, i valori risultano significativamente inferiori sia nel WAT viscerale che nel sottocutaneo dei ratti alimentati con la dieta al fruttosio rispetto ai ratti di controllo.

L'attività lipolitica in vitro delle cellule del WAT sottocutaneo e viscerale è stata misurata in assenza ed in presenza di insulina e i risultati mostrano che la lipolisi degli adipociti sottocutanei non è influenzata dall'alimentazione ricca in fruttosio, mentre la capacità dell'insulina di inibire la lipolisi è diminuita negli adipociti dei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio. Negli adipociti viscerali, la lipolisi è significativamente più alta e l'effetto inibitorio dell'insulina è assente nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli (Tabella 11).

TABELLA 7. Composizione del muscolo scheletrico in ratti alimentati con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio per otto settimane.

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
Lipidi (mg/g)	34.8 ± 0.9	41.2 ± 1.9*
Trigliceridi (mg/g)	3.4 ± 0.5	7.0 ± 0.7*
Glicogeno (mg/g)	1.37 ± 0.05	1.47 ± 0.03
Ceramidi (AU/g)	0.018 ± 0.001	0.022 ± 0.001*

I valori sono riportati come medie ± SEM di sei differenti esperimenti.

*P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

AU, unità di assorbanza.

FIGURA 8. Rapporto p-AktAkt nel muscolo scheletrico in ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio o con una dieta di controllo per otto settimane. I valori sono riportati come medie \pm SEM di sei differenti esperimenti. *P< 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

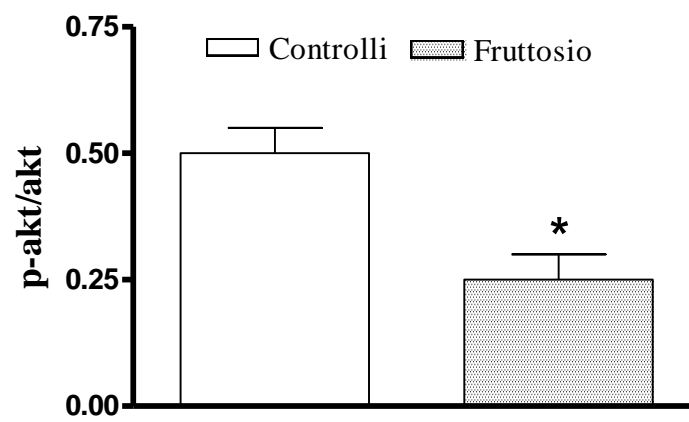


TABELLA 8. Capacità ossidativa e stato ossidativo dei mitocondri nel muscolo scheletrico di ratti alimentati con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio per otto settimane.

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
Stato 3 della respirazione in mitocondri isolati		
(ng atomi O/(min x mg proteine mitocondriali))		
Glutammato + malato	846 ± 55	861 ± 55
Succinato + rotenone	815 ± 66	888 ± 97
Palmitoil-CoA + carnitina + malato	341 ± 28	365 ± 23
Palmitoil-carnitina+ malato	304 ± 15	348 ± 22
Piruvato + malato	788 ± 41	819 ± 60
Stato 3 della respirazione negli omogenati dell'intero tessuto		
(ng atomi O/(min x g di tessuto umido))		
Glutammato + malato	3963 ± 333	5456 ± 451*
Succinato + rotenone	4172 ± 337	5305 ± 217*
Palmitoil-CoA + carnitina + malato	1971 ± 141	2474 ± 136*
Palmitoil-carnitina + malato	1521 ± 120	2013 ± 169*
Piruvato + malato	4429 ± 276	5723 ± 339*
Stato ossidativo mitocondriale		
Perossidazione lipidica	4.99 ± 0.25	5.93 ± 0.30*
(nmoliTBARS/mg proteine)		
Attività della SOD (U/mg proteine)	85.1 ± 6.0	59.2 ± 6.0

I valori sono riportati come medie ± SEM di sei differenti esperimenti.

*P< 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

TBARS= substrati reattivi all'acido tiobarbiturico.

SOD= superossido dismutasi.

FIGURA 9. Grado di accoppiamento calcolato dal consumo di ossigeno in presenza di oligomicina e dallo stato disaccoppiato in presenza di FCCP (a), consumo di ossigeno in presenza di oligomicina (b), stato disaccoppiato in presenza di FCCP (c), e potenziale di membrana nello stato 4 (d) in presenza e in assenza di palmitato nei mitocondri muscolari scheletrici di ratti alimentati per otto settimane con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio. I valori sono riportati come medie \pm SEM di sei differenti esperimenti. *P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

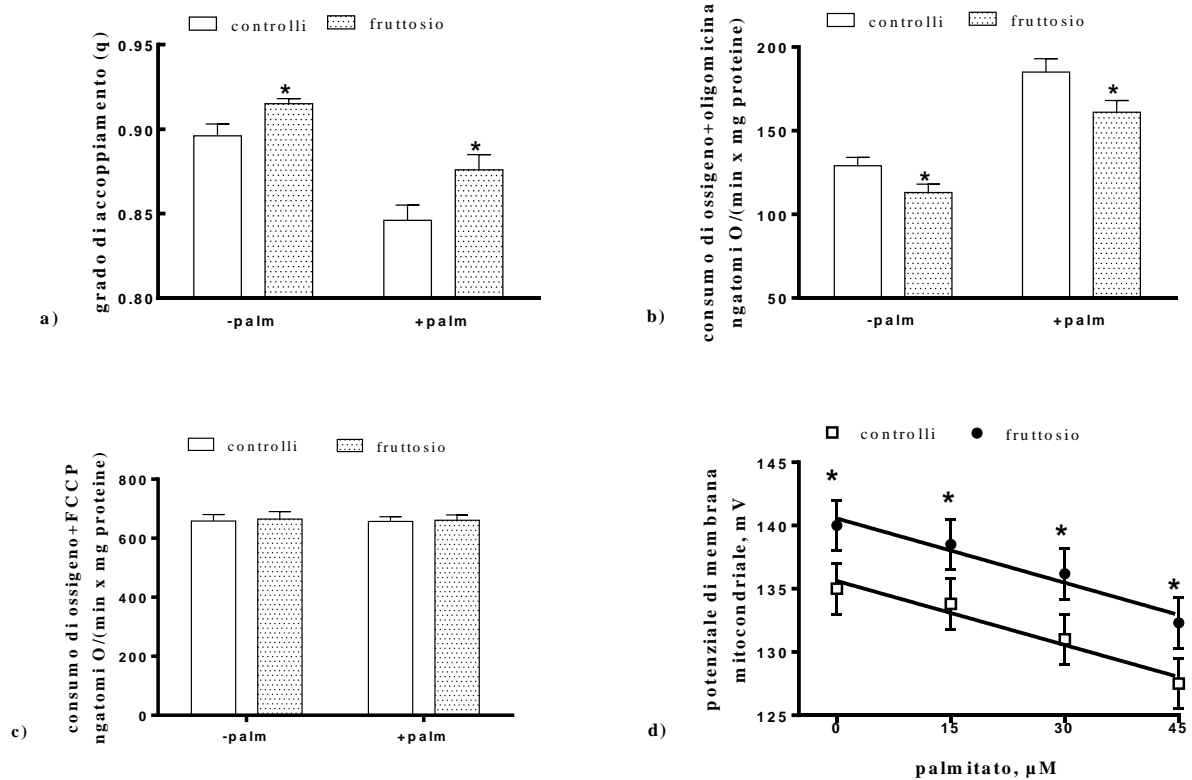


TABELLA 9. Volume cellulare e numero di adipociti per unità di volume nel tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale dei ratti alimentati con la dieta di controllo o con la dieta ricca in fruttosio per otto settimane.

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
Tessuto adiposo sottocutaneo		
N° cellule/unità di volume (mm ³)	24420 ± 2000	39600 ± 3000
Volume cellulare medio (µm ³)	40950 ± 2490	31.9 ± 2.0*
Tessuto adiposo viscerale		
N° cellule/unità di volume (mm ³)	50432 ± 2204	35068 ± 683*
Volume cellulare medio (µm ³)	19870 ± 868	28540 ± 556*

I valori sono riportati come medie ± SEM di sei differenti esperimenti.

*P<0,05 rispetto alla dieta di controllo.

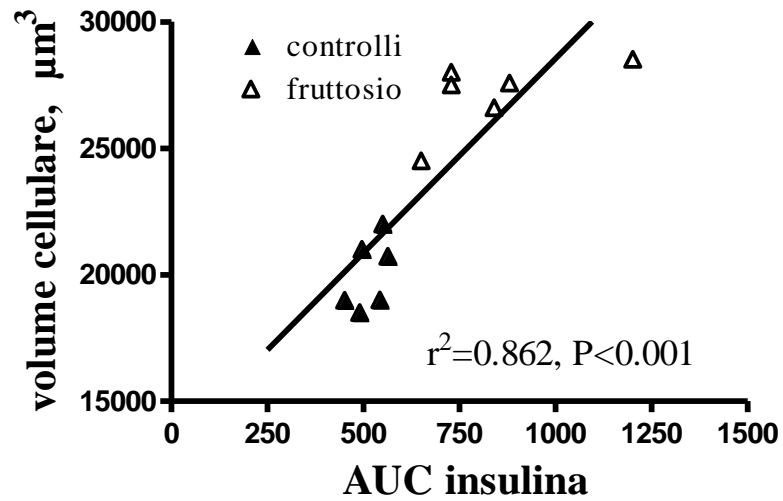
TABELLA 10. Distribuzione del diametro cellulare nel tessuto adiposo viscerale di ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio o con una dieta di controllo per otto settimane.

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
<25 μm	26 \pm 1	8 \pm 1*
25-50 μm	23 \pm 1	17 \pm 1
50-75 μm	26 \pm 1	23 \pm 1
75-100 μm	18 \pm 1	26 \pm 1*
>100 μm	7 \pm 1	27 \pm 1*

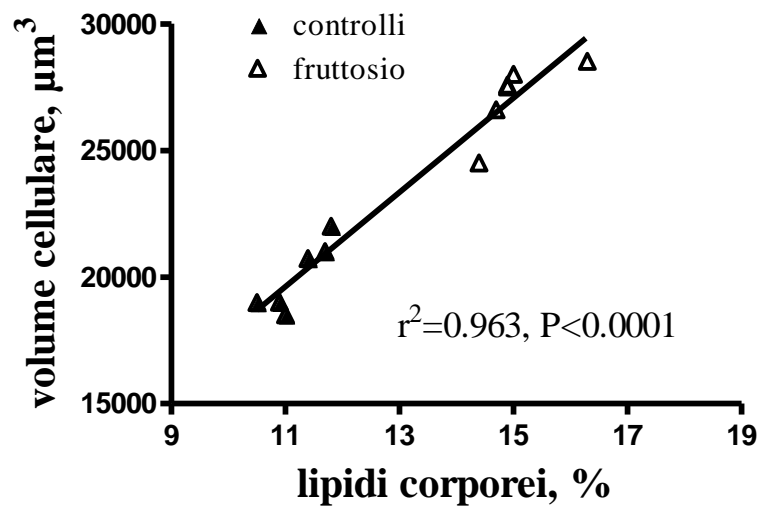
I valori sono riportati come medie \pm SEM di sei differenti esperimenti.

* P<0.05 rispetto alla dieta di controllo.

FIGURA 10. Correlazione tra il volume medio degli adipociti viscerali e la risposta dell'insulina plasmatica al carico di glucosio (a) e i lipidi corporei (b) in ratti alimentati per otto settimane con una dieta di controllo o con una dieta ricca in fruttosio. I valori sono riportati come medie \pm SEM di sei differenti esperimenti.



a)



b)

FIGURA 11. Rapporto p-Akt/Akt e rapporto (p-Akt/Akt)/insulina plasmatica nel tessuto adiposo sottocutaneo (a) e viscerale (b) in ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio o con una dieta di controllo per otto settimane. I valori sono riportati come medie \pm SEM di sei differenti esperimenti.

*P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo.

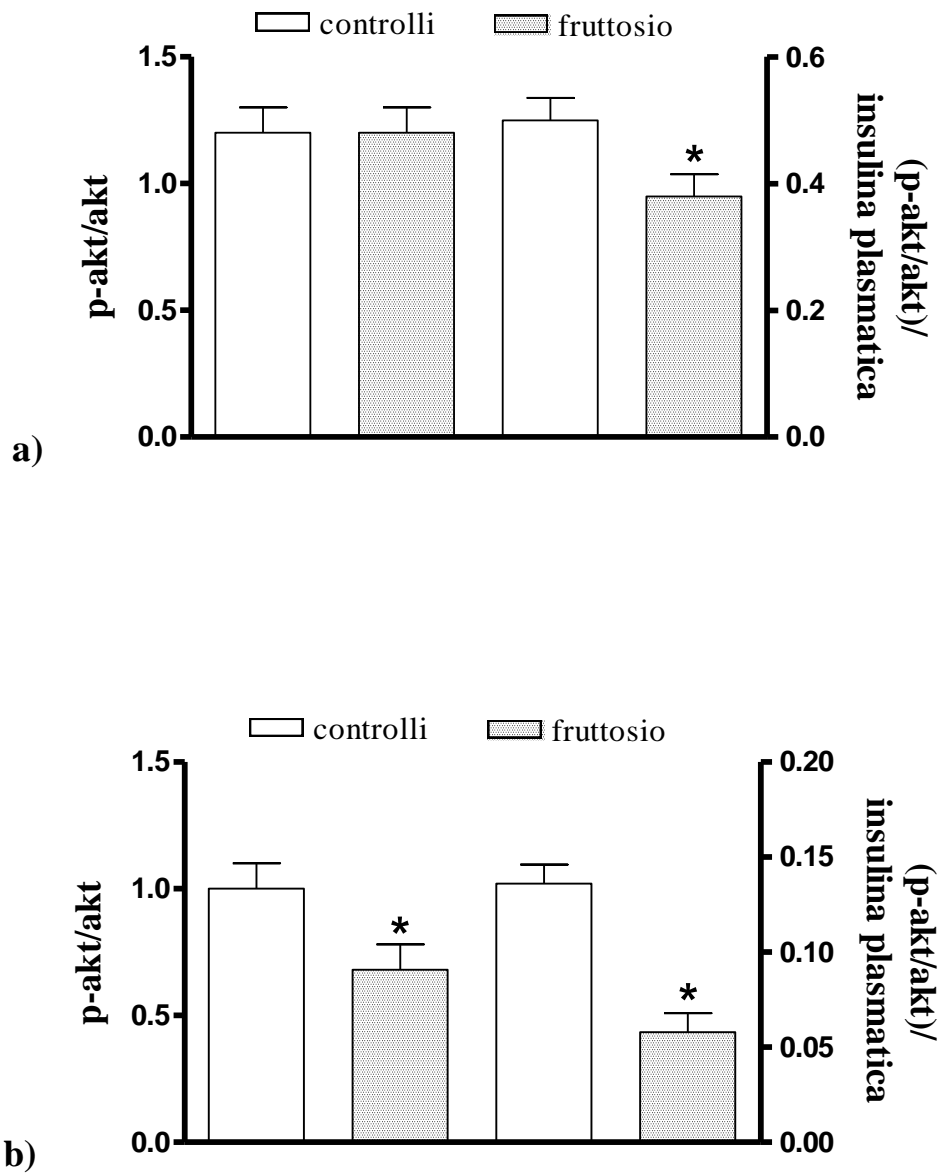


TABELLA 11. Attività lipolitica in adipociti sottocutanei e viscerali in ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio o con una dieta di controllo per otto settimane.

	Dieta di controllo	Dieta ricca in fruttosio
Adipociti sottocutanei		
- insulina	32.0 ± 2.0	33.9 ± 2.0
+ insulina	20.6 ± 2.1#	31.9 ± 2.0*
% di inibizione	33.7 ± 2.2	5.4 ± 1.1§
Adipociti viscerali		
- insulina	29.2 ± 1.0	33.8 ± 1.0*
+ insulina	23.8 ± 1.0#	32.9 ± 2.0*
% di inibizione	21.9 ± 2.0	1.0 ± 1.0§

I valori sono espressi come µg di glicerolo/(ora x 10⁻⁶ cellule) e riportati come medie ± SEM di sei differenti esperimenti.

*P < 0.05 effetto significativo della dieta ricca in fruttosio;

#P < 0.05 effetto dell'insulina (ANOVA a due vie seguita dal test di Bonferroni);

§P < 0.05 rispetto alla dieta di controllo. (t-Test a due code).

DISCUSSIONE

L'aumento del consumo di fruttosio e saccarosio in tutto il mondo ha richiamato l'attenzione sugli effetti metabolici del fruttosio, soprattutto per quanto riguarda lo sviluppo di obesità. I modelli animali sono utili per stabilire l'impatto dell'assunzione del solo fruttosio sull'epidemia di obesità. Con il mio lavoro di tesi ho dimostrato che l'elevato introito di fruttosio a lungo termine in ratti adulti e sedentari non induce solo alterazioni metaboliche tipiche dell'obesità umana, ma anche alterazioni a livello dei tessuti metabolicamente rilevanti come fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo.

I dati relativi alla composizione corporea di ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio mostrano un aumento significativo dell'energia corporea rispetto al gruppo di controllo e tale aumento non è collegato all'aumento del peso corporeo, invariato tra i due gruppi sperimentali, ma ad un aumento dei lipidi corporei. Dai risultati ottenuti in questo disegno sperimentale si evince inoltre che la condizione di obesità osservata nei ratti sottoposti ad una dieta ricca in fruttosio non è associata a iperfagia; infatti, l'energia metabolizzabile introdotta è simile nei due gruppi di ratti, risultato simile a quello ottenuto precedentemente su ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi [Crescenzo R et al, 2008]. In più l'alimentazione ricca in fruttosio non altera il contenuto di proteine corporee, e ciò indica che le diete ad alto contenuto di grassi sono più deleterie perché causano anche un danneggiamento della massa magra [Lionetti L et al, 2007], sebbene il contenuto di proteine delle diete ad alto contenuto di grassi, a basso contenuto di grassi e ricche in fruttosio sia lo stesso.

Una condizione metabolica tipica dell'obesità umana è quella di una alterata sensibilità all'azione dell'insulina, o insulino-resistenza. Ho ritenuto quindi interessante valutare se una dieta ipolipidica ma ricca in fruttosio fosse in grado di indurre oltre all'obesità anche la resistenza

all'insulina, utilizzando la determinazione della curva da carico del glucosio che consente di ottenere informazioni sulla sensibilità sistemica, epatica e muscolare all'insulina. Infatti, gli indici derivati dalle misure a digiuno delle concentrazioni di insulina e glucosio, come l'indice HOMA, danno indicazioni sul grado di sensibilità all'insulina del fegato, poiché nello stato postassorbitivo circa l'80-85% del glucosio proviene dal fegato, e quindi il grado di resistenza epatica all'insulina è tanto maggiore quanto maggiore è la velocità di produzione del glucosio e/o la concentrazione dell'insulina [Abdul Ghani MA et al, 2008]. Inoltre, durante i primi 30 minuti della curva da carico del glucosio l'incremento del glucosio e dell'insulina plasmatica sono proporzionali al grado di resistenza epatica all'insulina [Abdul Ghani MA et al, 2008]. Infine, la parte finale della curva da carico di glucosio dà informazioni riguardo la resistenza muscolare (quindi corporea) all'azione dell'insulina. I risultati ottenuti indicano che già dopo 4 settimane di trattamento dietetico sono evidenti alterazioni dell'omeostasi glicemica. Infatti, si riscontra un aumento significativo dei livelli plasmatici di insulina nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio per tutta la durata della curva da carico, mentre non si osserva alcuna variazione significativa dei livelli plasmatici di glucosio: ciò indica che nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio il controllo della glicemia è ancora mantenuto ma si realizza a scapito di una maggiore secrezione di insulina da parte del pancreas per contrastare il minore effetto a livello delle cellule bersaglio, in particolare le cellule muscolari scheletriche. Inoltre, il significativo aumento dell'insulina plasmatica a digiuno, dell'indice HOMA e dell'indice di resistenza epatica nei ratti trattati con fruttosio indica una condizione di insulino-resistenza a livello epatico. Al termine del trattamento dietetico si è evidenziato un peggioramento dello stato di resistenza all'insulina sia epatica che muscolare, con la comparsa di iperglicemia a digiuno ed incrementata risposta glicemica durante la curva da carico. Tali ulteriori modificazioni indicano che dopo 8 settimane di trattamento dietetico l'aumentata secrezione di insulina non è più in grado di compensare la ridotta risposta nelle cellule bersaglio, e il controllo della glicemia risulta danneggiato.

Un'altra caratteristica frequentemente associata all'obesità umana e l'alterazione del quadro lipidico plasmatico, da me riscontrato anche nei ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio, dove ho potuto evidenziare un incremento dei trigliceridi e dei NEFA. Dal momento che la dieta ricca in fruttosio somministrata ai ratti è ipolipidica, è possibile ipotizzare che il suddetto trattamento dietetico induca un aumento della produzione endogena di lipidi nel fegato che a sua volta porta all'insorgenza di obesità e successivamente della condizione di insulino-resistenza. Nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio vi è anche un aumento della perossidazione lipidica plasmatica, che indica che nei ratti suddetti si verifica uno squilibrio ossidativo, in accordo con l'idea secondo cui lo stress ossidativo è un meccanismo che contribuisce all'aumento della pressione sanguigna e alla resistenza all'insulina tipica dei modelli animali di sindrome metabolica innescata dalle diete ricche in fruttosio [Delbosc S et al, 2005]. La perdita della sensibilità all'insulina può essere guidata dall'infiammazione [van de Woestijne P et al, 2011], e con i risultati da me ottenuti ho dimostrato che i ratti trattati con la dieta ricca in fruttosio esibiscono livelli plasmatici più elevati di LPS e TNF- α . Le aumentate concentrazioni di LPS plasmatiche nei ratti trattati con il fruttosio, rispetto ai ratti di controllo, sono in accordo con i precedenti risultati ottenuti in topi diventati obesi dopo una dieta ad elevato contenuto di grasso o di fruttosio [Carvalho BM et al, 2012].

Per determinare le cause dell'eccessiva deposizione di lipidi riscontrata in questi ratti ho deciso di valutare la lipogenesi de novo, una via metabolica che porta alla produzione di lipidi partendo dai carboidrati: ho quindi misurato VO_2 e VCO_2 in modo da poter calcolare l'RQ, che fornisce una stima qualitativa e quantitativa dei substrati ossidati, da cui ho ricavato l'NPRQ; da questo, mediante valori tabulati, ho ricavato il tasso di lipogenesi de novo. I valori del NPRQ delle 24 ore e i tassi della lipogenesi de novo netta nei ratti alimentati con fruttosio sono apparsi significativamente più alti a partire dalla seconda settimana di trattamento e permanevano tali durante tutto il periodo sperimentale: la stimolazione della lipogenesi de novo netta sembra essere una delle principali cause determinanti l'accumulo eccessivo di lipidi in questi ratti e quindi la

sostituzione di carboidrati complessi con uno zucchero semplice come il fruttosio rende la dieta ipolipidica maggiormente lipogenica. Un aumento della lipogenesi de novo è stato anche trovato in ratti e uomini dopo un'alimentazione a lungo termine con il fruttosio [Stanhope KL et al, 2009], e quindi il modello animale da me utilizzato sembra essere molto utile nello studio degli effetti metabolici del fruttosio.

Un altro risultato importante è che il regime dietetico ricco in fruttosio comporta una deposizione di lipidi non solo nel tessuto adiposo, deputato alla conservazione dell'energia introdotta in eccesso, ma anche in sedi ectopiche: in particolar modo a livello epatico si riscontra un significativo incremento del contenuto lipidico, condizione che può portare allo sviluppo di steatosi epatica e che potrebbe spiegare anche l'aumento da me riscontrato dei livelli delle transaminasi ALT e AST, indice di danno epatico: ciò indica che le diete ipolipidiche ad alto contenuto di fruttosio possono causare effetti metabolici simili a quelli indotti dal trattamento con una dieta iperlipidica [Crescenzo R et al, 2008]. Tuttavia nei ratti alimentati con una dieta iperlipidica l'aumento dei lipidi epatici (+77%) è maggiore dell'aumento dei lipidi corporei (+45%), mentre nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio l'aumento dei lipidi epatici (+13%) è simile all'aumento dei lipidi corporei (+20%). Il tessuto epatico dei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio esibisce anche un maggiore contenuto di glicogeno, che potrebbe essere dovuto alla resistenza all'insulina di questo tessuto e alla conseguente incapacità di sopprimere la gluconeogenesi. Una simile alterazione nel deposito di glicogeno è stata già precedentemente riscontrata dopo sole due settimane di trattamento dietetico con il fruttosio [Koo HY et al, 2008]. La presenza di uno stato di resistenza epatica all'insulina emersa dai dati sull'indice HOMA ha trovato conferma nella valutazione del grado di attivazione di un effettore a valle della via di segnalazione dell'insulina stessa, la proteina p-Akt, attivazione che è risultata ridotta nei ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio. Questo risultato è in accordo con l'aumento del contenuto

delle ceramidi nel fegato, poiché è noto che le ceramidi sono state identificate come mediatori chiave di insulino-resistenza, attraverso l'inibizione della p-Akt.

Poiché il fegato è l'organo principalmente coinvolto nel metabolismo del fruttosio e sede della lipogenesi de novo, ho misurato l'attività di due enzimi coinvolti in questa via metabolica, la FAS e l'SCD-1: entrambe le attività enzimatiche sono significativamente incrementate dall'alimentazione con fruttosio e questo aumento potrebbe essere determinato dalla condizione iperinsulinemica dei ratti alimentati con fruttosio, poiché l'insulina è in grado di stimolare la lipogenesi de novo anche in condizioni di insulino resistenza epatica: quindi in risposta all'aumento dell'introito di fruttosio, la crescente lipogenesi de novo epatica potrebbe sia contribuire ad una maggiore deposizione lipidica, attraverso la secrezione di lipidi neosintetizzati nel flusso sanguigno e successiva deposizione a livello del tessuto adiposo, sia spiegare la deposizione ectopica dei lipidi nel fegato.

Poiché la lipogenesi de novo è un processo molto dispendioso che richiede ATP, ho valutato se i ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di fruttosio presentano alterazioni della funzionalità mitocondriale, dato che i mitocondri rappresentano il sito cellulare principalmente coinvolto nella conversione dell'energia metabolica in forme utili a promuovere le reazioni cellulari. Ho quindi misurato la capacità respiratoria sia nell'omogenato di fegato (espressa per g di tessuto), che riflette la massa proteica mitocondriale e l'attività specifica degli enzimi respiratori, sia nei mitocondri isolati (espressa per mg di proteine mitocondriali), che riflette solo l'attività specifica degli enzimi respiratori, in modo che variazioni nell'attività enzimatica possono essere rilevate sia negli omogenati che nei mitocondri isolati, mentre variazioni della massa proteica mitocondriale possono essere rilevate solo nelle misure sugli omogenati. In più ho utilizzato diversi substrati al fine di ottenere informazioni sui differenti sistemi di trasporto e siti di ingresso degli equivalenti ridotti nella catena respiratoria. I risultati ottenuti nei ratti alimentati con fruttosio hanno mostrato un aumento della capacità respiratoria nell'omogenato, ma non nei mitocondri isolati,

indicando un aumento della capacità respiratoria dell'intero tessuto dovuto ad un'espansione della massa mitocondriale.

Un altro parametro che ho misurato per determinare la funzione dei mitocondri è il grado di accoppiamento tra il consumo di ossigeno e l'ATP sintasi che varia in risposta ai bisogni metabolici della cellula [Johannsen DL, Ravussin E, 2009], determina l'efficienza della fosforilazione ossidativa ed è regolato dalla quantità di acidi grassi liberi che possono agire come disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa [Rial E et al, 2010]. I risultati hanno evidenziato che il crescente quantitativo di ATP necessario per le vie biosintetiche è ottenuto ad un costo minore, dal momento che i mitocondri epatici aumentano il grado di accoppiamento e sono meno sensibili all'effetto disaccoppiante degli acidi grassi. Una maggiore efficienza di accoppiamento implica il consumo di minore energia, che potrebbe in parte spiegare il più alto quantitativo di lipidi corporei nei ratti alimentati con fruttosio.

Un'altra conseguenza indesiderata dell'aumentato grado di accoppiamento è una maggiore produzione di radicali liberi: infatti la produzione di ROS da parte della catena respiratoria mitocondriale è maggiore quando aumenta il potenziale di membrana [Korshunov SS et al, 1997] e la produzione di ROS è indicata come una delle possibili cause che portano alla resistenza all'insulina [Houstis N et al, 2006]. I mitocondri epatici hanno mostrato segni di danno ossidativo, indicati da un aumento del grado di perossidazione lipidica, associati ad una diminuzione dell'attività della SOD, uno degli enzimi del sistema delle difese antiossidanti. Il crescente stress ossidativo dei mitocondri epatici dei ratti alimentati con fruttosio potrebbe essere una delle cause che ha determinato l'insorgenza dell'insulino-resistenza in questo tessuto.

L'aumento della sintesi epatica di lipidi e la conseguente maggiore circolazione di questi ultimi, oltre ad avere un grosso impatto sull'omeostasi corporea, può influenzare anche l'attività di altri due organi metabolicamente rilevanti: il muscolo scheletrico ed il tessuto adiposo.

I risultati ottenuti a livello del muscolo scheletrico indicano che nei ratti trattati rispetto a quelli di controllo si verifica un significativo aumento dei lipidi totali, dei trigliceridi e delle ceramidi, mentre non ho trovato variazioni nei livelli di glicogeno. È da notare che la percentuale di aumento delle ceramidi muscolari è simile a quello dei NEFA plasmatici, in accordo con risultati precedentemente ottenuti in soggetti umani obesi che mostravano una correlazione tra ceramidi muscolari e NEFA plasmatici [Adams JM et al, 2004]. Poiché la capacità di tamponare i livelli di glucosio, in seguito ad un carico di quest'ultimo, è determinata soprattutto dalla risposta metabolica del muscolo scheletrico all'insulina, ho cercato di studiare un effettore a valle della via di segnalazione dell'insulina stessa e per questo ho effettuato analisi di Western Blot relative ai livelli di p-Akt nel muscolo scheletrico isolato da entrambi i gruppi sperimentali: ho riscontrato una significativa diminuzione del rapporto p-Akt/Akt nei ratti alimentati con la dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli. Questo risultato è in accordo con l'aumento del contenuto delle ceramidi nel muscolo scheletrico, poiché è noto che le ceramidi possono svolgere un ruolo chiave nel determinare l'insorgenza della resistenza all'insulina, attraverso l'inibizione della p-Akt [Coen PM, Goodpaster BH, 2012].

La resistenza corporea all'insulina è di solito associata ad alterazioni dell'attività metabolica e ad uno squilibrio delle funzioni mitocondriali del muscolo scheletrico [Pagel-Langenickel I et al, 2010], mentre altri studi hanno indicato che la resistenza all'insulina può essere dissociata dalla capacità respiratoria mitocondriale; pertanto in studi sui ratti in cui gli animali ricevevano una dieta ricca di grassi, la resistenza all'insulina si sviluppava insieme a un aumento del contenuto mitocondriale e un aumento della capacità di ossidare i grassi [Turner N et al, 2007]. Il contenuto di mitocondri nella cellula e l'efficienza della fosforilazione ossidativa sono i principali determinanti del rendimento mitocondriale: ho quindi valutato il grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa e l'effetto disaccoppiante del palmitato. Ho inoltre misurato la capacità respiratoria sia nell'omogenato di muscolo, sia nei mitocondri isolati, utilizzando diversi substrati. I risultati

ottenuti nei ratti alimentati con fruttosio hanno mostrato un aumento della capacità respiratoria nell'omogenato, ma non nei mitocondri isolati, indicando un aumento della capacità respiratoria dell'intero tessuto dovuto ad un incremento della massa mitocondriale. Ho invece valutato l'efficienza energetica mitocondriale attraverso la misura dello stato 4 della respirazione in presenza di oligomicina e il disaccoppiamento in presenza di FCCP: la respirazione relativa allo stato 4 in presenza di oligomicina, risulta significativamente diminuita sia in assenza che in presenza di palmitato, mentre la respirazione massima stimolata dall'FCCP non è influenzata da un'alimentazione ricca in fruttosio, sia in assenza che in presenza di palmitato, così che l'efficienza mitocondriale, valutata come grado di accoppiamento (q), è significativamente più alta nei ratti alimentati con fruttosio rispetto ai controlli, sia in assenza che in presenza di palmitato. Da questi risultati si può ipotizzare che in ratti alimentati con fruttosio è aumentata la massa mitocondriale del muscolo scheletrico e ciò potrebbe essere dovuto ad un aumentato tasso di sintesi proteica mitocondriale. L'aumento della massa mitocondriale potrebbe rappresentare un meccanismo compensatorio, relativo alla maggiore disponibilità di acidi grassi e ai livelli più alti di NEFA plasmatici, poiché è stato dimostrato che l'innalzamento dei livelli di NEFA plasmatici induce un'aumentata biogenesi mitocondriale nel muscolo scheletrico [Garcia-Roves P et al, 2007]. L'aumento compensatorio della massa mitocondriale, però, non riesce a tamponare quest'eccessiva disponibilità di NEFA, a causa dell'incrementato accoppiamento mitocondriale nei ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio. Di conseguenza nel muscolo scheletrico, a parità di necessità energetiche, viene ossidata una minore quantità di substrati per produrre la stessa quantità di ATP. Le alterazioni del compartimento mitocondriale e la maggiore disponibilità di substrati lipidici nei ratti trattati spiegano anche l'aumentato livello di trigliceridi nel muscolo scheletrico, strettamente correlato all'incremento nella deposizione di tessuto adiposo intramuscolare (IMAT); l'aumento dell'IMAT è considerato determinante nello sviluppo di resistenza all'insulina [Johannsen DL,

Ravussin E, 2009], attraverso l'accumulo di diacilglicerolo e ceramidi all'interno delle cellule muscolari scheletriche [Martins AR et al, 2012].

In più, come conseguenza del maggior grado di accoppiamento ho riscontrato un aumento dello stress ossidativo, indicato da un significativo incremento della perossidazione lipidica e un decremento dell'attività specifica della SOD, rispetto ai ratti di controllo: il crescente stress ossidativo mitocondriale potrebbe contribuire all'insorgenza dell'insulino-resistenza in questo tessuto.

L'aumento dell'efficienza energetica mitocondriale del muscolo scheletrico, ed il conseguente risparmio di substrati, da un lato contribuisce all'eccessiva deposizione lipidica nel tessuto adiposo, favorendo lo sviluppo di obesità, dall'altro spiega la deposizione ectopica di lipidi nel muscolo scheletrico che, sotto forma di ceramidi, determina l'insorgenza di resistenza all'insulina.

Per indagare sulle conseguenze dell'eccessiva deposizione lipidica sul tessuto adiposo ho valutato come prima cosa le alterazioni morfologiche dei depositi di grasso, poiché è noto che la morfologia dell'adipocita è legata alla sua funzione. In particolare, ho osservato che in ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio l'aumento del contenuto lipidico corporeo totale è associato con un aumento del numero degli adipociti sottocutanei, il cui diametro medio diminuisce, mentre il diametro degli adipociti viscerali intra-addominali aumenta, portando ad una diminuzione del numero di cellule per unità di volume.

Le alterazioni morfologiche a livello delle due popolazioni di adipociti riscontrate sono in accordo con i dati riportati in letteratura riguardanti la risposta di queste cellule al sovraccarico lipidico; infatti è noto che gli adipociti sottocutanei sono più propensi all'iperplasia quando sovraccarichi di lipidi [Wronska A, Kmiec Z, 2012], mentre gli adipociti viscerali reagiscono ad un eccesso lipidico preferenzialmente con ipertrofia [Di Girolamo M et al, 1998]. Così, sembra che,

indipendentemente dalla fonte (dieta o sintesi epatica) e quindi dalla tipologia (chilomicroni o VLDL), la risposta delle cellule adipose al flusso lipidico aumentato sia simile. L'aumento del volume cellulare medio degli adipociti viscerali è il risultato di un cambiamento nella composizione della popolazione cellulare, con un aumento significativo dei grandi adipociti, il cui contributo percentuale rispetto alle cellule totali è circa raddoppiato (dal 25 al 53%). Inoltre è stata osservata una correlazione molto forte tra il volume cellulare medio e la risposta plasmatica dell'insulina ad un carico di glucosio, così come tra il volume cellulare medio e i lipidi corporei, indicando quindi che nel modello dietetico di obesità non genetica ed insulino-resistenza la morfologia delle cellule adipose viscerali è un buon predittore dello squilibrio metabolico dell'intero organismo.

E' noto che la dimensione degli adipociti è strettamente correlata con la funzione cellulare e con la sensibilità all'azione dell'insulina [Lundgren M et al, 2007], in particolare nel grasso viscerale [Ibrahim MM, 2010], pertanto l'aumento delle dimensioni cellulari in questo deposito adiposo in seguito a somministrazione a lungo termine di una dieta ricca in fruttosio è predittivo di variazioni delle funzioni cellulari. Per indagare su tale possibilità, è stata valutata la sensibilità all'insulina tramite la determinazione dei livelli di p-Akt nei due depositi di grasso presi in considerazione. I risultati mostrano che le cellule del tessuto adiposo viscerale in ratti nutriti con una dieta ricca in fruttosio esibiscono una diminuzione dei livelli di p-Akt, quindi sono meno sensibili all'insulina, mentre nessuna variazione è stata trovata nelle cellule del tessuto adiposo sottocutaneo. Tuttavia, considerando che i ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio presentano livelli elevati di insulina nel plasma, i livelli della p-Akt normalizzati ai livelli di insulina plasmatica rivelano che un danno al meccanismo di segnalazione dell'insulina è presente anche nelle cellule del tessuto sottocutaneo, anche se il grado di danneggiamento (31%) è inferiore a quello trovato nel grasso viscerale (52%), in modo che il normale meccanismo di segnalazione insulinica può essere mantenuto attraverso un aumentato livello di insulina plasmatica.

Le cellule del tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale mostrano anche un diverso comportamento metabolico e una diversa regolazione sia nei ratti di controllo che nei ratti nutriti con una dieta ricca in fruttosio. Infatti, in ratti di controllo l'effetto inibitorio dell'insulina sulla attività lipolitica cellulare è significativamente maggiore negli adipociti sottocutanei rispetto a quelli viscerali, in accordo con una maggiore sensibilità all'insulina del grasso sottocutaneo [Ibrahim MM, 2010]. Inoltre nei due depositi di grasso sono evidenti diverse risposte ad un'alimentazione ricca in fruttosio, poiché nel grasso sottocutaneo è stata trovata solo una diminuzione significativa dell'effetto inibitorio dell'insulina, mentre negli adipociti viscerali la perdita dell'inibizione dell'insulina è accoppiata con un significativo aumento della lipolisi basale. Quest'ultimo risultato potrebbe essere spiegato tenendo conto che gli adipociti più grandi hanno una maggiore velocità di lipolisi rispetto agli adipociti più piccoli [Berger JJ, Barnard RJ, 1999], e che la dimensione degli adipociti viscerali è maggiore nei ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio rispetto ai controlli. L'effetto minore dell'insulina sull'inibizione della lipolisi che ho riscontrato è simile a quello che si verifica dopo la somministrazione a lungo termine di saccarosio [Soria A, 2001], ed è responsabile degli aumentati livelli plasmatici di NEFA trovati in ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio, in quanto i livelli plasmatici di NEFA dipendono dall'attività metabolica del tessuto adiposo [Arner P, 2005]. Ciò è particolarmente interessante in quanto è ormai noto che un maggior rifornimento di NEFA nel muscolo, fegato e pancreas è associato ad una ridotta capacità dell'insulina di stimolare l'utilizzo e il deposito di glucosio (resistenza all'insulina) [Martins AR et al, 2012].

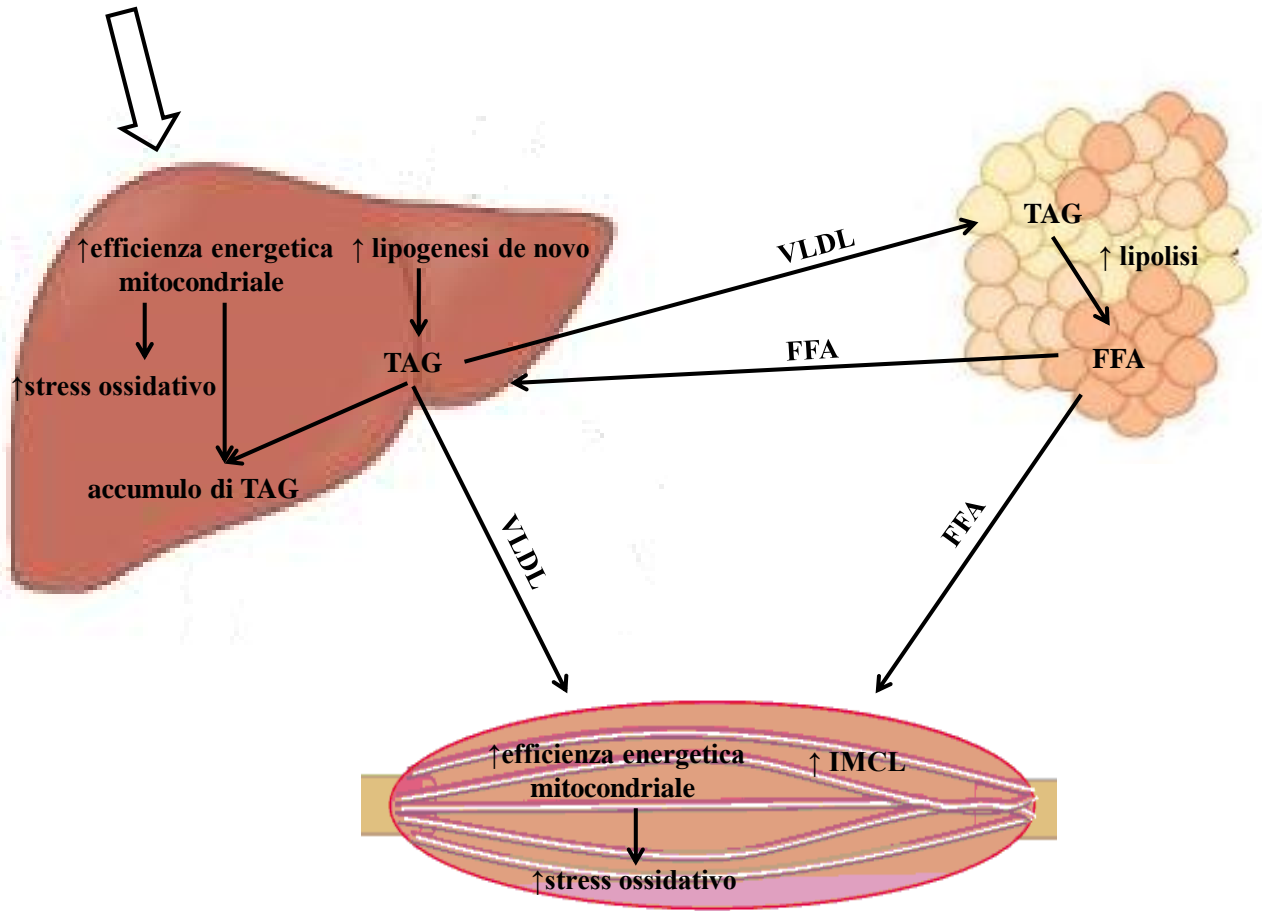
CONCLUSIONI

In conclusione i dati da me ottenuti sottolineano l'importante ruolo della composizione dietetica nell'induzione dell'obesità ed indicano che non solo l'elevato contenuto lipidico, ma anche la presenza di uno zucchero semplice nella dieta può influenzare la composizione energetica corporea: infatti diete ricche in fruttosio, pur essendo ipolipidiche, presentano gli stessi effetti delle diete iperlipidiche, cioè obesità e insulino-resistenza. Inoltre il compartimento dei mitocondri epatici sembra essere fortemente influenzato dall'alimentazione con fruttosio; l'aumentata efficienza mitocondriale permette agli epatociti di bruciare un minor quantitativo di substrati per produrre ATP per la lipogenesi de novo, la gluconeogenesi o altri bisogni energetici. L'aumentata lipogenesi dà origine ad una deposizione lipidica ectopica e del tessuto adiposo e il più alto accoppiamento mitocondriale causa stress ossidativo. Tali conseguenze indicano che un introito elevato di fruttosio a lungo termine in ratti adulti e sedentari induce non solo gli squilibri metabolici tipici dell'obesità, ma anche una deposizione ectopica di lipidi e un'alterazione della sensibilità all'insulina, in aggiunta ad alterazioni dell'energetica mitocondriale, effetti simili a quelli indotti da diete iperlipidiche [Lim JS et al, 2010]. In più i risultati suggeriscono che questo trattamento dietetico ha un grosso impatto, non solo a livello del tessuto epatico, che è responsabile per circa il 90% del metabolismo del fruttosio, ma anche sul muscolo scheletrico, in cui si verifica una diminuzione della sensibilità all'insulina ed un incremento dell'efficienza mitocondriale; quest'ultimo cambiamento ha effetti metabolici dannosi, provocando risparmio energetico e contribuendo alla più alta efficienza metabolica dei ratti sottoposti ad un trattamento con una dieta ricca in fruttosio. Infine, i risultati ottenuti dimostrano anche che un'alimentazione ricca in fruttosio a lungo termine è associata con uno stato di resistenza all'insulina a livello del tessuto adiposo viscerale e, in misura minore, nel tessuto adiposo sottocutaneo. Tale condizione innesca un aumento

della lipolisi e, quindi un conseguente aumento dei NEFA plasmatici, aumento che a sua volta ha un impatto su altri tessuti (fegato e muscolo scheletrico) determinando così resistenza sistemica all'insulina. Le modificazioni morfologiche e funzionali, in particolare nel tessuto adiposo viscerale, che ho riscontrato nei ratti alimentati con una dieta ricca in fruttosio sono altamente predittive dell'obesità morbosa e dell'insulino-resistenza e contribuiscono al peggioramento delle alterazioni metaboliche indotte da una dieta ricca in fruttosio anche se povera di grassi.

Dal momento che nel mondo occidentale l'alimentazione prevede un consumo sempre più elevato di cibi ricchi sia in grasso che in fruttosio, risulta evidente come un simile stile di vita, associato ad una ormai diffusa condizione di sedentarietà, possa avere gravi conseguenze per la salute, favorendo lo sviluppo di patologie metaboliche connesse all'obesità.

FRUTTOSIO \Rightarrow **OBESITÀ** \Rightarrow **INSULINO-RESISTENZA**



BIBLIOGRAFIA CITATA

- Abdul-Ghani MA, Matsuda M, DeFronzo RA (2008). Strong association between insulin resistance in liver and skeletal muscle in non-diabetic subjects. *Diabet Med* 25(11):1289-94.
- Adams JM, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistance humans. *Diabetes* 53, 25-31.
- Amara CE, Marcinek DJ, Shankland EG, Schenkman KA, Arakaki LS, Conley KE (2008). Mitochondrial function in vivo: spectroscopy provides window on cellular energetics. *Methods* 46, 312–318.
- Arner P (2005). Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:471–482.
- Arner P (2003). The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. Review. *Trends in Endocr Metab*, 14:137-145.
- Arner P (2001). Free fatty acids- do they play a central role in type 2 diabetes? *Diabetes Obes Metab* 3:11-19.
- Bantle JP, Laine DC, Thomas JW (1986). Metabolic effects of dietary fructose and sucrose in types I and II diabetic subjects. *JAMA* 256:3241–3246.
- Barr HG, Mc Cracken KJ (1984). *Brit J Nutr* 51: 379-387.
- Befroy DE, Petersen KF, Dufour S, Mason GF, Rothman DL, Shulman GI (2008). *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16701-16706.
- Berger JJ, Barnard RJ (1999). Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity. *J Appl Physiol* 87(1):227–232.

- Bergheim I, Weber S, Vos M, Kramer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, Bischoff SC (2008). Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol* 48: 983–992.
- Bizeau ME, Pagliassotti MJ (2005). Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metab Clin Exp* 54: 1189–1201.
- Bjorkman O, Gunnarsson R, Hagström E, Felig P, Wahren J (1989). Splanchnic and renal exchange of infused fructose in insulin-deficient type 1 diabetic patients and healthy controls. *J Clin Invest* 83: 52–59.
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaume E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* 118, 789–800.
- Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsøe R, Dela F (2007). *Diabetologia* 50:790-796.
- Boveris A, Poderoso JJ, Carreras MC, Cadenas E (2000). Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899, 121–135.
- Bovin LF, Brynskov J, Hegedüs L, Jess T, Nielsen CH, Bendtzen K (2007). Gene expression profiling in autoimmune diseases: chronic inflammation or disease specific patterns? *Autoimmunity.* 40(3):191-201.
- Brand MD, Brown GC, Hafner RP (1990). A 'top-down' approach to the determination of control coefficients in metabolic control theory. *Eur J Biochem* 188(2):121-5.
- Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 79: 537–543 (2).
- Burns SP, Murphy HC, Iles RA, Bailey RA, Cohen RD (2000). Hepatic intralobular mapping of fructose metabolism in the rat liver. *Biochem J* 349: 539–545.

- Busserolles J, Gueux E, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y (2003). High fructose feeding of magnesium deficient rats is associated with increased plasma triglyceride concentration and increased oxidative stress. *Magnesium Res* 16: 7–12.
- Busserolles J, Gueux E, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y (2002). Substituting honey for refined carbohydrates protects rats from hypertriglyceridemic and prooxidative effects of fructose. *J Nutr* 132: 3379–3382.
- 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 Endocrinol Metab.* 295(5):E1269-76.
- Cairns CB, Walther J, Harken AH, Banerjee A (1998). Mitochondrial oxidative phosphorylation efficiencies reflect physiological organ roles. *Am. J. Physiol.* 274, R1376- R1383.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761–1772.
- Cartwright MJ, Tchkonja T, Kirkland JL (2007). Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp Gerontol.* 42(6):463–471.
- Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DM, Schenka AA, Latuf-Filho P, Vassallo J, Dias JC, Kubota LT, Carvalheira JB, Saad MJ (2012). Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia.* 55(10):2823-34.
- Chanseume E, Tardy AL, Salles J, Giraudet C, Rousset P, Tissandier A, Boirie Y, Morio B (2007). Chronological approach of diet-induced alterations in muscle mitochondrial functions in rats. *Obesity* 15, 50–59.
- Chong MF, Fielding BA, Frayn KN (2007). Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr* 85:1511–1520.

- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 46(11):2347–2355.
- Coen PM, Goodpaster BH (2012). Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends Endocrinol Metab* 23, 391–398.
- Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM (1999). Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA* 282: 1659–1664.
- Costford SR, Chaudhry SN, Crawford SA, Salkhordeh M, Harper ME (2008). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1018-E1024.
- Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, Iossa S (2014b). The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *Eur. J. Nutr* 54(2):183-92.
- Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Liverini G, Iossa S (2014a). Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial responses to short-term high-fat feeding in rat skeletal muscle. *Nutrition* 30, 75–81.
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Mazzoli A, Valiante S, Liverini G, Iossa S (2013). Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced obesity. *Eur. J. Nutr* 53(2):413-9.
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, Iossa S (2013). Increased skeletal muscle mitochondrial efficiency in rats with fructose-induced alteration in glucose tolerance. *Br.J.Nutr.* 110(11), 1996–2003.
- 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, Falcone I, Coppola P, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S (2012). Mitochondrial energetics in liver and skeletal muscle after energy restriction in young rats. *Br. J.Nutr.* 108, 665-665.
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Prisco M, Liverini G, Iossa S (2008). Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity* 16(5):958-964.
- Delbosc S, Paizanis E, Magous R, Araiz C, Dimo T, Cristol JP, Cros G, Azay J (2005). Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179(1):43–49.
- Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C (2008). Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 582: 68–73.
- Di Girolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R (1998). Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* 274:R1460–R1467.
- Donmoyer CM, Ejiofor J, Lacy DB, Chen SS, McGuinness OP (2001). Fructose augments infection-impaired net hepatic glucose uptake during TPN administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E703–E711.
- Elia M, Livesey G (1988). Theory and validity of indirect calorimetry during net lipid synthesis. *Am J Clin Nutr* 47:591-607.
- Faeh D, Minehira K, Schwarz J, Periasami R, Seongus P, Tappy L (2005). Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy males. *Diabetes* 54: 1907–1913.
- Fernandes MA, Custódio JB, Santos MS, Moreno AJ, Vicente JA (2006). Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat liver mitochondria from oxidative stress. *Mitochondrion* 6:176-185.

- Flohè L, Otting F (1984). Superoxide dismutase assay. *Meth. Enzymol.* 105, 93-104.
- Flowers MT, Ntambi JM (2008). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 19:248-256.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957). *J Biol Chem.* 226: 497-510.
- Fridovich I (1995). Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Ann Rev Biochem* 64:97-112.
- Garcia-Roves P, Huss JM, Han DH, Hancock CR, Iglesias-Gutierrez E, Chen M, Holloszy JO (2007). Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10709–10713.
- Gardner PR (2002). Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Meth Enzymol* 349:9-16.
- Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE (2001). Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(12):5755-61.
- Gordon S (1995). The macrophage. *Bioessays.* 17(11):977–986.
- Grimble RF (2002). Inflammatory status and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:551–559.
- Gundersen HJG (2002). *Journal of Microscopy.* 207, 191-210.
- Hallfrisch J, Ellwood KC, Michaelis O, Reiser S, O’Dorisio TM, Prather ES (1983). Effects of dietary fructose on plasma glucose and hormone responses in normal and hyperinsulinemic men. *J Nutr* 113: 1819–1826.
- Hamilton MT, Hamilton DG, Zderic TW (2007). Role of low Energy expenditure and sitting in obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 56, 2655–2667.

- Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, Holloszy JO (2008). High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7815–7820.
- Harper ME, Green K, Brand MD (2008). The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Ann Rev Nutr* 28:13-33.
- Holloszy JO (2009). *Am J Clin Nutr* 89:463S-466S.
- Hommes FA (1993). Inborn errors of fructose metabolism. *Am J Clin Nutr* 58: 788S–795S.
- Hoppeler H, Fluck M (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 95–104.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259(5091):87–91.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES (2006). Reactive oxygen species have a casual role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944–948.
- Hudgins LC, Hellerstein MK, Seidman CE, Neese RA, Tremaroli JD, Hirsch J (2000). Relationship between carbohydrate-induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects. *J Lipid Res* 41: 595–604.
- Ibrahim MM (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11:11–18.
- Iynedjian PB (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *BMJ* 293: 1–13.
- Jacob R, Gilligan D, Robinson M, Harmer C (1999). Hyper-fractionated radiotherapy for soft tissue sarcoma: results of the second study of hyper-fractionated radiotherapy. *Sarcoma.* 3(34):157-65.
- Jensen MD, Sarr MG, Dumesic DA, Southorn PA, Levine JA (2003). Regional uptake of meal fatty acids in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1282–E1288.

- Johannsen DL, Ravussin E (2009). The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol* 9(6):780-786.
- Karagiannides I, Thomou T, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Kypreos KE, Cartwright A, Dalagiorgou G, Lash TL, Farmer SR, Timchenko NA, Kirkland JL (2006). Increased CUG triplet repeat-binding protein-1 predisposes to impaired adipogenesis with aging. *J Biol Chem*. 281(32):23025–23033.
- Karlsson HK, Ahlsén M, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H, Koistinen HA (2006). *Diabetes* 55:1283-1288.
- Kelley DE (2002). Action for health in diabetes: the look AHEAD clinical trial. *Curr Diab Rep*.2(3):207-9.
- Kelley DE, Mandarino LJ (2000). Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*. 49(5):677-83.
- Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Kawanaka K, Holloszy JO (1999). Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276: R665–R672.
- Koo HY, Wallig MA, Chung BH, Nara TY, Cho BH, Nakamura MT (2008). Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1782: 341–348.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997). High proton potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416, 15-18.
- Koutsari C, Ali AH, Mundi MS, Jensen MD (2011). Storage of circulating free fatty acid in adipose tissue of postabsorptive humans: quantitative measures and implications for body fat distribution. *Diabetes*. 60(8):2032-40.
- Kovacs EMR, Westerterp-Plantenga MS (2006). Effect of (-)-hydroxycitrate on net fat synthesis as de novo lipogenesis. *Physiol Behav* 88:435-447.

- Krebs M, Roden M (2004). *Curr Med Chem* 11:901-908.
- Laurent D, Didier L, Yerby B, Yerby B, Deacon R, Gao J (2007). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1169-E1177.
- Lê KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, Boesch C, Tappy L (2009). Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 89(6):1760-5.
- Lê KA, Tappy L (2006). Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 9(4):469-75.
- Lee MJ, Wu Y, Fried SK (2013). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* 34(1):1-11.
- Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz , Lustig RH (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7(5):251-264.
- Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, D'Andrea E, Ferraro M, Bianco F, Liverini G, Iossa S (2007). Skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial dysfunction in high fat fed rats exhibiting impaired glucose homeostasis. *Int J Obes* 31:1596-1604.
- Liu J, Grundy SM, Wang W, Smith SC Jr, Vega GL, Wu Z, Zeng Z, Wang W, Zhao D (2006). Ethnic-specific criteria for the metabolic syndrome: evidence from China. *Diabetes Care* 29: 1411-1416.
- Livesey G, Taylor R (2008). Fructose consumption and consequences for glycation, plasma triacylglycerol, and body weight: meta-analyses and meta-regression models of intervention studies. *Am J Clin Nutr* 88: 1419–1437.
- Lonnqvist F, Nordfors L, Jansson M, Thorne A, Schalling M, Arner P (1997). Leptin secretion from adipose tissue in women: relationship to plasma levels and gene expression. *Journal of Clinical Investigation* 99 2398-2404.

- Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR (2007). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 56(1):16–23.
- Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renstrom F, Ruge T, Eriksson JW (2007). Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and ‘hyperleptinaemia’. *Diabetologia* 50:625–633.
- Marques BG, Hausman DB, Martin RJ (1998). Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol*. 275(6 pt 2):R1898–R1908.
- Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, Cury-Boaventura MF, Silveira LR, Curi R, Hirabara SR (2012). Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis* 11:30–41.
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Tomita S, Sekiya M, Hasty A, Nakagawa Y, Sone H, Toyoshima H, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N (2004). Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin treated mice. *Diabetes* 53: 560–569.
- Mayes PA (1993). *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 754S-765S (1).
- McGarry LJ, Thompson D, Millham FH, Cowell L, Snyder PJ, Lenderking WR, Weinstein MC (2002). Outcomes and costs of acute treatment of traumatic brain injury. *J Trauma*. 53(6):1152-9.
- Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A, Bernard C, Rajas F, Zitoun C (2005). Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab* 2: 321–329.

- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*. 115(5):629-40.
- Nedergaard J (1983). The Relationship between Extramitochondrial Ca^{2+} Concentration, Respiratory Rate, and Membrane Potential in Mitochondria from Brown Adipose Tissue of the Rat. *Eur J Biochem* 133:185-191.
- Neschen S, Katterle Y, Richter J, Augustin R, Scherneck S, Mirhashemi F, Schürmann A, Joost HG, Klaus S (2008). *Physiol Genomics* 33:333-340.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S (2008). In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest*. 118(2):710–721.
- Pagel-Langenickel I, Bao J, Pang L, Sack MN (2010). The role of mitochondria in the pathophysiology of skeletal muscle insulin resistance. *Endocr Rev* 31, 25–51.
- Pajvani UB, Trujillo ME, Combs TP, Iyengar P, Jelicks L, Roth KA, Kitsis RN, Scherer PE (2005). Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: a new mouse model of inducible and reversible lipodystrophy. *Nat Med*. 11(7):797–803.
- Parks EJ, Skokan LE, Timlin MT, Dingfelder CS (2008). Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *J Nutr* 138: 1039–1046.
- Parks EJ, Hellerstein MK (2000). Carbohydrate-induced hypertriglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms. *Am J Clin Nutr* 71: 412–433.
- Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ (2003). *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8466-8471.

- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N.Engl. J.Med.* 350, 664–671.
- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300, 1140–1142.
- Rabøl R, Højberg PM, Almdal T, Boushel R, Haugaard SB, Madsbad S, Dela F (2009). *J Clin Endocrinol Metab* 94:1372-1378.
- Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G (1999). The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117: 132–139.
- Rial E, Rodríguez-Sánchez L, Gallardo-Vara E, Zaragoza P, Moyano E, González-Barroso MM (2010). Lipotoxicity, fatty acid uncoupling and mitochondrial carrier function. *Biochim Biophys Acta.* 1797(6-7):800-6.
- Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell.* 135(2):240–249.
- Roehrig KL, Allred JB (1974). Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal Biochem* 58:414-421.
- Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC (2007). Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 45: 778–788.
- Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P (1981). The "metabolically-obese", normal-weight individual. *Am J Clin Nutr.* 34(8):1617–1621.
- Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Hesselink MK, Jeneson JA, Backes WH, van Echteld CJ, van Engelshoven JMA, Mensink M, Schrauwen P (2007). Impaired in vivo mitochondrial

function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. *Diabetologia* 50, 113–120.

- Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Hesselink MK, Moonen-Kornips E, Schaart G, Mustard KJ, Hardie DG, Saris WH, Nicolay K, Schrauwen P (2005). *Obes Res* 13:2088-2094.
- Schrauwen P, Mensink M, Schaart G, Moonen-Kornips E, Sels JP, Blaak EE, Russell AP, Hesselink MK (2006). *J Clin Endocrinol Metab* 91:1520-1525.
- Shulman GI, *J Clin Invest* (2000); 106: 171-176 (1).
- Shulman GI (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171–176 (2).
- Soria A, D’Alessandro MA, Lombardo YB (2001). Duration of feeding on a sucrose rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J Appl Physiol* 91:2109–2116.
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 453(7196):783–787.
- Spangenberg EM, Augustsson H, Dahlborn K, Essén-Gustavsson B, Cvek K (2005). Housing-related activity in rats: effects on body weight, urinary corticosterone levels, muscle properties and performance. *Lab. Anim.* 39, 45–57.
- Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 119: 1322–1334.
- Stanhope KL, Griffen SC, Bair BR, Swarbrick MM, Keim NL, Havel PJ (2008). Twenty-four-hour endocrine and metabolic profiles following consumption of high-fructose corn syrup-, sucrose-, fructose-, and glucose-sweetened beverages with meals. *Am J Clin Nutr* 87: 1194–1203.

- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 121(6):2094-101.
- Sun K, Scherer PE (2010). *Adipose Tissue Dysfunction: A Multistep Process.* Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 67–75.
- Swarbrick MM, Stanhope KL, Elliott SS, Graham JL, Krauss RM, Christiansen MP, Griffen SC, Keim NL, Havel PJ (2008). Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women. *Br J Nutr* 100: 947–952.
- Szendroedi J, Schmid AI, Chmelik M, Toth C, Brehm A, Krssak M, Nowotny P, Wolzt M, Waldhausl W, Roden M (2007). Muscle mitochondrial ATP synthesis and glucose transport/phosphorylation in Type 2 diabetes. *PLoS Med.* 4:e154.
- Tappy L, Lê KA (2010). Metabolic effect of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 90:23-46.
- Tappy L, Randin JP, Felber JP, Chioloro R, Simonson DC, Jequier E, DeFronzo RA (1986). Comparison of thermogenic effect of fructose and glucose in normal humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 250: E718–E724.
- Tchkonina T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Karagiannides I, Forse RA, Koo A, Stevenson M, Chinnappan D, Cartwright A, Jensen MD, Kirkland JL (2005). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(1):E267-77.
- Teff KL, Grudziak J, Townsend RR, Dunn TN, Grant RW, Adams SH, Keim NL, Cummings BP, Stanhope KL, Havel PJ (2009). Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1562–1569.

- Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Konigsrainer A, Maier KP, Bischoff SC, Bergheim I (2008). Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr* 138: 1452–1455.
- Tornheim K, Lowenstein JM (1976). Control of phosphofructokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP, and citrate. *J Biol Chem* 251: 7322–7328.
- Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS, Cooney GJ (2007). Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* 56, 2085–2092.
- Unger RH, Scherer PE (2010). Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends Endocrinol Metab.* 21(6):345–352.
- Unger RH (2005). Longevity, lipotoxicity and leptin: the adipocyte defense against feasting and famine. *Biochimie.* 87(1):57–64.
- Unger RH (2003). Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 144: 5159–5165.
- van de Woestijne PC, Mokhles MM, de Jong PL, Witsenburg M, Takkenberg JJ, Bogers AJ (2011). Right ventricular outflow tract reconstruction with an allograft conduit in patients after tetralogy of Fallot correction: long-term follow-up. *Ann Thorac Surg* 92(1):161-6.
- Velho G, Petersen KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME, Cline GW, Froguel P, Shulman GI (1996). Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest* 98: 1755–1761.
- Wang T, Si Y, Shirihai OS, Si H, Schultz V, Corkey RF, Hu L, Deeney JT, Guo W, Corkey BE (2010). Respiration in adipocytes is inhibited by reactive oxygen species. *Obesity* 18:1493–1502.

- Wang Y, Sullivan S, Trujillo M, Lee M.J, Schneider SH, Brodin RE, Kang YH, Werber Y, Greenberg AS, Fried SK (2003). Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender, and depot. *Obes. Res.* 11, 930–936.
- Woods HF, Alberti KG (1972). Dangers of intravenous fructose. *Lancet* 2: 1354–1357.
- Wronska A, Kmiec Z (2012). Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol* 205:194–208.

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- Abdul-Ghani MA, Matsuda M, DeFronzo RA (2008). Strong association between insulin resistance in liver and skeletal muscle in non-diabetic subjects. *Diabet Med* 25(11):1289-94.
- Barr HG, Mc Cracken KJ (1984). *Brit J Nutr* 51: 379-387.
- Brand MD, Brown GC, Hafner RP (1990). A 'top-down' approach to the determination of control coefficients in metabolic control theory. *Eur J Biochem* 188(2):121-5.
- 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 Endocrinol Metab.* 295(5):E1269-76.
- Cairns CB, Walther J, Harken AH, Banerjee A (1998). Mitochondrial oxidative phosphorylation efficiencies reflect physiological organ roles. *Am. J. Physiol.* 274, R1376- R1383.
- Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, Iossa S (2014b). The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *Eur. J. Nutr* 54(2):183-92.
- Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Liverini G, Iossa S (2014a). Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial responses to short-term high-fat feeding in rat skeletal muscle. *Nutrition* 30, 75–81.
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Mazzoli A, Valiante S, Liverini G, Iossa S (2013). Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced obesity. *Eur. J. Nutr* 53(2):413-9.
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, Iossa S (2013). Increased skeletal muscle mitochondrial efficiency in rats with fructose-induced alteration in glucose tolerance. *Br.J.Nutr.* 110(11), 1996–2003.

- 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, Falcone I, Coppola P, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S (2012). Mitochondrial energetics in liver and skeletal muscle after energy restriction in young rats. *Br. J.Nutr.* 108, 665-665.
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Prisco M, Liverini G, Iossa S (2008). Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity* 16(5):958-964.
- Elia M, Livesey G (1988). Theory and validity of indirect calorimetry during net lipid synthesis. *Am J Clin Nutr* 47:591-607.
- Fernandes MA, Custódio JB, Santos MS, Moreno AJ, Vicente JA (2006). Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat liver mitochondria from oxidative stress. *Mitochondrion* 6:176-185.
- Flohè L, Otting F (1984). Superoxide dismutase assay. *Meth. Enzymol.* 105, 93-104.
- Flowers MT, Ntambi JM (2008). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 19:248-256.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. *J Biol Chem* (1957); 226: 497-510.
- Fridovich I (1995). Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Ann Rev Biochem* 64:97-112.
- Gardner PR (2002). Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Meth Enzymol* 349:9-16.
- Gundersen HJG (2002). *Journal of Microscopy.* 207, 191-210.
- Kovacs EMR, Westerterp-Plantenga MS (2006). Effect of (-)-hydroxycitrate on net fat synthesis as de novo lipogenesis. *Physiol Behav* 88:435-447.

- Lee MJ, Wu Y, Fried SK (2013). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* 34(1):1-11.
- Nedergaard J (1983). The Relationship between Extramitochondrial Ca^{2+} Concentration, Respiratory Rate, and Membrane Potential in Mitochondria from Brown Adipose Tissue of the Rat. *Eur J Biochem* 133:185-191.
- Roehrig KL, Allred JB (1974). Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal Biochem* 58:414-421.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 121(6):2094-101.
- Tappy L, Lê KA (2010). Metabolic effect of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 90:23-46.
- Wang T, Si Y, Shirihai OS, Si H, Schultz V, Corkey RF, Hu L, Deeney JT, Guo W, Corkey BE (2010). Respiration in adipocytes is inhibited by reactive oxygen species. *Obesity* 18:1493–1502.