

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE

XXX CICLO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOLOGIA

**“Dalle fluttuazioni del peso corporeo ai disordini metabolici:  
ruolo della componente lipidica della dieta”**

**“From body weight fluctuations to metabolic disorders: the role  
of the lipid component of the diet”**

Coordinatore  
Ch.mo Prof.  
Salvatore Cozzolino

Candidata  
Dott.ssa  
Rosa Cancelliere

Tutor  
Ch.ma Prof.ssa  
Susanna Iossa

# *Indice*

<i>Summary of thesis</i>	<i>I</i>
<i>Riassunto della tesi</i>	<i>VI</i>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<i>Capitolo 1. Restrizione e rialimentazione</i>	<b>5</b>
1.1 Fluttuazioni del peso corporeo	5
1.2 Variazioni della spesa energetica durante la restrizione calorica	6
1.3 Fluttuazioni del peso corporeo e ripristino delle riserve di grasso	8
1.4 Il ruolo della termogenesi nel recupero del peso corporeo	10
1.5 Impatto della restrizione-rialimentazione sulla sensibilità all'insulina	12
1.6 Significato biologico del metabolismo risparmiatore	14
<i>Capitolo 2. Quantità e qualità dei lipidi nelle diete</i>	<b>15</b>
2.1 Dalle fluttuazioni del peso corporeo ai lipidi nella dieta	15
2.2 I Lipidi	16
2.3 Classificazione	17
2.4 Acidi grassi saturi ed insaturi	18
2.5 Gli acidi grassi essenziali	19
2.6 Effetti dei differenti acidi grassi sull'organismo	21
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>26</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>32</b>
❖ Primo disegno sperimentale	33
❖ Secondo disegno sperimentale	34

❖ Misura della composizione corporea	38
❖ Misura del contenuto energetico della carcassa	38
❖ Misura del contenuto lipidico, proteico e di acqua della carcassa	38
❖ Misura del bilancio energetico	39
❖ Calorimetria indiretta	41
❖ Determinazione dei livelli plasmatici di glucosio, insulina e calcolo dell'indice HOMA	42
❖ Profilo lipidico plasmatico	43
❖ Quantificazione dell'enzima ALT	43
❖ Misura dei livelli plasmatici di perossidazione lipidica	43
❖ Preparazione dell'omogenato di fegato ed isolamento dei mitocondri	45
❖ Preparazione dell'omogenato di muscolo scheletrico ed isolamento dei mitocondri	45
❖ Determinazione del contenuto proteico mitocondriale	46
❖ Attività respiratoria di omogenato e mitocondri isolati dal fegato e muscolo scheletrico	47
❖ Misura della conduttanza protonica basale e indotta dei mitocondri epatici	48
❖ Composizione del fegato e del muscolo scheletrico	50
❖ Determinazione del contenuto di acqua epatica	50
❖ Determinazione dell'attività dell'aconitasi nei mitocondri epatici e del muscolo scheletrico	51
❖ Determinazione dell'attività della superossido dismutasi nei mitocondri epatici e del muscolo scheletrico	52
❖ Misura della perossidazione lipidica in omogenato e in mitocondri isolati da fegato e muscolo scheletrico	53

❖ Attività della FAS in fegato, e-WAT ed i-BAT	53
❖ Concentrazione di TNF- $\alpha$ nel fegato	54
❖ Attività della mieloperossidasi epatica	55
❖ Quantificazione dell'UCP-1 nell'i-BAT	55
❖ Analisi statistiche	57
<b><i>RISULTATI</i></b>	<b>58</b>
<b><i>DISCUSSIONE</i></b>	<b>99</b>
<b><i>CONCLUSIONI</i></b>	<b>111</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA CITATA</i></b>	<b>113</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA CONSULTATA</i></b>	<b>127</b>

## *Summary of thesis*

Obesity is the result of genetic, behavioral, environmental, physiological, social and cultural factors that result in energy imbalance and promote excessive fat deposition. In particular, in Western society, which is characterized by sedentary lifestyles combined with excess energy intake, many people often try to lose weight with caloric restriction. However it is well known that the weight regain after caloric restriction results in accelerated storage of adipose tissue (De Andrade et al. 2015). The high efficiency of the recovery of the energy depots of body fat probably evolved in ancient times, when the food availability was intermittent and it was necessary to face up to long periods of famine. Nowadays, this efficiency is the key factor causing higher body fat gain relative to lean tissue, and the preferential catch-up fat phenomenon has also been linked to the hyperinsulinemic state of catch-up growth and the associated risks for later development of metabolic syndrome (Crescenzo et al. 2003; Dulloo et al.2006). Several studies on refeeding after caloric restriction have been conducted on laboratory rats, a very good model for obesity studies, because energy intake, diet composition and the level of physical activity can be easily monitored, and also, considering the standard housing conditions, laboratory rats exhibit a sedentary behavior, similarly to what happens in humans (Aydin et al. 2014; Buettner et al. 2007; Spangenberg et al. 2005): it was observed that during the refeeding with low fat diet the rats showed a reduction in energy expenditure and an increase in metabolic efficiency, causing high body fat deposition, even in absence of hyperphagia (Dulloo et al. 2008). In addition it has been shown that this high metabolic efficiency that drives catch-up fat on a low fat diet is exacerbated by refeeding

on HFD (Crescenzo et al. 2003; Dulloo & Gerardier, 1992), although in different ways depending on the type of fat included in the diet (Dulloo et al. 2005). In this thesis, I assessed whether changing the type of fat, in the context of a high fat dietary regimen, could differently affect whole body homeostasis. For this reason I investigated the effect of two kind of HFD, rich in lard or safflower/linseed oil. I used two different experimental designs. In the first one, rats were divided in two groups with the same mean body weight and were pair fed with 380 kJ metabolisable energy (ME)/day (corresponding to the spontaneous energy intake of the same rats, as assessed in the days before the experiment) with a lard-based (SFA-MUFA, mainly monounsaturated and saturated fatty acids) or safflower-linseed based (PUFA, polyunsaturated fatty acids of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 series) diets for 2 weeks. The two HFDs contained 58.2% energy from fat, 21.1% energy from protein and 20.7% energy from carbohydrate. During the treatments, body weight, food, and water intake were monitored daily. Faces and urine were collected daily and the respective energy content assessed with a bomb calorimeter. The day before the sacrifice, 24-h  $VO_2$  and  $VCO_2$  of the rats were recorded with a four-chamber indirect open-circuit calorimeter (Panlab S.r.l., Cornella, Spain). Measurements were performed for the whole 24 h-period every 15 min for 3 min in each cage. Urine was collected for the whole (24-h) period and urinary nitrogen levels were measured by an enzymatic colorimetric method (FAR S.r.l., Settimo di Pescantina, Italy). Daily energy expenditure and substrate oxidation rates were calculated for the whole 24-h period from  $VO_2$ ,  $VCO_2$ , and urinary nitrogen according to Even et al. The day before the euthanasia, rats were fasted for 6 h and small blood samples were taken from the tail vein, placed in EDTA coated tubes and transferred on ice. Plasma glucose concentration was measured by colorimetric enzymatic method (Pokler Italia, Italy), while plasma insulin concentration was measured using an ELISA kit (Merckodia

AB, Sweden). Basal postabsorptive values of plasma glucose and insulin were used to calculate Homeostatic Model Assessment (HOMA) index as  $[\text{Glucose (mg/dL)} \times \text{Insulin (mU/L)}]/405$ . After the treatment, body composition and energy balance were measured. Plasma concentrations of triglycerides, cholesterol, non esterified fatty acids (NEFA), alanine aminotransferase (ALT) and lipid peroxidation were measured. Liver composition and oxidation, as well as respiratory capacity, oxidative status of liver mitochondria were measured. Quantification of uncoupling protein (UCP-1) in interscapular brown adipose tissue (IBAT) was performed. In the second experimental design, rats were food restricted for 14 days at approximately 50% of spontaneous intake. At the end of the semistarvation period, all the rats were separated into 3 groups (n = 8): one group was immediately euthanized by decapitation to calculate the body composition of restricted rats, while the other two groups were refed isocaloric amounts of two different HFDs (58.2% by energy), rich in lard or safflower/linseed oil. The amount of dietary energy provided to the refed animals corresponds to the metabolisable energy intake of spontaneously growing (non-restricted) weight-matched control animals fed on chow diet, as previously reported (Crescenzo et al., 2003). Furthermore, the level of fat in the HFDs utilized here (i.e., 58% of energy intake) corresponds to dietary fat levels often utilized in rehabilitation (energy-dense) diets of malnourished infants and children in order to meet their high energy requirements for catch-up growth (Prentice and Paul, 2000). In this second design, I performed the same measurement of the first one, but I also investigated the regulation of the pathway of de novo lipogenesis in liver, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). I also evaluated liver and muscle composition, mitochondrial activity, as well as parameters of oxidative stress and inflammation, since both these tissues are major contributors to daily metabolic rate (Rolfe & Brown, 1997) and it has

been proposed that skeletal muscle is involved in the suppression of thermogenesis that underlines the high metabolic efficiency for accelerated body fat recovery after caloric restriction (Dulloo, 2005; Crescenzo et al. 2006). The results of the first experimental design suggest that, at the end of the treatment, the percent of body lipid doubled both in SFA-MUFA and in PUFA rats, although the final value was significantly lower in PUFA than in SFA-MUFA rats; conversely the percentage of body protein was maintained constant in PUFA rats, while it significantly decreased in SFA-MUFA rats. The percent of body epididymal and visceral WAT increased, reaching a final value that was significantly lower in PUFA rats than in SFA-MUFA rats. The percent of body IBAT was significantly higher in PUFA than in SFA-MUFA rats and its content of UCP-1 was markedly increased in PUFA rats compared to SFA-MUFA rats. PUFA rats exhibit lower lipid gain but higher protein gain compared to SFA-MUFA rats. The analysis of fuel oxidation showed that PUFA rats had reduced protein oxidation but higher lipid oxidation compared to SFA-MUFA rats. Plasma metabolic characterisation evidenced higher alanine aminotransferase activity in PUFA rats compared to SFA-MUFA rats. Livers from PUFA rats showed higher degree of steatosis and had higher lipid content, triglycerides and cholesterol, as well as higher lipid peroxidation, compared to SFA-MUFA rats. Liver mitochondria from PUFA rats displayed a significant decrease in basal and fatty acid-induced proton leak compared to SFA-MUFA rats. Both NAD, FAD and lipid-linked maximal oxidative capacities were significantly higher in isolated liver mitochondria from rats PUFA compared to SFA-MUFA rats. Evaluation of oxidative status showed that lipid peroxidation was significantly higher in mitochondria from PUFA rats compared to SFA-MUFA rats. The results of the second experimental design suggest that rats refed the PUFA-enriched diet had lower body lipids and higher body proteins compared to rats refed

the SFA-MUFA-enriched diet, as well as lower amount of visceral and epididymal WAT, but higher amount of IBAT. Rats refed PUFA diet gained significantly less lipids and more proteins. At the end of the 2 weeks refeeding period, rats refed PUFA diet exhibited higher NPRQ values and non-protein energy utilisation was fulfilled by using proportionally more carbohydrates and less fat compared to rats refed SFA-MUFA diet, lower HOMA index and plasma insulin levels in the fasting and the fed state, together with lower plasma triglycerides and cholesterol levels. Plasma lipid peroxidation was not significantly different between the two groups of rats, while a significant decrease in ALT was found in rat refed PUFA diet. FAS activity, the rate-limiting enzyme in the pathway of de novo lipogenesis, was found to be significantly higher in liver, e-WAT and IBAT in rat refed PUFA diet. In the liver, higher triglyceride content was found in rat refed PUFA diet, but hepatic lipid peroxidation was significantly lower. SOD activity was found to be significantly higher in liver mitochondria of rat refed PUFA diet while no difference was found in skeletal muscle mitochondria. Lower degree of hepatic inflammation and unchanged hepatic content of the proinflammatory mediator TNF- $\alpha$  was found in rat refed PUFA diet. Expression of the UCP-1 protein in BAT was found significantly increased in rat refed PUFA diet. In conclusion, in this thesis I provide evidence that not only the amount, but also the type of dietary fat, is a primary obesogenic factor. In particular, when considering the composition of high fat diets for nutritional rehabilitation, the inclusion of PUFA could be useful for improving protein deposition and maintaining glucose homeostasis, while limiting lipid storage in adipose tissue and oxidative stress and inflammation in the liver.

## ***Riassunto della tesi***

L'obesità è il risultato della combinazione di fattori genetici, comportamentali, ambientali, fisiologici, sociali e culturali che provocano uno squilibrio energetico e promuovono una deposizione eccessiva di grassi. In questo contesto, nella società occidentale, caratterizzata da uno stile di vita di tipo sedentario a cui si associa l'assunzione di quantità eccessive di energia, molte persone spesso cercano di perdere peso con la restrizione calorica. Tuttavia, tale terapia sembra essere fallimentare. Infatti, da numerosi studi è stato dimostrato che, dopo un periodo di dimagrimento, la successiva rialimentazione, predispone ad un recupero del peso corporeo caratterizzato da un guadagno di grasso più veloce rispetto a quello proteico. (De Andrade et al. 2015). Tale fenomeno è stato sicuramente vantaggioso per la sopravvivenza in uno stile di vita ancestrale, dove il cibo non era sempre disponibile ed era necessario prepararsi a lunghi periodi di carestia. Oggigiorno, tuttavia, questo rappresenta un fattore che contribuisce alla ricaduta verso l'obesità dopo dimagrimento terapeutico e ad un eccessivo accumulo di grasso durante il recupero della crescita ed è stato collegato ad uno stato iperinsulinemico e allo sviluppo successivo della sindrome metabolica. (Crescenzo et al. 2003; Dulloo et al. 2006). Molti studi sperimentali sono stati condotti utilizzando il ratto come modello animale, poiché nell'uomo, gli studi sull'obesità sono difficili da eseguire, se si vogliono considerare tutti i parametri che non possono essere misurati in maniera diretta. Inoltre, i ratti da laboratorio, per le loro condizioni di stabulazione, rappresentano un ottimo modello di studio poiché rispecchiano le caratteristiche tipiche dell'uomo occidentale, esibendo un comportamento di tipo sedentario. Inoltre, l'assunzione di energia, la composizione della dieta e il livello di attività fisica possono essere facilmente monitorati. (Aydin et al. 2014; Buettner et al. 2007; Spangenberg et al. 2005). È stato osservato che, con una rialimentazione a basso

contenuto di grassi, i ratti manifestano una riduzione della spesa energetica ed un incremento dell'efficienza metabolica che causano un elevato livello di deposizione di grasso corporeo, anche in assenza di iperfagia, (Dulloo et al. 2008), ma questo recupero preferenziale di grasso è sicuramente esacerbato quando la rialimentazione è condotta con cibi ad elevata densità energetica (Crescenzo et al. 2003; Dulloo & Gerardier, 1992), anche se in modi diversi a seconda del tipo di grasso incluso nella dieta (Dulloo et al. 2005). In questa tesi ho valutato se il cambiamento del tipo di grasso, nel contesto di un regime dietetico ad alto contenuto di grassi, possa influire in modo diverso sull'omeostasi dell'intero organismo. In particolare, ho utilizzato due distinti disegni sperimentali. Nel primo ho valutato gli effetti del cambiamento dei lipidi introdotti con l'alimentazione, utilizzando due diete iperlipidiche ed isocaloriche, che differivano solo per l'aspetto qualitativo dei grassi introdotti, mentre quello quantitativo era lo stesso, in modo da evidenziare quelli che potevano essere gli effetti apportati sull'organismo. Con quest'approccio ho potuto anche valutare se l'utilizzo di acidi grassi polinsaturi, in una dieta ad elevato contenuto lipidico, potesse attenuare gli effetti deleteri che si verificano a carico dell'organismo in toto quando ci si alimenta con cibi ricchi in grasso. Nel secondo disegno sperimentale, ho utilizzato le due stesse diete, ma in questo caso applicando un protocollo basato su un ciclo di restrizione-rialimentazione, per valutare se gli acidi grassi polinsaturi potessero favorire un recupero del peso corporeo quanto più salutare possibile, contrastando la tenenza al ripristino delle riserve di grasso piuttosto che di quelle proteiche, fenomeno di fondamentale importanza nella riabilitazione nutrizionale. In particolare, nel primo disegno sperimentale, i ratti sono stati alimentati per due settimane con quantità isocaloriche di due diete ad elevato contenuto lipidico (*pair fed* 380 kJ di energia metabolizzabile/giorno), composte rispettivamente da strutto (SFA-MUFA) e olio di cartamo/olio di semi di lino 2:1 (PUFA). Il contributo in percentuale dei singoli

macronutrienti al contenuto calorico delle due diete è del 58.2% di energia derivante dai grassi, del 21.1% derivante dalle proteine e del 20.7% proveniente dai carboidrati. 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, mediante l'utilizzo della bomba calorimetrica. Inoltre, sono stati misurati su un periodo di 24 h la produzione di anidride carbonica ( $VCO_2$ ), il consumo di ossigeno ( $VO_2$ ), il quoziente respiratorio (RQ) e il quoziente respiratorio non proteico (NPRQ) utilizzando un sistema di monitoraggio (srl Panlab, Cornella, Barcellona, Spagna), costituito da un calorimetro indiretto a circuito aperto composto da quattro camere. (FAR S.r.l., Settimo di Pescantina, Italy). Le misure sono state 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. In più, il giorno precedente l'eutanasia, sono state prelevate aliquote di sangue dalla coda dopo 6h dall'assunzione di cibo per la determinazione dei livelli plasmatici di insulina e glucosio, in modo da poter ricavare l'indice HOMA, indicativo dello stato di resistenza all'insulina, secondo la formula  $[Glucose (mg/dL) \times Insulin (mU/L)]/405$ . Alla fine del periodo sperimentale, sono stati valutati la composizione corporea ed il bilancio dell'energia. In più, aliquote di sangue sono state prelevate al fine di valutare il profilo lipidico e i parametri infiammatori plasmatici, nonché l'attività dell'enzima Alanina aminotransferasi (ALT). Il fegato è stato subito prelevato per la determinazione della composizione epatica in acqua e lipidi e per svolgere tutti i successivi dosaggi biochimici. Inoltre sono stati prelevati anche il BAT, il WAT epididimale e quello viscerale (e-WAT, v-WAT), anche in questo caso per eseguire in seguito le analisi previste. Il secondo disegno sperimentale è stato progettato al fine di individuare una strategia nutrizionale atta a garantire un recupero di peso salutare,

soprattutto nella riabilitazione nutrizionale, che segue un periodo di iponutrizione, dove si rende indispensabile l'utilizzo di diete iperlipidiche. In particolare, i ratti sono stati sottoposti a due settimane di restrizione calorica, riducendo del 50% il loro introito di cibo, rispetto a quello che avrebbero introdotto spontaneamente. È stato precedentemente dimostrato che tale riduzione dell'introito calorico induce l'arresto della crescita e il marcato depauperamento dei depositi di grasso corporeo (Crescenzo et al. 2003). Va sottolineato che il quantitativo dei grassi utilizzati nelle due diete, circa il 58%, corrisponde a quello che spesso è utilizzato nella riabilitazione nutrizionale di bambini o adolescenti che hanno subito un drastico e non salutare calo ponderale, al fine di garantire loro un apporto energetico ottimale che gli permetta il recupero del peso corporeo (Prentice and Paul, 2000). Visti i risultati positivi ottenuti nel primo disegno sperimentale, soprattutto per quanto concerne il bilancio energetico, ho ritenuto opportuno ripetere le medesime analisi condotte, ampliando tuttavia i risultati e conducendo ulteriori indagini anche sul muscolo scheletrico, poiché è stato proposto che il muscolo scheletrico sia coinvolto nella soppressione della termogenesi che sottolinea l'alta efficienza metabolica per il recupero accelerato del grasso corporeo dopo la restrizione calorica (Dulloo, 2005, Crescenzo et al. 2006). I risultati ottenuti dal primo disegno sperimentale indicano che al termine delle due settimane di trattamento con diete isocaloriche iperlipidiche, lo sviluppo dell'obesità è evidente in entrambi i gruppi di ratti. In particolare, la percentuale di lipidi corporei si è duplicata rispetto al valore iniziale, pur se il valore finale è risultato significativamente inferiore nei ratti PUFA in confronto ai ratti SFA-MUFA. Inoltre, la percentuale di WAT epididimale è aumentata nel corso del trattamento dietetico, raggiungendo un valore finale che è minore nel gruppo PUFA rispetto a quello SFA-MUFA. La percentuale di I-BAT risulta significativamente maggiore nei ratti PUFA in confronto ai ratti SFA-MUFA ed il contenuto di UCP-1 è aumentato nei ratti PUFA

rispetto ai ratti SFA-MUFA. Infine la percentuale di proteine corporee che si è mantenuta costante durante le due settimane di trattamento nei ratti PUFA, ha subito un significativo decremento nei ratti SFA-MUFA. In particolare, la diminuzione della massa magra riscontrata nel gruppo SFA-MUFA è indicativa di una perdita di massa corporea metabolicamente attiva, che, con il tempo, potrebbe portare all'istaurarsi di meccanismi di risparmio energetico, concorrendo allo sviluppo dell'obesità. Dall'analisi delle componenti del bilancio energetico emerge che a parità di energia metabolizzabile introdotta, la spesa energetica è maggiore nei ratti PUFA rispetto ai ratti SFA-MUFA, anche se tale differenza non è significativa. Inoltre, nei ratti PUFA il guadagno lipidico è significativamente inferiore, come anche il quantitativo di tessuto adiposo viscerale, mentre il guadagno proteico è significativamente maggiore rispetto ai ratti SFA-MUFA. Tutti questi dati indicano un minor effetto obesogeno della dieta PUFA rispetto a quella SFA-MUFA. L'analisi dell'ossidazione dei substrati indica che mentre nei ratti PUFA questa corrisponde alla composizione dei macronutrienti della dieta, in particolare l'ossidazione dei lipidi coincide con quelli introdotti, nei ratti SFA-MUFA la situazione è differente, cioè l'ossidazione dei substrati non corrisponde a quella dei macronutrienti introdotti, ma si verifica una riduzione dell'ossidazione dei lipidi mentre è aumentata quella delle proteine. La caratterizzazione metabolica plasmatica ha evidenziato una maggiore attività dell'ALT nei ratti PUFA rispetto ai ratti di SFA-MUFA. I fegati dei ratti PUFA hanno mostrato un maggior grado di steatosi e hanno livelli più elevati di lipidi, trigliceridi e colesterolo, nonché un maggior grado di perossidazione dei lipidi rispetto ai ratti SFA-MUFA. I mitocondri del fegato dai ratti PUFA hanno mostrato una significativa diminuzione della conduttanza protonica sia basale che di quella indotta dagli acidi grassi rispetto ai ratti SFA-MUFA. La capacità ossidativa mitocondriale è risultata significativamente più elevata nei mitocondri fegati isolati dai ratti PUFA rispetto ai ratti

SFA-MUFA sia in presenza di substrati NAD, che FAD dipendenti che lipidici. La valutazione dello stato ossidativo ha mostrato che la perossidazione dei lipidi era significativamente maggiore nei mitocondri dei ratti PUFA rispetto ai ratti SFA-MUFA.

I risultati relativi al secondo disegno sperimentale suggeriscono che i ratti rialimentati con la dieta iperlipidica ricca in PUFA mostrano minori livelli di lipidi corporei mentre le proteine sono significativamente superiori rispetto ai ratti SFA-MUFA. Inoltre mostrano anche livelli inferiori di WAT viscerale e epididimale, ma una quantità maggiore di IBAT, rispetto ai ratti SFA-MUFA. Alla fine delle 2 settimane di restrizione, la stima dei nutrienti ossidati ha dimostrato che, rispetto ai ratti rialimentati con una dieta ricca in SFA-MUFA, i ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA per il proprio sostentamento energetico, fanno un utilizzo maggiore di lipidi ed uno inferiore di proteine, come era accaduto nel primo disegno sperimentale, ma, diversamente dal primo gruppo fanno un utilizzo elevato anche di carboidrati. Inoltre, l'analisi della calorimetria indiretta ha rilevato delle differenze nell'ossidazione dei substrati tra i 2 gruppi di ratti. In particolare, i risultati mostrano che i ratti alimentati con la dieta ricca in PUFA manifestano valori di NPRQ più elevati rispetto a quelli alimentati con una dieta ricca in SFA-MUFA, nonostante i valori di RQ siano paragonabili. Dunque, per produrre energia, i primi ossidano più carboidrati e meno grassi. La perossidazione dei lipidi nel plasma non ha mostrato significative differenze tra i due gruppi di ratti, mentre una significativa diminuzione dell'ALT è stata riscontrata nel gruppo PUFA rispetto al gruppo SFA-MUFA. L'attività della FAS, il maggiore enzima coinvolto nel pathway metabolico della lipogenesi de novo, è risultata significativamente più elevata nel fegato, e-WAT e IBAT dei ratti PUFA rispetto ai ratti SFA-MUFA. Nel fegato, il contenuto di trigliceridi è stato riscontrato più elevato nei PUFA, ma la perossidazione lipidica è significativamente più bassa. Inoltre, non vi è alcuna differenza significativa, relativa sia al danno ai lipidi che alle proteine, sia nei ratti

PUFA che nei ratti SFA-MUFA, e ciò in entrambe le popolazioni mitocondriali prese in esame. Di contro, l'attività della SOD è significativamente maggiore nel fegato dei ratti PUFA rispetto ai ratti SFA-MUFA, mentre non è stato possibile riscontrare differenze significative nel muscolo scheletrico. Il grado di infiammazione epatica indica che l'attività della MPO è significativamente più bassa nei ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA rispetto a quelli rialimentati con una ricca in SFA-MUFA, mentre non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nel contenuto epatico di TNF- $\alpha$ . In conclusione, in questo lavoro ho dimostrato che, non solo la quantità, ma anche il tipo di grassi presenti nella dieta rappresentano un fattore obesogenico primario. Gli acidi grassi insaturi limitano lo sviluppo della massa grassa e preservano la massa magra, sia in un contesto di normale alimentazione sia in seguito ad un protocollo di restrizione-rialimentazione. Invece, il minore danno epatico riscontrato nella rialimentazione, sembrerebbe suggerire che, a differenza del normale regime dietetico, nella riabilitazione nutrizionale sia possibile utilizzare diete iperlipidiche ricche in acidi grassi insaturi senza incorrere in disturbi epatici, almeno in tempi brevi. Al contrario, nelle normali condizioni iperlipidiche, l'introduzione degli acidi grassi insaturi non è consigliabile, dati i deleteri effetti sul fegato. Pertanto posso concludere che, quando si prende in considerazione la composizione di diete ad alto contenuto di grassi per la riabilitazione nutrizionale, prediligere i PUFA, potrebbe aiutare a migliorare ad aumentare la deposizione di proteine e contemporaneamente mantenere l'omeostasi del glucosio, limitando così l'accumulo dei lipidi nel tessuto adiposo.

Questo studio potrà contribuire a chiarire come i meccanismi che regolano il rapido deposito di lipidi, durante il recupero di peso, possano conferire una maggiore sensibilità allo sviluppo di obesità e disturbi metabolici cronici, fattori di grande importanza clinica, poiché un recupero di peso salutare rappresenta un fondamentale tassello, necessario a

ridurre l'insorgenza di patologie, soprattutto in bambini ed adolescenti, preservando anche la salute del futuro adulto.

# *Introduzione*

## *Premessa*

L'obesità è considerata da sempre una delle cause principali dell'elevata incidenza di malattie e mortalità nei paesi occidentali ed è in costante incremento non solo tra gli adulti ma anche tra i bambini. Le conseguenze metaboliche che ad essa sono strettamente associate annoverano severe patologie, quali: resistenza all'insulina, stato infiammatorio di basso grado, profilo lipidico alterato, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari (Blaak 2005). Tuttavia, nonostante essa sia considerata un disturbo metabolico multifattoriale, i principali fattori che ne determinano l'insorgenza sono collegabili alla composizione della dieta, alla quantità di calorie assunte ed al livello di attività fisica. In particolare poi, l'ambiente socio-culturale che non favorisce l'attività fisica ed incoraggia cattive abitudini alimentari è senza dubbio di importanza fondamentale nella patogenesi di questo disturbo. Di pari passo all'incremento dell'obesità, numerosi sono stati i tentativi atti a contrastarne la rapida diffusione, visti i danni che essa comporta per la salute umana. Uno degli approcci che attualmente è molto utilizzato, con il fine di limitarne lo sviluppo e indurre il dimagrimento, è quello della restrizione calorica, normalmente denominato dieta dimagrante. Tuttavia, tale terapia sembra essere fallimentare.

Infatti, da numerosi studi epidemiologici è stato dimostrato che, dopo un periodo di dimagrimento, la successiva rialimentazione effettuata, in modo particolare, con cibi ad elevata densità energetica, predispone ad un recupero del peso corporeo caratterizzato da un guadagno di grasso più veloce rispetto a quello proteico. Questo fenomeno di recupero preferenziale di grasso persiste anche in assenza di iperfagia e durante rialimentazione con una dieta equilibrata, suggerendo che la maggiore efficienza per la deposizione di grasso sia una reazione fisiologica fondamentale alla perdita di peso o al ritardo della crescita.

Tale elevata efficienza nel recupero delle riserve energetiche di grasso corporeo è stata probabilmente vantaggiosa per la sopravvivenza in uno stile di vita ancestrale, dove il cibo

non era sempre disponibile ed era necessario prepararsi a lunghi periodi di carestia. Oggigiorno, tuttavia, questo rappresenta un fattore che contribuisce alla ricaduta verso l'obesità dopo dimagrimento terapeutico e ad un eccessivo accumulo di grasso durante il recupero della crescita. Tale fenomeno, che si verifica in risposta alla restrizione, è attualmente considerato uno dei parametri che contribuisce maggiormente ad incrementare i fattori di rischio per le malattie, comportando dunque un danno per il mantenimento di uno stato di buona salute. Infatti, molti dati sperimentali indicano che bambini che alla nascita manifestano un peso corporeo inferiore a quello ritenuto normale o che durante l'infanzia e la fanciullezza manifestano periodi di ritardo della crescita o si sono sottoposti a cicli di dimagrimento seguiti da recupero del peso, sono maggiormente predisposti ad obesità e malattie ad essa associate, tra le quali diabete di tipo 2 e disturbi cardiovascolari (Dulloo et al. 2002). Il legame che intercorre tra recupero di peso e rischio di patologie croniche non è del tutto noto.

Numerose ricerche riportano che il recupero del peso corporeo si innesca anche quando la rialimentazione è effettuata con diete a basso contenuto lipidico, inducendo una riduzione della spesa energetica e un aumento dell'efficienza metabolica, che rappresentano la causa primaria dell'elevata deposizione di grasso corporeo. Tuttavia, questo fenomeno è sicuramente esacerbato quando la rialimentazione è effettuata con diete ad alto contenuto di grassi, pur se in diversa misura a seconda della composizione degli stessi nella dieta (Crescenzo et al. 2012). A conferma di ciò vi sono numerosi studi riportati in letteratura, dai quali è emerso che l'effetto diabetogenico ed obesogenico di una dieta ad elevato contenuto di grassi potrebbe essere diverso e dipendente non solo dalla quantità ma anche dalla qualità dei grassi introdotti (Bray et al. 2002; Buettner et al. 2006; Hariri et al. 2010; Krishnan and Cooper 2014).

A tal proposito, è stato osservato che una rialimentazione con una dieta ad elevato contenuto di lipidi ricchi in acidi grassi saturi e monoinsaturi, ma a basso contenuto di acidi grassi polinsaturi, va ad aggravare ulteriormente il fenomeno del recupero di grasso a livello corporeo.

## ***Capitolo 1. Restrizione e rialimentazione***

### ***1.1 Fluttuazioni del peso corporeo***

È ampiamente noto che tra i disordini metabolici che affliggono la società moderna vi sono obesità, diabete di tipo 2 ed ipertensione. Tuttavia, non sono gli unici determinati che vanno a ledere lo stato di buona salute, ma a questi si possono sicuramente aggiungere le oscillazioni del peso corporeo a cui l'uomo è sottoposto durante l'arco della vita.

Molta è la letteratura a favore dell'ipotesi secondo la quale le fluttuazioni del peso corporeo siano un fattore importante nell'incrementare l'incidenza di patologie croniche, e riguarda studi effettuati sia su adulti che su bambini. Ad esempio, neonati ipoponderali, ma anche bambini ed adolescenti che presentano una crescita ridotta che viene successivamente ripristinata, risultano in età avanzata molto più inclini ad incorrere in problemi quali obesità centrale, intolleranza al glucosio, diabete, ipertensione e disturbi cardiovascolari (Eriksson et al. 1999; Cianfarani et al. 1999; Huxley et al. 2000; Ong et al. 2000; Levy-Marchal et al. 2000; Barker et al. 2005). Inoltre, il fenomeno del recupero preferenziale di grasso è comune in numerose situazioni di grandi variazioni del peso corporeo, non solo nei grandi obesi ma anche in uomini e donne che durante la loro vita hanno affrontato un ciclo di perdita e recupero di peso.

La ripresa della crescita, quindi, sebbene porti benefici a breve termine, può a lungo andare, comportare problemi. Il meccanismo alla base di tale fenomeno non è del tutto chiaro, tuttavia sembra che ci siano innumerevoli evidenze sperimentali che suggeriscono che la ripresa della crescita possa essere dovuta a iperfagia compensatoria, com'è stato evidenziato da diversi studi condotti sui bambini (Ounsted and Sleight, 1975), e che questa iperfagia sia connessa, sia nei bambini che negli adulti, alla necessità di ripristinare le riserve energetiche perse durante la restrizione, soprattutto quelle relative alla massa grassa

(Dulloo et al. 1997; Webster 1993). Comunque il fenomeno del preferenziale recupero di grasso è stato dimostrato anche in assenza di iperfagia (Dulloo et al. 1996; Dulloo et al. 2002 ). Tutto ciò, sommato al fatto che questo persiste anche quando la rialimentazione è effettuata con diete ben bilanciate, spesso con cibi a bassa densità energetica, e indipendentemente dal livello energetico di proteine, minerali e vitamine, sottolinea che l'aumento dell'efficienza metabolica strettamente finalizzato alla deposizione di grasso sia un processo fisiologico che opera con il fine di accelerare il recupero di lipidi dopo un ritardo della crescita o una perdita di peso.

### ***1.2 Variazioni della spesa energetica durante la restrizione calorica***

Da studi epidemiologici è stato dimostrato che, durante la riabilitazione nutrizionale o anche in seguito a rialimentazione che segue un periodo di restrizione calorica, il recupero del peso corporeo è caratterizzato da un ripristino delle riserve energetiche di grasso corporeo che superano in velocità quelle proteiche. I primi ad evidenziare il verificarsi nei bambini di questo fenomeno, sono stati Widdowson e Shaw (1973) nei loro studi condotti nel 1960 sui bambini malnutriti della Jamaica. Questi autori notarono che quando bambini ricoverati per marasma o kwashiorkor riprendevano la normale crescita, raggiungendo il peso previsto per la loro altezza, la composizione corporea era caratterizzata dal 25-37% di grasso, con un valore medio di circa il 30% di massa grassa, parametro di gran lunga superiore a quello trovato da Garrow e collaboratori in bambini ben nutriti appartenenti allo stesso range di età (Garrow et al. 1965).

Molti altri lavori hanno confermato tali dati, indicando che nei neonati e nei bambini malnutriti il guadagno di peso corporeo è essenzialmente dovuto a incremento di grasso, mentre il ripristino della massa magra risulta rallentato (Benefice et al. 2001; Graham et

al. 1969; Castilla-Serna et al. 1996; McLean and Graham, 1980; Jackson 1984; Martins et al. 2004).

Questo stesso fenomeno si verifica anche nel corso di un comune programma di dimagrimento in cui l'organismo risponde ad una diminuzione dell'introito calorico con un meccanismo omeostatico di riduzione delle spesa energetica. Dunque, si adatta alla nuova condizione modificando la sua efficienza metabolica, con l'intento di risparmiare energia attraverso una diminuzione del metabolismo basale, della spesa di energetica e del turnover proteico. A cosa serve ciò? A minimizzare le variazioni del peso corporeo. Questo meccanismo ha avuto un significato da un punto di vista evolutivo, in quanto si presupponeva che, qualora ci fosse carenza di energia in ingresso, ciò denotava mancanza di cibo nell'ambiente esterno, e questo permetteva all'organismo di assicurarsi la sopravvivenza. Quello che si verifica è che una volta perso il peso iniziale, si assiste ad un arresto, ed il peso non può esser perso ulteriormente. Si innesca dunque un nuovo stato stazionario, che potrebbe anche essere una condizione desiderabile in un programma di dimagrimento, perché caratterizzato da un peso corporeo inferiore a quello di partenza. Tuttavia, il problema è che questo nuovo stato stazionario viene mantenuto con un introito calorico inferiore a quello iniziale. Nel momento in cui cessa l'intervento dietetico e si entra nella fase di mantenimento, i fabbisogni energetici rimangono ancora bassi e la dieta risulterà ipercalorica. Il risultato sarà o il recupero del peso o, addirittura il superamento di quello da cui si era partiti. Si innesca la famosa sindrome yo – yo del peso corporeo, che caratterizza la maggior parte della popolazione dei paesi industrializzati e che è, essa stessa, indipendentemente da tutta una serie di altri parametri, connessa con l'aumento del rischio metabolico.

Da ciò ne consegue che la restrizione è la successiva rialimentazione, sono processi molto delicati da affrontare e possono predisporre a tutta una serie di patologie sconfinanti nella ben nota sindrome metabolica.

### ***1.3 Fluttuazioni del peso corporeo e ripristino delle riserve di grasso***

Il fenomeno del preferenziale accumulo di grasso, dovuto alla sproporzionata velocità di recupero di massa grassa rispetto a quella magra, fu evidenziato già all'inizio del ventesimo secolo anche in adulti che avevano recuperato il peso dopo periodi di carestie o malattie (Debray et al. 1946; Keys et al. 1950; Jamin and Muller, 1903). In particolare Debray e i suoi collaboratori (Debray et al. 1946) notarono che l'aumento di peso dei prigionieri trasferiti dai campi di concentramento tedeschi in ospedali a Parigi in condizione di estremo digiuno, era maggiormente dovuto al più rapido accumulo di grasso rispetto al recupero del tessuto muscolare. Inoltre, Keys e i suoi collaboratori studiarono gli effetti del semidigiuno prolungato e della successiva rialimentazione in obiettori di coscienza durante la guerra. Essi notarono che nella fase di rialimentazione, quando il grasso corporeo era recuperato al 100 %, il ripristino della massa magra era ancora al 40% (Keys et al. 1950). In più, questo recupero totale della massa grassa aveva comportato un guadagno di grasso superiore al 75% rispetto a quello valutato prima delle restrizione ( Keys et al. 1950; Dulloo et al. 1997). Una conferma a tale risultato è stata data circa 50 anni dopo da Weyer (Weyer et al. 2000) nel suo studio di follow-up su uomini e donne che per 2 anni erano stati confinati in un minimondo, ecologico ed indipendente, prototipo dell'habitat planetario costruito in Arizona, definito Biosfera 2. Durante questi anni gli abitanti si sottoposero ad una modesta restrizione calorica, perdendo circa il 15 % del loro peso corporeo iniziale. Tale peso è stato però ripristinato dopo 6 mesi dall'uscita dal minimondo.

Da questi studi è emerso che il peso riconquistato era quasi esclusivamente rappresentato da un aumento del grasso corporeo. Negli ultimi decenni, questo fenomeno del preferenziale recupero di grasso è stato anche evidenziato in studi relativi all'effetto della rialimentazione in patologie quali anoressia e disordini metabolici.

Tutti questi studi, sommati, indicano che il fenomeno risulta essere indipendente dall'obesità, dall'iperfagia e dall'utilizzo di diete bilanciate (poichè permane anche qualora l'apporto di nutrienti rispecchi quello ottimale), e ciò suggerisce che nell'organismo si verifichi un fenomeno capace di innescare la riduzione della termogenesi durante la perdita di peso, probabilmente dettato anche da segnali generati specificamente in risposta al consumo delle riserve di grasso. Questa riduzione adattativa, che persiste durante il recupero di peso, ha lo scopo di accelerare il ripristino delle riserve di grasso.

Un esperimento, condotto sull'uomo, che avvalorava l'esistenza di un sistema di controllo, che direttamente collega la deplezione dei depositi di grasso e la soppressione della termogenesi è il noto Esperimento Minnesota che utilizza un protocollo di semidigiuno e rialimentazione (Keys et al. 1950). Tale studio è stato condotto sottoponendo 32 uomini, in buono stato di salute, a 24 settimane di semidigiuno. Durante questo periodo ogni partecipante aveva perso circa il 25% del peso corporeo che aveva al tempo 0. A queste 24 settimane sono seguite 12 settimane di rialimentazione con una dieta povera in grassi (circa il 20 % dell'energia). Dall'analisi dei dati si è riscontrata una diretta connessione tra la variazione del grasso corporeo e il cambiamento nel metabolismo basale (BMR), un indice dell'alterata termogenesi calcolato tenendo conto della perdita della massa magra e massa grassa. In altre parole, maggiore è il grado di deplezione dei grassi nel periodo di digiuno, maggiore sarà la riduzione del BMR e quindi il grado di soppressione della termogenesi. Una relazione simile è stata anche trovata dopo un periodo 12 settimane di rialimentazione ristretta, cioè un quota più bassa di riserva dei grassi e una riduzione del

BMR di maggiore entità, e quindi una maggiore soppressione della termogenesi (Dulloo and Jacquet, 1998).

Ancora più forti sono i dati relativi agli studi animali, che utilizzano un protocollo di restrizione-rialimentazione. Se i ratti sottoposti a restrizione calorica vengono rialimentati con la stessa quantità di cibo dei controlli aventi lo stesso peso corporeo, la velocità di deposizione delle proteine risulta essere la stessa dei controlli, mentre quella dei grassi aumenta di circa 2 volte, come risultato di una spesa energetica più bassa del 10-15%, durante le prime due/tre settimane di rialimentazione isoenergetica (Dulloo and Girardier, 1990; Dulloo AG et al. 1993; Dulloo and Jacquet, 2001).

#### ***1.4 Il ruolo della termogenesi nel recupero del peso corporeo***

Mettendo assieme tutti i risultati provenienti dagli studi sopra citati, emerge che nel periodo di restrizione calorica si verifica una riduzione delle spesa energetica dovuta alla soppressione di una componente della termogenesi, la termogenesi adattativa, che consiste in un meccanismo che permette di produrre calore in risposta a diversi stress ambientali come freddo, iperalimentazione e infezioni. Questa termogenesi è direttamente controllata dal sistema nervoso simpatico (SNS) mediante il rilascio di noradrenalina e ormoni tiroidei ed è definita termogenesi non-specifica. Tuttavia, da studi effettuati sul modello animale, si è visto che ben presto, ed esattamente quando il grasso corporeo diminuisce almeno del 50% rispetto al suo valore iniziale, si innesca una seconda diminuzione della spesa energetica e tale diminuzione è dovuta alla termogenesi adiposo-specifica. Questa seconda diminuzione della spesa energetica sarà superiore rispetto alla prima. Successivamente, quando la restrizione calorica viene interrotta e si passa alla fase di rialimentazione, la termogenesi non specifica si riattiva immediatamente con lo scopo di produrre calore, permettendo in tal modo agli organi di rispondere velocemente agli stimoli stressogeni,

tuttavia rimane ancora soppressa la termogenesi adiposo-specifica. La soppressione di quest'ultima è più duratura e dipende direttamente dall'entità della deplezione delle riserve di grasso che si sono verificate durante la fase di restrizione calorica, permanendo fin quando le stesse non saranno ripristinate. L'organismo, pertanto, diventa più efficiente da un punto di vista metabolico, risparmiando energia, tutto con lo scopo ultimo di recuperare le riserve svuotate. Per comprendere la natura e la sede di questa componente, sono stati condotti studi sul modello animale. Da alcuni studi su ratti è inoltre emerso che, durante un protocollo sperimentale caratterizzato da un ciclo di restrizione e rialimentazione successiva, quando ratti rialimentati ed i controlli corrispettivi venivano iso-alimentati durante l'esposizione al freddo, fenomeno che induce uno stato di elevata attivazione simpatica della termogenesi, i rialimentati mostravano ancora la capacità di conservare energia per accumulare grasso (Dulloo et al. 1995 b). Ciò ha indotto gli autori a pensare che i meccanismi che regolano la componente adiposo-specifica della termogenesi non rispondano al controllo del SNS, come invece avviene per la componente adattativa non specifica. Pertanto, il fatto che durante il recupero di peso la soppressa termogenesi adiposo-specifica coesista con una stimolata termogenesi mediata dal simpatico, in risposta a stimoli quali freddo (Dulloo et al. 1995 b), iperfagia (Dulloo and Girardier, 1993a), diete povere di proteine (Dulloo and Girardier, 1992), suggerisce che questi due sistemi di controllo hanno siti effettori distinti. In particolare, il controllo della termogenesi adiposo-specifico risiede in siti diversi rispetto a quelli che sono sotto il controllo del SNS. Si è ipotizzato che nel momento in cui il tessuto adiposo diminuisce di una determinata entità, un segnale ancora non identificato, dal tessuto adiposo si trasferisce al muscolo scheletrico inducendo una diminuzione della termogenesi. Questo segnale permane per tutto il tempo in cui il tessuto adiposo è ridotto e cessa solo quando viene ripristinato e non ci sarà più una diminuzione della termogenesi nel muscoloso scheletrico. Trasferendo questi risultati

all'uomo possiamo dire che una fase di restrizione calorica induce una minore termogenesi a livello del muscolo scheletrico e ciò determina una diminuzione della spesa energetica perché il muscolo nella sua grande massa (30-40% del peso corporeo) contribuisce molto al metabolismo basale. In altre parole un periodo di restrizione dietetica fa diminuire il metabolismo basale inducendo una diminuzione della termogenesi nel muscolo scheletrico. Dunque il meccanismo alla base del controllo non specifico (SNS) della termogenesi opera in tessuti ed organi metabolicamente molto attivi (come il fegato, i reni, il cuore e il tessuto adiposo bruno) ed è rapidamente ristabilito in seguito ad una nuova disponibilità di cibo. Al contrario, il meccanismo alla base del controllo adiposo specifico della termogenesi sembrerebbe operare soprattutto nel muscolo scheletrico, un tessuto già conosciuto come importante sito per la conservazione dell'energia durante il digiuno (keys et al. 1950; Weyer et al. 2000; Foster et al.1995; Kulkarni and Shetty, 1992; Rosenbaum et al. 2003; Ma and Foster, 1986). Tale sistema potrebbe comprendere un sensore capace di indicare lo stato di deplezione o rallentata espansione dei depositi di grasso e un sistema effettore direttamente connesso al muscolo scheletrico (Dulloo and Jacquet, 2001).

### ***1.5 Impatto della restrizione-rialimentazione sulla sensibilità all'insulina***

Alcuni studi hanno evidenziato uno stato di iperinsulinemia, associato strettamente al meccanismo di restrizione-rialimentazione, per cui una domanda che molti autori si sono posti è: “Come una tale riduzione del metabolismo cellulare può portare ad iperinsulinemia?” (Cettour-Rose et al. 2005).

È noto che il muscolo scheletrico rappresenta il maggior sito per lo smaltimento di glucosio mediato dall'insulina, pertanto una riduzione della velocità metabolica di questo

porterebbe ad una riduzione nell'utilizzo del glucosio e quindi a iperinsulinemia (Dulloo 2005).

Inoltre, in letteratura è riportato uno stretto coinvolgimento del muscolo scheletrico sia nel fenomeno di recupero di grasso corporeo, in seguito a rialimentazione dopo restrizione calorica, e sia nella correlata insorgenza di insulino-resistenza. Studi condotti nel ratto, infatti, mostrano che gli animali rialimentati, dopo un periodo di restrizione calorica, presentano una diminuzione nella massa e una ridotta capacità ossidativa dei mitocondri subsarcolemmatici, una delle due popolazioni presenti nel muscolo scheletrico, (Crescenzo et al. 2006). Considerando l'importante ruolo che tale popolazione mitocondriale svolge nel supporto bioenergetico della trasduzione del segnale e del trasporto dei substrati, e quindi anche nel segnale insulinico, è possibile che la carenza di questi mitocondri possa contribuire all'insorgenza dell'insulino-resistenza ed essere correlata al fisiopatologico recupero di grasso, che si verifica durante il recupero della crescita nel corso di fluttuazioni del peso corporeo. Questo fenomeno andrebbe ad aggiungersi a quello sopra citato, ed assieme potrebbero comportare che il glucosio risparmiato sia veicolato verso la lipogenesi de novo nel tessuto adiposo, con il fine ultimo di andare a ripristinare le riserve di grasso che si sono svuotate durante la restrizione. La conferma a queste ipotesi deriva da studi condotti sul modello animale dove si evince che la rialimentazione effettuata con diete a basso contenuto di grassi provoca un marcato aumento dell'insulina plasmatica dopo un carico di glucosio (Crescenzo et al. 2003), e che l'utilizzo del glucosio stimolato dall'insulina negli animali rialimentati è più basso nel muscolo scheletrico, ma più alto nel tessuto adiposo (Cettour-Rose et al. 2005) risultati che inducono a pensare all'instaurarsi di uno stato di insulino-resistenza nel muscolo scheletrico e di ipersensibilità nel tessuto adiposo bianco. Inoltre, quando è stata analizzata l'attività dell'acido grasso sintetasi, il maggior enzima direttamente coinvolto nel pathway metabolico della lipogenesi de novo,

questa è stata riscontrata essere più alta nel tessuto adiposo degli animali rialimentati rispetto ai controlli, indicando una maggiore conversione del glucosio in lipidi, indirizzati ai depositi di grasso del tessuto adiposo (Cettour-Rose et al. 2005). Questi risultati, dunque, suggeriscono che la resistenza all'insulina nel muscolo e l'iper-responsività all'insulina nel tessuto adiposo, riscontrate negli animali rialimentati, non siano connesse a lipotossicità ma siano strettamente connesse alla soppressa termogenesi.

### ***1.6 Significato biologico del metabolismo risparmiatore***

Il metabolismo risparmiatore, che è alla base della soppressione della termogenesi adiposo-specifica, si è evoluto durante il corso della vita, probabilmente per la sopravvivenza in uno stile di vita ancestrale, dove il cibo non era sempre disponibile e molto spesso bisognava affrontare lunghi periodi di carestia. In questo contesto, avere un meccanismo che comportava la riduzione della spesa energetica e indirizzava buona parte dell'energia alla sintesi dei grassi, preservando in tal modo il corpo dal depauperamento, è stato sicuramente vantaggioso. Tuttavia, nel secolo attuale, dove il cibo è sempre disponibile e spesso caratterizzato da alimenti ad elevata densità energetica con l'attività fisica che è sempre meno praticata, il permanere di questo sistema rappresenta un fallimento dei meccanismi di perdita di peso, ed inoltre, predispone ad una maggiore incidenza di patologie, anche quando la perdita del peso corporeo è dovuta a problemi non strettamente associati alla terapia dimagrante, ma a ritardo nella crescita o anoressia nervosa e cachessia. Tutto questo induce chiaramente a pensare che un metabolismo troppo efficiente contribuisca, nella società moderna, ad incrementare l'insorgenza dell'obesità e di tutte le patologie ad essa strettamente associate.

## ***Capitolo 2. Quantità e qualità dei lipidi nella dieta***

### ***2.1 Dalle fluttuazioni del peso corporeo ai lipidi nella dieta***

Nella società moderna, spesso, si è inclini ad associare la perdita di peso e il fenomeno della restrizione calorica, comunemente conosciuto come dieta dimagrante, a una necessità puramente estetica, dove è opportuno apparire magri. Non è un caso che sempre più individui si affidino a cicli di dimagrimento. Tuttavia, spesso per diverse patologie molti uomini, bambini, adolescenti o anziani si trovano a dover affrontare un'importante perdita di peso. Attualmente vi è grande interesse verso la riabilitazione nutrizionale o semplicemente verso la corretta terapia nutrizionale da somministrare in seguito ad una dieta dimagrante. Tuttavia, gli studi relativi a questo campo risalgono già a molti anni fa. In questi studi, effettuati sull'uomo malnutrito e altri mammiferi, era emerso che il recupero del peso, che si verificava nella rialimentazione, risultava caratterizzato da un ripristino di gran lunga maggiore del grasso corporeo rispetto alla massa magra (Keys et al. 1950; Dulloo et al. 2002), indipendentemente dal livello di energia nutrizionale o integrazione proteica (Keys et al. 1950; Barac-Nieto et al. 1979; Jackson 1984), concetto che è stato più volte sottolineato anche in questa introduzione.

Questo fenomeno è stato dimostrato non solo durante il recupero del peso negli adulti soggetti a dimagrimento per povertà, malnutrizione legata a carestia (Keys et al. 1950; Dulloo et al. 2002; Barac-Nieto et al. 1979; Jackson et al. 1984), anoressia nervosa (Mitchell and Truswell, 1987) e cachessia correlata alla malattia (van Eys 1985; Streat et al. 1987; Kotler et al. 1990), ma anche durante la riabilitazione nutrizionale di bambini malnutriti (Ashworth et al. 1969; MacLean and Graham, 1980; Graham et al. 1996; Martins et al. 2004) e di giovani adolescenti in recupero dall'anoressia nervosa (Schmidt and Klein, 1997; Mika et al. 2004) o semplicemente nella fase di mantenimento che segue un programma di dimagrimento volontario.

Negli ultimi anni, inoltre c'è stato un grande interesse per questo fenomeno, poiché il recupero di grasso, soprattutto nei neonati e nei bambini ipoponderali, in primo luogo coincide con iperinsulinaemia ed inoltre perché la fase di recupero della crescita (Ong et al. 2000; Levy-Marchal et al. 2002; Soto et al. 2003; Jaquet et al. 2005; Ibanez et al. 2006) è considerata di centrale importanza nell'innescarsi di quei meccanismi che con il tempo predispongono all'obesità, al diabete di tipo 2 (Dulloo et al. 2006; Morrison et al. 2010; Meas, 2010). Nonostante ciò, durante l'arco della vita, per circostanze diverse, molto spesso non dipendenti dalla volontà del soggetto, si rende indispensabile recuperare il peso corporeo e effettuare la riabilitazione nutrizionale con cibi ad elevata densità energetica. Pertanto la ricerca è attualmente rivolta ad indagare e comprendere quale tipologia di lipidi possa avere un ridotto impatto sul recupero di grasso nella fase di rialimentazione dopo un periodo di iponutrizione, con il fine di contrastare quanto più possibile la tendenza all'aumento dell' adiposità corporea e l'insorgenza dell'insulino-resistenza. Infatti, comprendere i meccanismi molecolari tramite cui si modifica l'efficienza di deposizione della massa adiposa e proteica e la sensibilità all'insulina è utile per formulare strategie nutrizionali finalizzate ad un recupero di peso salutare. Tale area ha una grande importanza clinica, poiché il recupero di peso è un momento critico nel determinare la successiva suscettibilità alle malattie metaboliche croniche, ed inoltre esso dura diversi anni nell'uomo, esponendo quindi bambini e ragazzi a possibili insulti metabolici e cardiovascolari durante periodi critici di crescita e sviluppo.

## ***2.2 I lipidi***

È ormai noto che, quando ci si riferisce ai lipidi introdotti con l'alimentazione, non si è più attenti solo alla quantità dei grassi introdotti, ma piuttosto alla qualità di questi.

Molti studi hanno infatti confermato che i danni che una dieta ricca in acidi grassi può apportare all'organismo possono essere differenti e direttamente connessi alla qualità dei grassi piuttosto che alla sola quantità. Spesso si è soliti pensare agli acidi grassi come a un qualcosa di negativo per l'organismo, dato lo stretto legame tra lo stato di obesità, caratterizzato da un aumento del grasso corporeo e vari disordini metabolici. Inoltre, è accreditato che, tra tutti i macronutrienti, i lipidi sono quelli più ricchi in energia, poiché forniscono 9 kcal per grammo (circa il doppio se si pensa alla quota di energia fornita da carboidrati e proteine). Tuttavia, i loro elementi costitutivi risultano fondamentali per molte funzioni essenziali alla sopravvivenza, al di là dunque dell'apporto calorico.

Da ciò ne consegue che approfondire le conoscenze relative ai lipidi dell'alimentazione, soprattutto in termini di qualità piuttosto che della sola quantità, è attualmente di grande interesse sia da un punto di vista strettamente clinico ma anche da un punto di vista nutrizionale.

### ***2.3 Classificazione***

In generale, il termine lipide deriva dal greco (lipos = grasso). A questo gruppo appartengono un numero eterogeneo di sostanze con la caratteristica di essere insolubili in acqua, ma solubili in solventi organici come l'etere, il cloroformio ed il benzene e, di avere una densità significativamente minore di quella dell'acqua.

Strutturalmente i lipidi hanno gli stessi elementi dei carboidrati (C, H, O) da cui differiscono in maniera sostanziale per ciò che riguarda il legame tra gli atomi. In modo particolare il rapporto idrogeno/ossigeno nei lipidi supera considerevolmente quello presente nei carboidrati che è sempre pari a 2/1. I lipidi svolgono diversi ruoli biologici, tra cui, uno dei più importanti è quello di riserva energetica. Sono anche importanti costituenti delle membrane biologiche, a cui conferiscono la tipica fluidità e agiscono come

emulsionanti. A questa classe di composti biologici si annoverano anche alcune fondamentali vitamine (A, E, K), sostanze regolatrici dell'azione ormonale (prostaglandine) e molecole colorate e fotosensibili come i carotenoidi. Inoltre, l'assunzione lipidica deve essere ben curata, poiché alcuni di essi sono nutrienti essenziali, e come tali non possono essere sintetizzati a livello cellulare e quindi hanno bisogno di essere introdotti con l'alimentazione.

#### ***2.4 Acidi grassi saturi ed insaturi***

Tra i lipidi, di fondamentale importanza per l'organismo vi sono gli acidi grassi. Questa classe di composti è caratterizzata da catene idrocarboniose lineari costituite da un minimo di quattro atomi di carbonio ad un massimo di oltre venti, pur se prevalgono quelli a catene di sedici e diciotto atomi di carbonio. È possibile suddividere gli acidi grassi in saturi ed insaturi, in base al numero di doppi legami che li caratterizzano. In particolare, gli acidi grassi saturi (SFA) contengono solo singoli legami tra gli atomi di carbonio. È possibile ritrovarli soprattutto nei prodotti animali quali manzo, agnello, maiale, pollo, tuorlo d'uovo, prodotti caseari come panna, latte, burro e formaggio e sono ulteriormente suddivisibili in:

- ✓ Acidi grassi a catena corta, di cui sono un esempio, l'acido butirrico a 4 atomi di C e l'acido capronico a 6 atomi di C, principalmente presenti nel burro.
- ✓ Acidi grassi a media catena di cui sono un esempio, l'acido caprilico a 8 atomi di C e l'acido caprico a 10 atomi di C, principalmente presenti nei formaggi e nell'olio di cocco.
- ✓ Acidi grassi a lunga catena, di cui sono un esempio, l'acido laurico a 12 atomi di C, l'acido miristico a 14 atomi di C, l'acido palmitico a 16 atomi di C e l'acido

stearico a 18 atomi di C, principalmente presenti negli oli vegetali, nel latte e derivati, nella carne, nello strutto e nel lardo.

Gli acidi grassi insaturi contengono invece uno o più doppi legami lungo la catena principale del carbonio. È possibile ritrovarli soprattutto nei cibi di origine vegetale, quindi ad esempio gli oli vegetali.

In particolare, gli acidi insaturi sono ulteriormente suddivisibili in:

- ✓ Acidi grassi monoinsaturi (MUFA), con un solo doppio legame lungo la catena carboniosa. Tra questi si annovera l'acido oleico, che possiede 18 atomi di C e presenta il doppio legame in posizione 9. È presente nell'olio di oliva.
- ✓ Acidi grassi polinsaturi (PUFA), con due o più doppi legami lungo la catena carboniosa. Tra questi si annoverano l'acido linoleico, che possiede 18 atomi di C e presenta due doppi legami (18:2  $\Omega$ 6) e l'acido linolenico, che possiede 18 atomi di C ma tre doppi legami (18:3  $\Omega$ 3). Questi due acidi grassi sono presenti solo nei cibi di origine vegetale.

La saturazione comporta una maggiore densità, infatti, gli acidi grassi saturi sono in genere solidi mentre gli insaturi sono liquidi. Ne consegue che gli acidi saturi tendono maggiormente a depositarsi lungo i vasi sanguigni dando origine a placche ateromatose e causando seri problemi coronarici.

## ***2.5 Gli acidi grassi essenziali***

Tra gli acidi grassi insaturi, particolare attenzione va rivolta all'acido linoleico (omega-6) e all'alfa-linolenico (omega-3). Questi due acidi grassi sono definiti essenziali, poiché non possono essere prodotti dall'organismo che non possiede le desaturasi in grado di introdurre doppi legami rispettivamente in posizione 6 e 3. Ne deriva, dunque, che devono necessariamente essere introdotti con la dieta, visto anche che svolgono un ruolo

fondamentale per la crescita, per lo sviluppo e per il mantenimento di uno stato di buona salute. In effetti, per ottenere acido linoleico, è necessario l'inserimento di un doppio legame, a livello dell'acido oleico, tramite una desaturasi  $\Delta^{12}$ , che è espressa solamente nelle piante. Per questo le fonti da cui poterli ricavare sono di tipo vegetale. Analogamente, anche la desaturasi che permette la conversione dell'acido linoleico in linolenico, che è la desaturasi  $\Delta^{15}$ , è espressa solo nelle piante.

Questi due acidi grassi rappresentano i punti iniziali di tutta una serie di reazioni che attraverso l'intervento di ulteriori desaturasi ed elongasi, consentiranno di ricavare gli altri derivati acidi grassi polinsaturi a lunga catena, come l'acido arachidonico e il docosapentanoico, che sono a loro volta, precursori di prostaglandine e leucotrieni, dunque molecole funzionali e strutturali. Quindi si parte dall'acido linoleico con l'alimentazione, il quale sarà poi allungato per mezzo delle desaturasi  $\Delta^6$ ,  $\Delta^5$  e delle elongasi.

L'apporto di questi due acidi grassi essenziali deve essere finemente regolato. Esiste, infatti, una precisa indicazione circa il rapporto con cui questi devono essere introdotti ed il motivo è di tipo biochimico. In effetti, la  $\Delta^6$  desaturasi consente di allungare sia l'acido linoleico che il linolenico, quindi si va incontro a competizione di substrati, in quanto, a seconda della proporzione relativa tra i due acidi, si otterranno i prodotti finali.

Inoltre, la desaturasi predilige l'acido linolenico, da ciò si comprende che la loro introduzione non può essere la stessa, poiché si verrebbe a creare una condizione di vantaggio per una via piuttosto che per l'altra, e ciò comporterebbe carenza degli altri PUFA. Dunque, lo sbilanciamento di substrato viene colmato favorendo l'introito di  $\Omega 6$  rispetto a quello di  $\Omega 3$  in un rapporto che, secondo gli orientamenti nutrizionali deve essere di almeno 4:1.

## ***2.6 Effetto dei differenti acidi grassi sull'organismo***

È noto che l'obesità rappresenta un problema su larga scala ed è l'anticamera della comunemente nota sindrome metabolica. Tra i fattori che principalmente ne determinano l'insorgenza, vi è sicuramente l'accumulo di grasso corporeo, che deriva direttamente dal consumo di alimenti ad elevata densità energetica. La sede di elezione per il deposito del grasso in eccesso è da sempre il tessuto adiposo, tuttavia, quando l'introduzione supera la capacità dell'organo di "conservarlo" si innescano dei processi che alla fine comporteranno l'accumulo di grasso ectopico. Pertanto, gli effetti dell'obesità, già di per sé deleteri, si amplificano quando questo fenomeno si realizza soprattutto a carico di fegato, muscolo e sede viscerale. Visti gli effetti deleteri che essa apporta all'organismo, sempre più studi sono rivolti ad identificare le possibili "cure anti-obesità". Sicuramente di fondamentale importanza è stata la comprensione che non tutti gli acidi grassi sono uguali e che la qualità dei lipidi rappresenta un importante fattore da non sottovalutare. La questione se l'obesità e l'accumulo di grasso ectopico, in seguito all'introduzione di calorie in eccesso, fossero influenzate diversamente dalla dieta, è stato oggetto di interesse per più di 100 anni (Dulloo et al. 2012; Bray et al. 2012).

Molta è la letteratura che sostiene che un consumo eccessivo di acidi grassi saturi sia direttamente connesso con l'innescarsi di fenomeni quali ipercolesterolemia, formazione di placca ateromatosa con successiva aterosclerosi e problemi cardiovascolari ad essa annessi. (Caggiula and Mustad, 1997).

Inoltre, uno dei motivi per il quale l'apporto dei grassi saturi deve essere inferiore a quelli insaturi, risiede nelle differenze biochimiche che questi prodotti possiedono. In particolare, in questo contesto, risulta di fondamentale importanza il ruolo esplicato dal colesterolo la cui regolazione, in termini di concentrazione, è sotto il controllo dell'enzima

ACAT (acil-coenzima A colesterolo-transferasi), che è in grado di catalizzare la sintesi degli esteri del colesterolo a partire da quello libero.

Tale enzima possiede preferenza di substrato, prediligendo gli acidi grassi mono e polinsaturi. Da ciò ne deriva che, se alle cellule arriveranno LDL, che oltre a contenere colesterolo contengono molti acidi grassi saturi, il colesterolo verrà poco esterificato, rimanendo libero, e ciò creerà una regolazione negativa a livello genico, che porterà ad una down regulation della sintesi del recettore delle LDL, che quindi rimarranno in circolo. Viceversa, se arriveranno LDL più ricche di acidi grassi mono o polinsaturi, il colesterolo libero verrà esterificato, e non si esplicherà l'effetto di inibizione della trascrizione genica. Dunque, un elevato introito di grassi saturi, a sfavore di quelli mono e polinsaturi, risulta essere assolutamente negativo. Inoltre, non bisogna dimenticare che, numerosi studi, mirati a comprendere gli effetti di una dieta mediterranea sull'organismo, hanno messo in evidenza che un consumo di carboidrati, fibre, micronutrienti e un limitato contenuto di acidi grassi saturi, ma elevato di acidi grassi monoinsaturi, comporta dei benefici a livello della pressione sanguigna. In più, il consumo di grassi insaturi sembra ridurre il rischio di malattie cardiovascolari, motivo per il quale, è consigliabile non assumere più del 10% di grassi saturi con la dieta.

### *Studi sull'uomo*

Uno studio a favore dell'ipotesi che vede i PUFA migliori per la salute rispetto agli SFA è quello effettuato dal gruppo di Rosqvist (Rosqvist et al. 2014). L'esperimento era finalizzato a comprendere se la sovralimentazione effettuata con una dieta a base di PUFA avrebbe potuto ridurre la formazione di grasso ectopico rispetto ad una sovralimentazione condotta con una dieta ricca in SFA.

Per questo studio furono utilizzati 39 giovani uomini e donne in salute, ma molto magri. Il protocollo sperimentale prevedeva che i partecipanti per sette settimane si nutrissero con muffin arricchiti di SFA, sotto forma di olio di palma, oppure di PUFA, caratterizzato da olio di girasole. Le diete furono formulate per ottenere un aumento di peso del 3%.

I gruppi mangiavano una media di 3,1 muffin al giorno, equivalenti a 750 Kcal giornaliere extra, mentre il dispendio energetico giornaliero era di circa 2684 kcal, di cui circa 1040 kcal dovute ad attività fisica. Il risultato principale emerso dall'esperimento è stato che la dimensione e la distribuzione dei depositi di grasso variavano significativamente in risposta al tipo di grasso che era stato consumato. In particolare, il gruppo PUFA aveva guadagnato la stessa quantità di grasso e tessuto magro, ma quelli che si erano alimentati con la dieta SFA avevano depositato 4 volte più grasso rispetto alla massa magra. Inoltre, nel gruppo alimentato con la dieta SFA si era riscontrato anche un significativo incremento di grasso in sede viscerale, rispetto alla dieta PUFA. Al contrario, nel gruppo alimentato con la dieta PUFA si era verificato un incremento significativo della massa magra, rispetto alla dieta SFA. Tuttavia, la natura di questa "massa magra" risultava poco chiara, poiché i partecipanti non avevano cambiato il loro livello di attività fisica nel corso dello studio, probabilmente, dunque, si trattava di massa muscolare non attiva, o di proteine in altri tessuti.

### *Studi sul ratto*

Conferme dell'effetto benefico dei PUFA derivano anche da studi su animali. Tali studi hanno evidenziato che, dopo l'assorbimento intestinale, gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) producevano un effetto termogenico più elevato (Takeuchi et al. 1995) ed un consumo di ossigeno più alto (Shimomura et al. 1990) rispetto agli acidi grassi saturi. Comunque, quando i PUFA erano aggiunti ad una dieta ad alto contenuto di

MUFA (alto rapporto PUFA/SFA) per otto settimane, l'espressione e l'attività della lipasi ormone sensibile era regolata positivamente, ed il PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) del tessuto adiposo era ridotto se comparato alla dieta ad alto contenuto di MUFA, con un aumento significativo della lipogenesi epatica (Liao et al. 2010). Altri studi, che paragonano gli effetti dell'olio di cartamo (acidi grassi omega 6) con il sego di manzo (acidi grassi saturi) in ratti, hanno riportato che quest'ultimo gruppo aveva un contenuto in grassi nella carcassa più alto, una diminuita attività simpatica ed un effetto termogenico più basso (Matsuo et al. 2002).

L'aumentato consumo di PUFA omega-3 (DHA e EPA) da parte di ratti Wistar ha determinato una riduzione della quantità di tessuto adiposo viscerale, paragonato ad un gruppo alimentato con quantità maggiori di acidi grassi saturi (Rokling-Andersen et al. 2009).

I possibili meccanismi coinvolti nell'aumentata adiposità dovuta al consumo di acidi grassi saturi potrebbero essere:

- ✓ alterate affinità dei recettori  $\beta$ -adrenergici nel tessuto adiposo bruno, nel cuore e nel muscolo del soleo (Matsuo and Suzuki, 1994);
- ✓ minore attività della lipasi ormone sensibile (Awad and Zepp, 1979);
- ✓ una riduzione dell'attività simpatica nel tessuto adiposo bruno, cuore e muscolo scheletrico (Takeuchi et al. 1995);
- ✓ minore attività del complesso carnitina-palmitoil transferasi (CPT-1) e conseguentemente della  $\beta$ -ossidazione nel tessuto adiposo bruno (Takeuchi et al. 1996);
- ✓ aumentata espressione dei fattori trascrizionali come il PPAR $\gamma$  ed i geni coinvolti nell'adipogenesi (Wajchenberg, 2000).

Mentre gli acidi grassi saturi giocano un ruolo negativo sulla composizione corporea, gli acidi grassi insaturi sembrano avere l'effetto opposto attraverso i seguenti meccanismi:

- ✓ diminuzione dell'introito di energia e/o aumento della spesa energetica attraverso l'attivazione delle proteine disaccoppianti mitocondriali (Matsuo et al. 2002);
- ✓ ridotta captazione di lipidi da parte degli adipociti bianchi per la soppressione della lipasi lipoproteica (Siri-Tarino et al. 2010); aumentato catabolismo lipidico migliorando l'ossidazione degli acidi grassi ( $\beta$ -ossidazione) (Siri-Tarino PW et al. 2010);
- ✓ diminuita espressione dei fattori di trascrizione e dei geni coinvolti nel metabolismo del tessuto adiposo ( Liao et al. 2010).

Tutti questi studi, sommati, permettono di concludere che la dieta dovrebbe essere caratterizzata da un basso livello di cibi che contengono acidi grassi saturi, prediligendo invece quelli che contengono un giusto equilibrio di acidi grassi insaturi.

## *Scopo della tesi*

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha decretato che nel corso degli ultimi due decenni, sia i fattori ambientali che quelli comportamentali rappresentano i principali responsabili di un notevole aumento dell'obesità, una condizione patologica caratterizzata da uno squilibrio energetico e dalla deposizione dei grassi in eccesso (Racette et al. 2003). Nella società occidentale, dove lo stile di vita sedentario, spesso combinato ad un apporto energetico eccessivo, comporta un aumento dell'incidenza globale dell'obesità, molte persone tendono a perdere peso seguendo un regime alimentare ipocalorico.

Inoltre, l'eccessiva perdita di peso o il ritardo nella crescita, risultano essere comuni a molte patologie, che ancora oggi affliggono la società moderna, tra le quali, anoressia nervosa (Mitchell and Truswell, 1987), cancro, cachessia dovuta a malattia (van Eys, 1985; Streat et al. 1987; Kotler et al. 1990) e durante la riabilitazione nutrizionale dei bambini denutriti (Graham et al. 1969; Martins et al. 2004).

In ogni caso, qualunque sia il motivo alla base, di natura volontaria o connesso a patologie debilitanti, è risaputo che dopo la restrizione calorica, la successiva rialimentazione sarà caratterizzata da un recupero del peso corporeo dovuto ad un'accelerata deposizione di grasso nel tessuto adiposo (De Andrade et al. 2015), piuttosto che al guadagno proteico. Inoltre, sempre più ricerche hanno individuato nel meccanismo di recupero un ruolo cruciale nello sviluppo di obesità, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari, soprattutto in neonati nati sottopeso o bambini con peso corporeo inferiore al range di normalità e che riprendono più tardi la normale crescita (Dulloo et al. 2006; Morrison et al. 2010; Meas, 2010). Se da un lato il fenomeno del recupero del peso corporeo si innesca anche in condizioni di diete povere in grassi e senza che vi sia iperfagia, rappresentando un problema in un normale programma di dimagrimento, in cui ad una terapia dimagrante segue una dieta di mantenimento, dall'altro, questo stesso fenomeno risulta essere esacerbato quando la rialimentazione è effettuata con diete iperlipidiche. Da ciò ne

consegue che individuare uno o più approcci nutrizionali che siano ottimali per ridurre il fenomeno di recupero del grasso corporeo, prediligendo invece il ripristino della massa magra, sia di fondamentale importanza, soprattutto nella riabilitazione nutrizionale.

In particolare poi, comprendere quale tipologia di lipidi possa avere un ridotto impatto sul recupero di grasso nella fase di rialimentazione dopo un periodo di iponutrizione, contrastando quanto più possibile la tendenza all'aumento di adiposità corporea e l'insorgenza dell'insulino-resistenza, rappresenta sicuramente un utile tassello per formulare strategie nutrizionali finalizzate ad un recupero di peso salutare.

In questo contesto, molti studi hanno confermato che i potenziali effetti dannosi di un'alimentazione ad elevato contenuto lipidico possono variare in funzione della qualità dei grassi della dieta (Dulloo et al. 1995 a). Infatti diete iperlipidiche ricche in acidi grassi insaturi sono, per molti aspetti, considerate meno deleterie per la salute dell'uomo, quando confrontate con quelle ricche in acidi grassi saturi.

Viste queste premesse, perseguendo tale obiettivo, lo scopo del mio lavoro di dottorato è stato quello di analizzare gli effetti del cambiamento del tipo di grassi nella dieta, nel contesto di un regime dietetico iperlipidico, sull'omeostasi dell'intero organismo.

In particolare, ho utilizzato due distinti disegni sperimentali. Nel primo ho valutato gli effetti del cambiamento dei lipidi introdotti con l'alimentazione, utilizzando due diete iperlipidiche ed isocaloriche, che differivano solo per l'aspetto qualitativo dei grassi introdotti, mentre quello quantitativo era lo stesso, in modo da evidenziare quelli che potevano essere gli effetti apportati sull'organismo dalle due diete. Con quest'approccio ho potuto anche valutare se l'utilizzo di acidi grassi polinsaturi, in una dieta ad elevato contenuto lipidico, potesse attenuare gli effetti deleteri che si verificano a carico dell'organismo in toto quando ci si alimenta con cibi ricchi in grasso.

Nel secondo disegno sperimentale, ho utilizzato le due stesse diete, ma in questo caso applicando un protocollo basato su un ciclo di restrizione-rialimentazione, per valutare se gli acidi grassi polinsaturi potessero favorire un recupero del peso corporeo quanto più salutare possibile, contrastando la tenenza al ripristino delle riserve di grasso piuttosto che di quelle proteiche, fenomeno di fondamentale importanza nella riabilitazione nutrizionale. In entrambi i disegni sperimentali, ho utilizzato il ratto come modello animale, poiché nell'uomo, gli studi sull'obesità sono difficili da eseguire, se si vogliono considerare tutti i parametri che non possono essere misurati in maniera diretta. Inoltre, i ratti da laboratorio, per le loro condizioni di stabulazione, rappresentano un ottimo modello di studio poiché rispecchiano le caratteristiche tipiche dell'uomo occidentale, esibendo un comportamento di tipo sedentario (Spangenberg et al. 2005; Buettner et al. 2007; Aydin et al. 2014). In più, l'assunzione di energia, la composizione della dieta e il livello di attività fisica possono essere facilmente monitorati.

Nel primo disegno sperimentale, ho eseguito misure del bilancio energetico e della composizione corporea degli animali sottoposti ai suddetti trattamenti. Ho, quindi, condotto una caratterizzazione metabolica dei ratti. Ho anche determinato sia il profilo lipidico plasmatico, per verificare se in seguito al trattamento, si verificassero variazioni nei livelli ematici di trigliceridi e colesterolo totale, sia i parametri infiammatori plasmatici. Dal momento che, in letteratura è riportata una maggiore suscettibilità alla stress ossidativo dei PUFA, ho anche valutato il grado di perossidazione lipidica plasmatica. Per valutare l'impatto delle diete utilizzate sui tessuti periferici e in particolare su organi chiave del metabolismo, ho anche valutato la funzionalità epatica, in termini di composizione lipidica, necrosi del tessuto, capacità respiratoria mitocondriale e conduttanza protonica di tali organelli. È, inoltre, noto che l'entità della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) dipende dal grado di accoppiamento della

fosforilazione ossidativa, e dunque dall'efficienza. Pertanto un leggero disaccoppiamento, mantenendo il potenziale protonico mitocondriale sotto il livello soglia richiesto per produrre i radicali dell'ossigeno, è funzionale nell'ostacolare l'eccesso di produzione dei ROS. Quindi, per capire se il trattamento effettuato comportasse anche variazioni nella formazione di radicali liberi e quindi un aumento del danno ossidativo cellulare e o delle difese antiossidanti, ho determinato a carico del fegato, l'attività dell'aconitasi mitocondriale, un enzima del ciclo di Krebs sensibile all'esposizione ai radicali liberi, e l'attività della superossido dismutasi (SOD), uno dei sistemi utilizzati dal mitocondrio per metabolizzare le ROS. Inoltre ho anche valutato il grado di perossidazione lipidica attraverso l'analisi delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS). In più, essendo alla ricerca di un sito cellulare che potesse determinare un minore potenziale obesogeno della dieta iperlipidica ricca in acidi grassi polinsaturi, ho focalizzato l'attenzione sul tessuto adiposo bruno (BAT), un organo termogenico ben conosciuto, che permette ai roditori di sopravvivere al freddo e quindi contribuire alla termogenesi dieta-indotta (Wijers et al. 2009), e che di recente è stato scoperto possa essere indotto anche negli uomini (Celi et al. 2015).

Per il secondo disegno sperimentale, ho ritenuto opportuno condurre le stesse analisi che avevo in precedenza condotto nel primo disegno sperimentale, con il fine di ottenere indicazioni dopo un periodo di restrizione di 14 giorni a cui è seguito uno stesso periodo di rialimentazione iperlipidica. In più, poiché in risultati ottenuti precedentemente, era stato dimostrato che l'omeostasi del glucosio viene persa durante rialimentazione con diete ad alto contenuto di grassi ricchi di strutto (principalmente contenenti acidi grassi monoinsaturi e saturi) in quanto in parte, le vie di lipogenesi de novo vengono fortemente inibite, sia a livello del fegato che nel tessuto adiposo bianco (WAT) (Marcelino et al. 2013), in questo secondo disegno sperimentale ho ritenuto opportuno valutare proprio la

lipogenesi de- novo, in quanto rappresenta una via alternativa di utilizzazione del glucosio a livello del fegato, WAT e del BAT che, con meccanismi diversi, giocano un ruolo differente nell'omeostasi del glucosio. Ho dunque misurato l'attività di un enzima coinvolto in questo pathway metabolico, l'acido grasso sintasi (FAS), in tutti e tre i tessuti menzionati sopra. Inoltre, giacché, in letteratura, è noto il coinvolgimento del muscolo scheletrico nella soppressione della termogenesi, rappresentando in tal modo uno dei siti maggiormente responsabili del fenomeno di recupero di grasso corporeo, in seguito a rialimentazione dopo restrizione calorica, e nella correlata insorgenza di insulino-resistenza (Crescenzo et al. 2006), ho esteso le analisi condotte nel fegato, sia nel primo che nel secondo disegno sperimentale, anche al muscolo scheletrico. Oltre che alla composizione di tale organo, ho posto particolare attenzione alla capacità ossidativa mitocondriale, poiché i più importanti siti della termogenesi sono i mitocondri, che possono essere considerati la centrale energetica della cellula, giacché sono deputati alla conversione dell'energia in forme maggiormente utili a promuovere le reazioni cellulari. Inoltre ho valutato anche il grado di stress ossidativo di tale organo, attraverso la determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale e della concentrazione dei lipidi perossidati, e delle difese antiossidanti, attraverso la determinazione dell'attività della SOD.

## *Materiali e metodi*

## ***Animali e disegno sperimentale***

### ***Primo disegno sperimentale***

Per il primo disegno sperimentale sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley di 6 settimane di età, stabulati individualmente ad una temperatura di  $23\pm 1$  °C e sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale con 12 ore di luce e 12 ore di buio (6.30-18.30). Il trattamento, la stabulazione, ed il sacrificio degli animali sono stati eseguiti in conformità con le linee guida del Ministero della Sanità. Tutte le procedure sperimentali che hanno coinvolto gli animali sono state approvate dal “Comitato Etico per la Sperimentazione Animale” dell’Università di Napoli “Federico II”.

Gli esperimenti sono stati condotti dopo una settimana di adattamento dei ratti alle condizioni di stabulazione, al termine della quale sono stati selezionati in base al loro peso corporeo medio di circa  $250\pm 5$ g, e suddivisi in tre gruppi (N=8). Un gruppo di ratti è stato subito sottoposto ad eutanasia per la determinazione della composizione corporea e del contenuto energetico iniziali. I restanti due gruppi sono stati alimentati per due settimane con quantità isocaloriche di due diete ad elevato contenuto lipidico (*pair fed* 380 kJ di energia metabolizzabile/giorno), composte rispettivamente da strutto (SFA-MUFA) e olio di cartamo/olio di semi di lino 2:1 (PUFA). In particolare, la dose giornaliera somministrata era corrispondente all'assunzione spontanea di energia degli stessi ratti che è stata valutata prima dell'inizio dell'esperimento. La composizione delle due diete utilizzate è mostrata in Tabella 1 nella quale è ben evidente che esse differiscono solo per l'aspetto qualitativo dei grassi presenti, mentre quantitativamente la quota lipidica, proteica e glucidica resta invariata. Il contributo in percentuale dei singoli macronutrienti al contenuto calorico delle due diete è del 58.2% di energia derivante dai grassi, del 21.1% derivante dalle proteine e del 20.7% proveniente dai carboidrati. La composizione in acidi grassi delle due diete (Tabella 1) è stata determinata mediante cromatografia gas liquida

(GLC). 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, mediante l'utilizzo della bomba calorimetrica. Inoltre, il giorno precedente l'eutanasia, sono state prelevate aliquote di sangue dalla coda dopo 6h dall'assunzione di cibo per la determinazione dei livelli plasmatici di insulina e glucosio, in modo da poter ricavare l'indice HOMA, indicativo dello stato di resistenza all'insulina. Alla fine del periodo sperimentale, i ratti sono stati sottoposti ad eutanasia e aliquote di sangue sono state prelevate al fine di valutare il profilo lipidico e i parametri infiammatori plasmatici, nonché l'attività dell'enzima Alanina aminotransferasi (ALT), la cui aumentata attività è un noto indice di danno epatico. Il fegato dopo essere stato fotografato in situ è stato subito prelevato per la determinazione della composizione epatica in acqua e lipidi e per svolgere tutti i successivi dosaggi biochimici. Inoltre sono stati prelevati anche il BAT, il WAT epididimale e quello viscerale (e-WAT, v-WAT), anche in questo caso per eseguire in seguito le analisi previste. La carcassa restante è stata utilizzata per la determinazione della 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 del ceppo Sprague Dawley di 6 settimane di età, stabulati individualmente ad una temperatura di  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale con 12 ore di luce e 12 ore di buio (6.30-18.30). Il trattamento, la stabulazione, ed il sacrificio degli animali sono stati eseguiti in conformità con le linee guida del Ministero della Sanità. Tutte le procedure sperimentali che hanno coinvolto gli animali sono state approvate dal "Comitato Etico per la Sperimentazione Animale" dell'Università di Napoli "Federico II". Gli esperimenti sono stati condotti dopo una settimana di adattamento dei ratti alle condizioni di stabulazione al

termine delle quali gli stessi sono stati selezionati in base al peso corporeo medio di circa  $200 \pm 5\text{g}$  e sottoposti a due settimane di restrizione calorica, riducendo del 50% il loro introito di cibo, rispetto a quello che avrebbero introdotto spontaneamente (dato calcolato come media del cibo introdotto per giorno dagli stessi ratti prima di essere sottoposti alla restrizione), e lasciando ad essi libero accesso all'acqua. Durante il periodo di restrizione calorica, è stato utilizzato mangime standard da laboratorio (Mucedola 4RF21; Settimo Milanese, Milan, Italy), in cui il contributo percentuale dei singoli macronutrienti al contenuto calorico della dieta è del 29% per le proteine, 10,6% per i lipidi e 60,4% per i carboidrati. È stato precedentemente dimostrato che tale riduzione dell'introito calorico induce l'arresto della crescita e il marcato depauperamento dei depositi di grasso corporeo, portando ad una diminuzione della spesa energetica (dovuta alla soppressione della termogenesi) che si basa su un'alta efficienza di deposizione di grasso durante la rialimentazione (Crescenzo et al. 2003). Allo scadere della fase di restrizione, immediatamente prima della rialimentazione, tutti i ratti sono stati separati in tre gruppi (N=8), di cui, un gruppo è stato sottoposto ad eutanasia per decapitazione, in modo da determinare la composizione corporea dei ratti sottoposti a restrizione, mentre gli altri due gruppi sono stati rialimentati con quantità isocaloriche delle due differenti diete iperlipidiche (58,2% dell'energia), utilizzate già nel primo disegno sperimentale. In particolare, la razione giornaliera corrispondeva a quanto introdotto spontaneamente da ratti di controllo, con stesso peso corporeo, non sottoposti a restrizione e alimentati con mangime standard di laboratorio, come riportato in precedenza (Crescenzo et al. 2003).

Va sottolineato che il quantitativo dei grassi utilizzati nelle due diete, circa il 58%, corrisponde a quello che spesso è utilizzato nella riabilitazione nutrizionale di bambini o adolescenti che hanno subito un drastico e non salutare calo ponderale, al fine di garantire loro un apporto energetico ottimale che gli permetta il recupero del peso corporeo

(Prentice and Paul, 2000). I dettagli della composizione delle due diete e del rispettivo contenuto di energia sono riportati in Tabella 1.

Nel dettaglio, il protocollo sperimentale utilizzato, caratterizzato da due settimane di rialimentazione controllata preceduta da due settimane di restrizione calorica, è simile a quello usato in precedenza come modello sperimentale per studiare le regolazioni della spesa energetica direttamente connesse con l'elevata deposizione di grasso che si verifica nella fase di rialimentazione (Dulloo and Girardier, 1992; Crescenzo et al. 2003). 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, mediante l'utilizzo della bomba calorimetrica. Il giorno prima del sacrificio ciascun ratto è stato messo a digiuno per 6 ore e dalla coda sono state prelevate aliquote di sangue per la preparazione del plasma per la determinazione dei livelli plasmatici di insulina e glucosio, in modo da poter ricavare l'indice HOMA, indicativo dello stato di resistenza all'insulina. Al termine delle due settimane di rialimentazione, i ratti dei due gruppi sono stati sottoposti ad eutanasia. In questo stesso giorno, è stato prelevato il plasma sistemico, per le misure del profilo lipidico plasmatico e dei parametri infiammatori. I v-WAT e-WAT, come il BAT interscapolare (i-BAT), sono stati pesati e alcune aliquote congelate al fine di svolgere ulteriori misure. I fegati sono stati fotografati, pesati e alcune aliquote congelate per effettuare le successive analisi biochimiche, mentre la parte restante è stata usata per l'isolamento della frazione mitocondriale. Anche il muscolo scheletrico, da una sola zampa posteriore, è stato pesato e alcune aliquote congelate per effettuare le successive analisi biochimiche, mentre la parte restante è stata usata per l'isolamento della frazione mitocondriale. La rimanente carcassa è stata utilizzata per valutarne la composizione corporea, il contenuto energetico e il guadagno corporeo di energia, lipidi e proteine.

**Tabella 1***Composizione delle diete sperimentali*

<i>Componenti della dieta, g</i>	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
Mangime	57	57
Caseina	13.1	13.1
Metionina	0.1	0.1
Colina	0.1	0.1
Vitamine miste	0.5	0.5
Minerali	1.8	1.8
Olio di girasole	1.4	1.4
Lardo	26	-
Olio di Cartamo	-	17.3
Olio di semi di Lino	-	8.7
Peso totale	100	100
 <i>% Energia Metabolizzabile</i>		
Proteine	21.1	21.1
Lipidi	58.2	58.2
Carboidrati	20.7	20.7
Energia Metabolizzabile, kJ/100 g	1885	1885
Energia lorda, kJ/100 g	2150	2150
 <i>Composizione degli acidi grassi, g/100g</i>		
4:0–10:0	0.21	-
12:00	0.21	-
14:00	1.23	-
16:00	23.71	7.22
18:00	15.97	2.35
20:00	0.03	0.18
14:1n5	0.47	-
16:1n7	2.44	0.06
18:1n9	39.54	16.39
20:1n9	1.05	0.12
22:1n9	0.09	0.08
18:2n6	13.93	59.13
18:3n3	1.12	14.47
SFA%	41.4	9.8
MUFA%	43.6	16.6
PUFA%	15	73.6
UFA/SFA%	1.42	9.2

SFA= Acidi grassi saturi. MUFA=Acidi grassi monoinsaturi. PUFA= Acidi grassi poliinsaturi. UFA=Acidi grassi insaturi

### ***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 in un omogeneizzatore Politron (Kinematica, Luzern, Switzerland). Aliquote dell'omogenato sono state poi utilizzate per analizzare il contenuto energetico, il contenuto dei lipidi, delle proteine e di acqua della carcassa.

### ***Misura del contenuto energetico della carcassa***

Campioni dell'omogenato essiccato sono stati ridotti in polvere ed utilizzati per fare delle pasticche. Tali pasticche sono servite per misurare il contenuto energetico della carcassa mediante bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico Parr, della Parr Instruments Co., Moline, USA) calibrata con uno standard di acido benzoico essiccato.

### ***Misura del contenuto lipidico, proteico e di acqua della carcassa***

Il contenuto lipidico della carcassa è stato determinato gravimetricamente in seguito all'estrazione dei lipidi dalla carcassa in accordo con il metodo di Folch (Folch et al. 1957). 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 sottoforma 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***

Durante il periodo di trattamento sono stati monitorati giornalmente, e con estrema precisione, sia il peso corporeo che la quantità di cibo introdotta, sottraendo alla quantità di dieta somministrata ai ratti, quella lasciata nella mangiatoia nonché quella eventualmente caduta nella gabbia (e non introdotta dall'animale). In questo modo è stato calcolato l'introito calorico lordo, ottenuto moltiplicando la densità energetica lorda della dieta (21,5 KJ/g) per la quantità effettivamente consumata.

Anche le feci prodotte durante il periodo di trattamento sono state raccolte ed essiccate quotidianamente in una stufa. Con un procedimento analogo a quello eseguito per la carcassa, dopo essere state sminuzzate e trasformate in pasticche, sono state ossidate all'interno del calorimetro adiabatico Parr per determinarne il contenuto energetico.

Sottraendo all'introito calorico lordo il contenuto energetico delle feci, e sottraendo infine un 4% di energia che si assume essere stato perso con le urine (Iossa et al. 2002, Barr and Mc Craken, 1984), si determina il valore dell'energia metabolizzabile introdotta (ME).

Il guadagno energetico corporeo è stato calcolato come differenza tra il contenuto energetico dei ratti sacrificati alla fine della rialimentazione e quello calcolato sul gruppo di ratti sacrificati alla fine della restrizione. Analogamente è stato calcolato il guadagno lipidico e proteico. 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. La spesa energetica, secondo l'equazione di bilancio energetico, è stata calcolata come differenza tra l'energia introdotta e quella guadagnata.

## *Ossidazione dei substrati*

### *Calorimetria indiretta*

La produzione di anidride carbonica ( $VCO_2$ ), il consumo di ossigeno ( $VO_2$ ), il quoziente respiratorio (RQ) e il quoziente respiratorio non proteico (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). La spesa energetica giornaliera e la quota di substrati ossidati sono stati calcolati per l'intero periodo di 24 ore dal  $VO_2$ ,  $VCO_2$  e azoto urinario in accordo con Even et al. (1994) utilizzando le equazioni:

$$✓ \text{ Carboidrati ossidati} = 4,57 VCO_2 - 3,23 VO_2 - 2,6 N$$

$$✓ \text{ Lipidi ossidati} = 1,69 VO_2 - 1,69 VCO_2 - 2,03 N$$

$$✓ \text{ Proteine ossidate} = 6,25 N$$

$$✓ \text{ Spesa energetica} = 4,6 VCO_2 + 16,3 VO_2 - 8,10 N$$

## ***Parametri plasmatici***

### ***Determinazione dei livelli plasmatici di glucosio, di insulina e calcolo dell'indice HOMA.***

Il giorno prima dell'eutanasia i ratti sono stati tenuti a digiuno per 6 ore dalle 08.00 di mattina. Il campione di sangue basale è stato ottenuto attraverso un piccolo taglio effettuato sulla coda ed è stato posto in provette rivestite con EDTA. Le aliquote prelevate, sono state centrifugate per 8 minuti a 1400 g alla temperatura di 4 °C per allontanare la parte corpuscolata del plasma, che poi è stato suddiviso in aliquote per la determinazione dei livelli plasmatici di glucosio e di insulina a digiuno.

I livelli plasmatici di glucosio sono stati valutati mediante un dosaggio enzimatico-colorimetrico utilizzando un Kit commerciale (Pokler). I livelli plasmatici di insulina sono stati valutati mediante saggio ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (Merckodia), in un unico test per eliminare le variazioni inter-saggio

### ***Indice HOMA***

I valori di glicemia e insulinemia ottenuti sono stati utilizzati per calcolare l' "Homeostatic Model Assessment Index" (HOMA) secondo la seguente formula:

$$\mathbf{Indice\ HOMA = Glucosio\ (mg/dL) \times Insulina\ (mU/L)/405}$$

L'indice HOMA ci consente di stimare la sensibilità del fegato all'insulina (Cacho et al. 2008).

### ***Profilo lipidico plasmatico***

Per la determinazione del profilo lipidico sono stati effettuati dei dosaggi per esaminare eventuali alterazioni dei livelli ematici dei lipidi. Nello specifico sono state valutate variazioni del colesterolo totale, dei trigliceridi e degli acidi grassi non esterificati (NEFA). Al fine di eseguire questi dosaggi, al momento del sacrificio sono state prelevate aliquote di sangue da ogni animale; tali aliquote, poste in apposite provette contenenti EDTA, sono state centrifugate alla velocità di 1400 g per 8 minuti alla temperatura di 4°C, per poter separare il plasma dalla parte corpuscolata del sangue. In seguito, campioni di plasma sono stati utilizzati per la determinazione delle suddette misure di interesse, utilizzando dei kit colorimetrici commerciali.

### ***Quantificazione dell'enzima ALT***

La concentrazione plasmatica di ALT è stata misurata mediante l'uso di kit commerciali (SGM Italia, Roma, Italia e Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK).

### ***Misura dei livelli plasmatici di perossidazione lipidica***

La perossidazione lipidica del plasma è stata determinata in accordo a Fernandes (Fernandes et al. 2006). Il principio su cui si basa tale dosaggio è quello secondo cui il prodotto della perossidazione lipidica (la malondialdeide), in presenza dall'acido tiobarbiturico, porta alla formazione dei TBARS.

Si pipettano 0.25 ml di tampone fosfato, 25 µl di plasma, 0.25 ml di acido tricloroacetico (TCA), 1 ml 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 formati durante la reazione vengono calcolati utilizzando il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) pari a  $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ed espressi in nmol TBARS espressi per ml di plasma.

*Analisi condotte su fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo (bianco e bruno)*

*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 1 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. 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 250 mM saccarosio, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.1 % 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 (Goglia et al. 1998).

*Preparazione dell'omogenato di 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 MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.1% (peso/volume) BSA libera da acidi

grassi, e poi trattati con proteasi nagarse (1 mg/g di tessuto) per 4 minuti. I frammenti del tessuto ottenuto sono stati poi omogeneizzati nella soluzione precedentemente descritta (1:8, peso/volume) 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).

### ***Determinazione del contenuto proteico mitocondriale***

Per poter effettuare le misure del consumo di ossigeno, la determinazione dell'attività specifica della superossido dismutasi e dell'aconitasi e le misure della perossidazione lipidica nei mitocondri isolati è stato determinato il contenuto proteico della preparazione mitocondriale epatica con il metodo di Hartree (1972), usando BSA come proteina standard.

## ***Attività respiratoria di omogenato e mitocondri isolati dal fegato e muscolo scheletrico***

L'attività respiratoria nei mitocondri isolati è stata misurata polarograficamente, attraverso l'uso dell'elettrodo ad ossigeno di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA). 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. Come substrati NAD-dipendenti sono stati utilizzati il glutammato e il piruvato, ambedue in presenza di malato. 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  $\beta$ -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 il fegato 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 il 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  $\mu$ M); glutammato (10 mM) in presenza di malato (2.5 mM); palmitoil-CoA (40  $\mu$ M) in presenza di malato (2.5 mM) e di carnitina (2.0 mM), palmitoil-carnitina (40  $\mu$ 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/stato4, in accordo con Estabrook (1967), allo scopo di valutare l'integrità mitocondriale.

### ***Misura della conduttanza protonica basale e indotta dei mitocondri epatici***

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato mediante uno spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda (Thermoscientific) in presenza di un colorante carico, la safranina O, che ha la peculiarità di legarsi alla membrana mitocondriale in modo direttamente proporzionale al potenziale.

La lunghezza d'onda di riferimento è 533 nm che coincide con il punto isosbastico della safranina ossia il punto dello spettro di assorbimento in cui il colorante presenta la stessa assorbenza sia nello stato legato che non legato alla membrana.

La lunghezza di lettura è invece 511 nm, in cui l'assorbenza cambia al variare dello stato del colorante.

La conduttanza protonica basale è stata valutata secondo il metodo descritto da Brand (Brand et al. 1990) che consiste nel valutare le variazioni del potenziale di membrana mitocondriale associate alle variazioni del consumo di ossigeno, ottenute mediante titolazione con quantità crescenti di malonato a partire dallo Stato 4 della respirazione in presenza di oligomicina, utilizzando succinato come substrato FAD-dipendente.

Il malonato è un inibitore competitivo del secondo complesso della catena respiratoria, mentre l'oligomicina è un antibiotico che inibisce l'ATP-sintetasi, bloccando il passaggio di  $H^+$  attraverso la subunità  $F_0$ .

L'utilizzo di oligomicina è fondamentale in questa misura in quanto, per poter determinare la conduttanza protonica basale, è necessario abolire il flusso protonico attraverso la ATP-sintetasi. Le misure sono state effettuate a  $30^\circ C$  incubando i mitocondri in una soluzione contenente LiCl 30 mM,  $MgCl_2$  6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 Mm, Tris- $PO_4$  20 Mm, 0.1% (peso/volume) di BSA libera da acidi grassi, pH 7.0. La titolazione dello Stato 4 è stata eseguita attraverso aggiunte consecutive di malonato in presenza di succinato 10 mM, rotenone 3.75  $\mu M$ , oligomicina 2  $\mu g/ml$ , safranina O 83.3 nmol/mg e nigericina 80 mg/ml. La nigericina essendo scambiatore  $H^+/K^+$ , è capace di annullare la differenza di pH ai lati della membrana mitocondriale interna convertendola in differenza di potenziale elettrico in modo che il gradiente elettrochimico protonico sia rappresentato solo dal potenziale di membrana.

La conduttanza protonica indotta da acidi grassi è stata valutata dalla titolazione della respirazione con aggiunte sequenziali di malonato, fino ad una concentrazione di 0.6 mM, e parallela registrazione del potenziale di membrana (Nedergaarg, 1983).

Il potenziale di membrana mitocondriale ed il consumo di ossigeno sono stati misurati come descritto precedentemente in presenza di succinato 10 mM, rotenone 3.75  $\mu M$ , oligomicina 2  $\mu g/ml$ , safranina O 83.3 nmol/mg e di palmitato 75  $\mu M$ .

L'effetto disaccoppiante degli acidi grassi è stato misurato determinando la diminuzione del potenziale di membrana e l'incremento della respirazione con l'aggiunta di quantità fisiologiche di un substrato lipidico, l'acido palmitico.

### ***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 et al. 1957).

La determinazione del contenuto di glicogeno epatico e muscolare è stata effettuata secondo il metodo di Roehrig and Allred (1974).

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

### ***Determinazione del contenuto di acqua epatica***

Per la misura del contenuto di acqua, dopo aver distribuito delle aliquote di omogenato in apposite vaschette ed averle pesate, queste sono state poste in una stufa a secco e lasciate essiccare 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 danno ossidativo in omogenati e mitocondri di fegato e muscolo scheletrico***

***Determinazione dell'attività dell'aconitasi nei mitocondri epatici e del muscolo scheletrico.***

Il dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare i danni “in vivo” prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche. Infatti, l'aconitasi è particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali ossigeno, per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi, ciò determinerà la presenza contemporanea nei mitocondri dell'aconitasi attiva funzionante e dell'aconitasi danneggiata.

***Determinazione dell'aconitasi attiva***

Per il dosaggio si utilizzano solo campioni congelati in azoto liquido immediatamente dopo l'isolamento e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , in quanto l'attività dell'aconitasi si danneggia in tempi molto brevi. La misura è effettuata in presenza di Triton 1% allo scopo di rompere la membrana mitocondriale. I campioni così ottenuti si incubano a  $25^{\circ}\text{C}$  in un tampone costituito da Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) e  $\text{MnCl}_2$  0.6 mM,  $\text{NADP}^+$  0.2 mM, sodio-citrato 30 mM e 2 U/ml di isocitrico deidrogenasi citoplasmatica con formazione di NADP ridotto (Gardner, 2002). Poiché il NADPH assorbe a 340 nm, il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente, misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm. L'attività dell'aconitasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  del NADPH,  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , e assumendo la conversione di una molecola di citrato in una

molecola di NADPH mediante l'isocitrico deidrogenasi. L'attività dell'enzima espressa come mU/mg di proteine mitocondriali.

### ***Determinazione dell'aconitasi totale***

Nella determinazione dell'attività aconitasica totale rispetto a quella basale si aggiunge nelle provette: solfato ammonio ferroso 20 mM, Na<sup>2</sup>S 20 mM e DL-ditionitrotolo (DTT) 0.5 M, quest'ultimo impedisce al ferro di ossidarsi. In questo modo non si verifica la perdita di attività da parte dell'aconitasi ed è dunque possibile quindi calcolare l'attività totale dell'aconitasi seguendo le stesse procedure seguite per la determinazione dell'aconitasi attiva. Una volta determinate entrambe le misure dell'aconitasi, il rapporto tra l'attività dell'aconitasi attiva e l'attività dell'aconitasi totale, verrà utilizzato per evidenziare, in presenza di un'alterazione dell'attività enzimatica, se questa è realmente dovuta all'azione dei radicali liberi oppure ad una variazione dei livelli dell'enzima messo in atto dalla cellula come risposta a determinati trattamenti.

### ***Determinazione dell'attività della SOD nei mitocondri epatici e del muscolo scheletrico.***

L'attività specifica della SOD, è stata valutata in accordo con Flohè e Otting (1984), in un mezzo caratterizzato da 0.1 mM EDTA, 2 mM KCN, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8, 20 mM citocromo C, 0.1 mM di xantina, e 0.01 unità di xantina ossidasi. Il dosaggio è stato eseguito spettrofotometricamente (550 nm) a 25°C, monitorando il decremento nel tasso di riduzione del citocromo C da parte del radicale superossido, generato dal sistema xantina-xantina ossidasi. Un'unità di SOD è definita come la concentrazione di enzima capace di inibire del 50 % la riduzione del citocromo C in presenza del sistema xantina-xantina ossidasi.

## ***Misura della perossidazione lipidica in omogenato e in mitocondri isolati da fegato e muscolo scheletrico***

La perossidazione lipidica rappresenta un indice del danno ossidativo. La perossidazione lipidica dei mitocondri epatici è stata determinata in accordo con il metodo di Fernandes et al. (2006), come descritto precedentemente

I TBARS formati durante la reazione vengono espressi in nmol TBARS per g di tessuto per le misure effettuate nell'omogenato o nmol TBARS per mg di proteine mitocondriali per le misure effettuate nei mitocondri isolati.

## ***Attività della FAS in fegato, e-WAT e i-BAT***

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. Il dosaggio è stato effettuato su campioni di omogenato di fegato, e-WAT ed i-BAT.

In particolare, secondo il protocollo sperimentale descritto da Penicaud et al. (1991), i campioni in esame sono stati incubati in una soluzione contenente  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 mM a pH 6.5, acetil-CoA 57.9  $\mu\text{M}$ , malonil-CoA 87.9  $\mu\text{M}$  e NADPH 281.2  $\mu\text{M}$ . 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 omogenato analizzato, sapendo che una unità rappresenta la quantità di enzima che ossida 1  $\mu\text{mol}$  di NADPH in un minuto a 37°C.

### ***Determinazione del grado di infiammazione epatica***

#### ***Concentrazione di tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) nel fegato***

La concentrazione di TNF- $\alpha$  nel tessuto epatico è stata misurata attraverso saggio ELISA (R&D Systems, U.S.A.) seguendo le istruzioni del produttore. Dopo estrazione proteica, il surnatante è stato prelevato, effettuato il dosaggio e sono state preparate le aliquote per effettuare l'analisi del TNF- $\alpha$ .

I pozzetti di una piastra di micro titolazione sono stati rivestiti con 100  $\mu\text{L}$  di anticorpo anti-TNF- $\alpha$  4 $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM (pH = 7,4) e incubati per una notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata allontanata e l'eccesso di anticorpo è stato quindi rimosso mediante lavaggio con circa 300  $\mu\text{L}$  di Wash Solution. I restanti siti sulla piastra sono stati bloccati con l'utilizzo di una Blocking Solution (contenente BSA 1%), incubata per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo un ulteriore lavaggio, 100  $\mu\text{L}$  dei campioni (diluiti 1:1000 con il diluente fornito dal kit) sono stati aggiunti ai pozzetti e incubati per 2 ore a temperatura ambiente. A questa incubazione è seguito un altro lavaggio, l'incubazione per due ore con 100  $\mu\text{L}$  di anticorpo anti-TNF- $\alpha$  biotinilato (225 ng / ml di diluente) seguito dal trattamento con streptavidina-HRP (che lega la biotina presente sull'anticorpo secondario; diluizione 1:200; 1h, temperatura ambiente). Sono quindi stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di soluzione di sviluppo (20 mg 0-fenilendiamina dicloroidrato in 50 ml di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 70 mM, acido citrico 30 mM pH 5, e 120  $\mu\text{l}$  di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e questi sono stati incubati per 25 minuti a 37°C. Infine, la

reazione è stata stoppata con l'aggiunta di 50  $\mu$ l di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 M. La produzione di colore catalizzata dall'azione della perossidasi HRP sulla soluzione di sviluppo è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica a 492 nm. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di TNF- $\alpha$  nel campione (ng/mg), e questa è calcolata in base ad una curva di calibrazione costruita con l'ausilio di calibratori a concentrazione nota di TNF- $\alpha$ .

### ***Attività della mieloperossidasi (MPO) epatica***

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

### ***Quantificazione della proteina disaccoppiante 1 (UCP-1) nell' i-BAT***

Campioni di i-BAT sono stati omogeneizzati in un buffer di lisi contenente 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5% (peso/peso) glicerolo, 1% Triton X-100 e 50  $\mu$ L/g di tessuto di un cocktail di inibitori di proteasi, usando un omogeneizzatore Potter. Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad agitazione per 2 h a 4°C e centrifugati a 14000 g per 20 min a 4°C. I supernatanti sono stati raccolti, aliquote sono state denaturate in un buffer (Tris 60.0 mM pH 6,8, saccarosio 10%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanolo 4%) e caricati in un gel di poliacrilammide-SDS 12%. Dopo la corsa

nell'electrode buffer (Tris 50 mM pH 8.3, glicina 384 mM, SDS 0.1%), i gel sono stati trasferiti su una membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF) (Millipore) a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> per 90 minuti. Le membrane sono state prebloccate in una soluzione contenente PBS, 5% latte in polvere, Tween 20 0.5%, per 1 ora e poi incubate tutta la notte a 4°C con un anticorpo di coniglio per UCP1 (Alpha Diagnostic International) diluito in blocking buffer 1µg/mL. Le membrane sono poi state lavate 3 volte per 10 minuti in PBS/0,5 Tween 20 e 3 volte per 10 minuti in PBS; ed ancora, sono state incubate 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario anti-coniglio, coniugato con la perossidasi di rafano (Promega). In seguito, le membrane sono state nuovamente lavate come sopra descritto, sciacquate in acqua distillata ed incubate a temperatura ambiente con un substrato luminescente, il CDP-Star (Sigma-Aldrich). La rilevazione dei dati è stata effettuata esponendo delle lastre autoradiografiche (Eastman Kodak Company) alle membrane. La quantificazione del segnale è stata effettuata con il software Un-Scan-It gel (Silk Scientific). Per normalizzare il segnale specifico per ogni banda, la membrana è stata strippata e incubata anche con un anticorpo policlonale per l'actina (Sigma-Aldrich) e un anticorpo secondario, coniugato alla fosfatasi alcalina (Promega).

### *Analisi statistiche*

I dati riportati costituiscono le medie con i relativi errori standard. Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test “t di Student” a due code. Valori di probabilità minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi. Tutte le analisi sono state effettuate usando il programma GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA).

## *Risultati*

## *Primo disegno sperimentale*

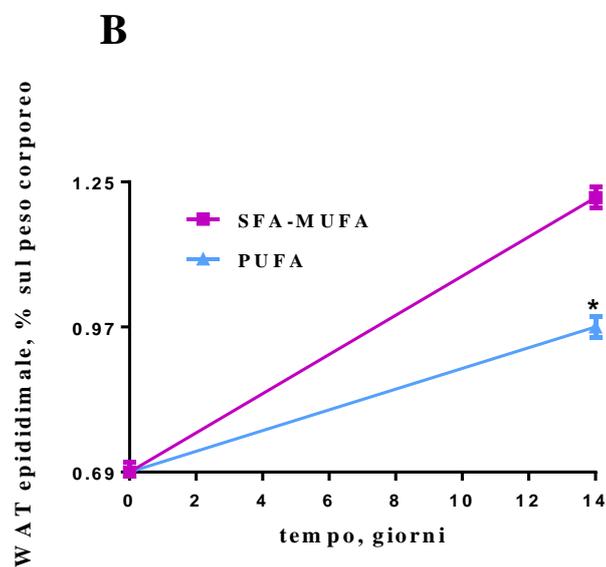
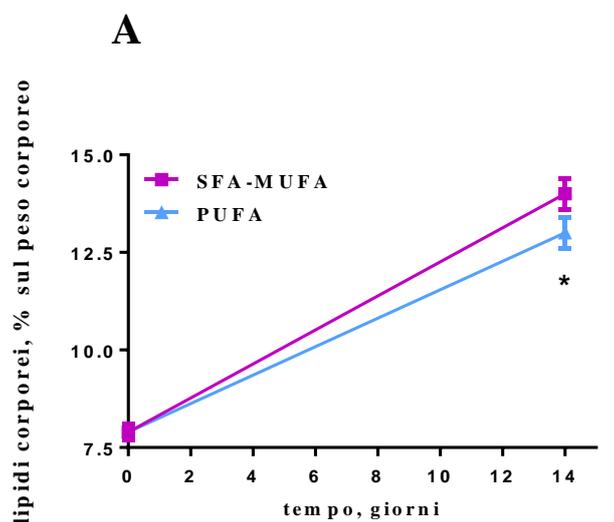
### *Bilancio energetico e composizione corporea*

Al termine delle due settimane di trattamento con diete isocaloriche iperlipidiche, lo sviluppo dell'obesità è evidente in entrambi i gruppi di ratti. In particolare, la percentuale di lipidi corporei si è duplicata rispetto al valore iniziale, pur se il valore finale è risultato significativamente inferiore nei ratti PUFA in confronto ai ratti SFA-MUFA (Figura 1A). Inoltre, la percentuale di e-WAT è aumentata nel corso del trattamento dietetico, raggiungendo un valore finale che è minore nel gruppo PUFA rispetto a quello SFA-MUFA (Figura 1 B).

La percentuale di i-BAT risulta significativamente maggiore nei ratti PUFA in confronto ai ratti SFA-MUFA (Figura 2A) ed il contenuto di UCP-1 è aumentato nei ratti PUFA rispetto ai ratti SFA-MUFA (Figure 2 B, C). Infine la percentuale di proteine corporee che si è mantenuta costante durante le due settimane di trattamento nei ratti PUFA, ha subito un significativo decremento nei ratti SFA-MUFA (Figura 3). In particolare, la diminuzione della massa magra riscontrata nel gruppo SFA-MUFA è indicativa di una perdita di massa corporea metabolicamente attiva, che, con il tempo, potrebbe portare all'istaurarsi di meccanismi di risparmio energetico, concorrendo allo sviluppo dell'obesità.

Dall'analisi delle componenti del bilancio energetico emerge che a parità di energia metabolizzabile introdotta, la spesa energetica è maggiore nei ratti PUFA rispetto ai ratti SFA-MUFA, anche se tale differenza non è significativa. Inoltre, nei ratti PUFA il guadagno lipidico e la quantità di v-WAT sono significativamente inferiori mentre il guadagno proteico è significativamente maggiore rispetto ai ratti SFA-MUFA (Tabella 2). Tutti questi dati indicano un minor effetto obesogeno della dieta PUFA rispetto a quella SFA-MUFA.

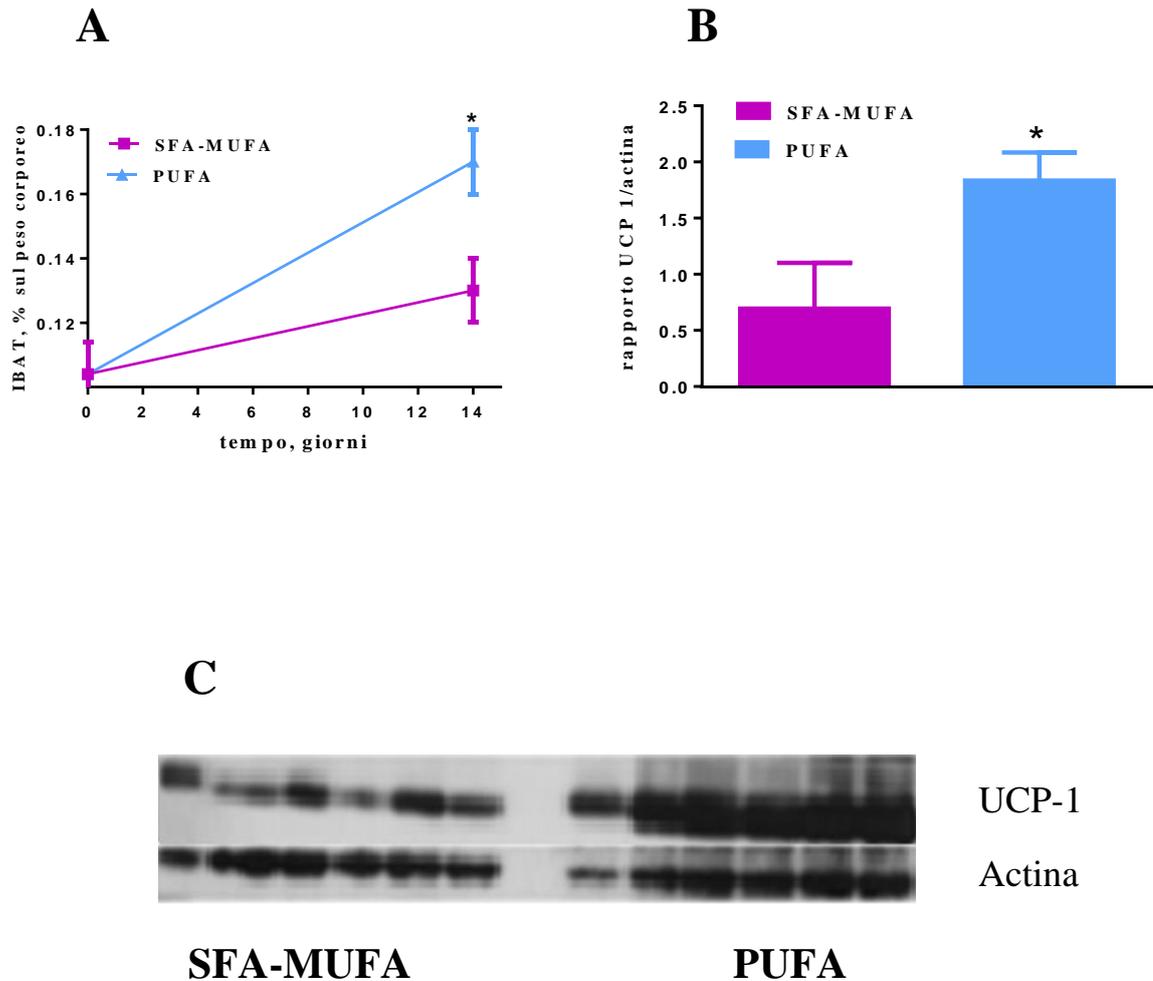
**Figura 1.** Massa grassa corporea: Lipidi corporei (A); Tessuto adiposo bianco epididimale (B), al giorno 0 e dopo 14 giorni dall'inizio dell'esperimento, in ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.

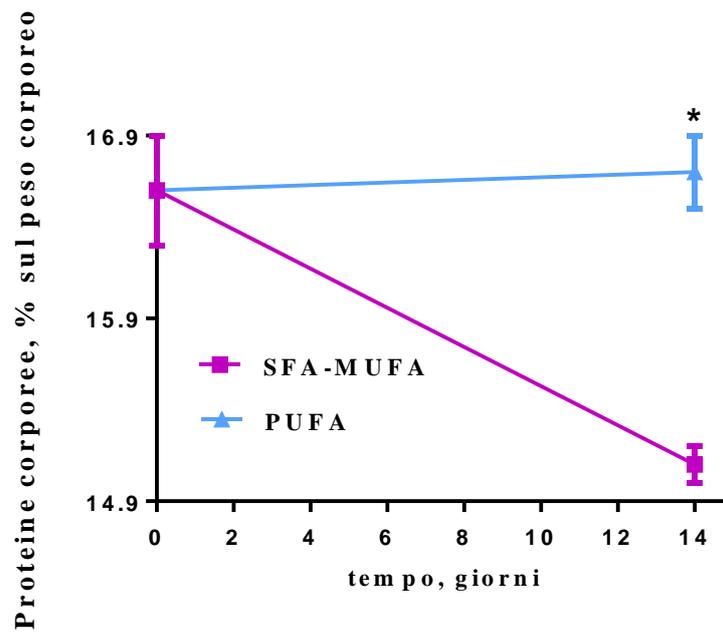
\* $p < 0.05$  rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.

**Figura 2.** (A) Tessuto adiposo bruno interscapolare al giorno 0 e dopo 14 giorni dall'inizio dell'esperimento; (B) rapporto e (C) Western blot UCP-1 actina, nel tessuto adiposo bruno interscapolare al giorno 14 dell'esperimento in ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoinsaturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è  $n=8$  tranne che per il western blot ( $n=6$ ). \* $p<0.05$  rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.

**Figura 3.** Massa magra: Proteine corporee al giorno 0 e dopo 14 giorni dall'inizio dell'esperimento, in ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è  $n=8$ .

\* $p<0.05$  rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.

**Tabella 2**

*Bilancio energetico in ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

<i>Bilancio energetico</i>	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
Peso corporeo iniziale	250 ± 4	251 ± 4
Peso corporeo finale, g	351 ± 4	345 ± 4
Peso corporeo guadagnato, g	101 ± 2	94 ± 5
Tessuto adiposo viscerale g/100g	0.111 ± 0.004	0.0940 ± 0.004*
Energia metabolizzabile introdotta, kJ	5286 ± 158	5279 ± 143
Guadagno lipidico, kJ	1125 ± 44	960 ± 66*
Guadagno proteico, kJ	244 ± 17	353 ± 16*
Spesa energetica, kJ	3915 ± 52	4020±113

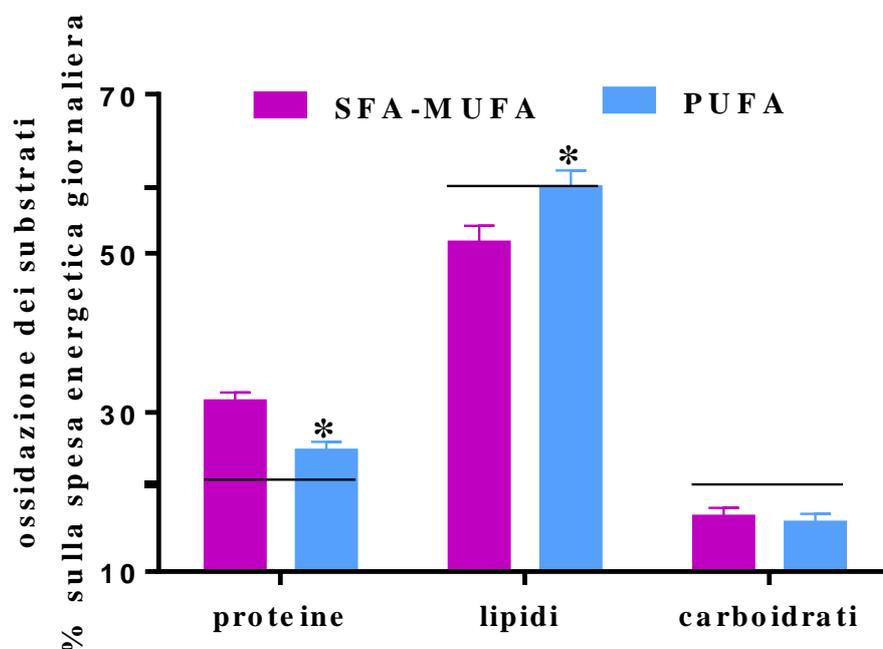
*I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.*

*\*p<0.05 in confronto al gruppo di ratti SFA-MUFA.*

### *Ossidazione dei nutrienti*

L'ossidazione dei substrati è stata valutata tramite la calorimetria indiretta. Dal dato ottenuto appare evidente che mentre nei ratti PUFA questa corrisponde alla composizione dei macronutrienti della dieta, in particolare l'ossidazione dei lipidi coincide con quelli introdotti, nei ratti SFA-MUFA la situazione è differente, cioè l'ossidazione dei substrati non corrisponde a quella dei macronutrienti introdotti, ma si assiste ad una riduzione dell'ossidazione dei lipidi mentre è aumentata quella delle proteine. Pertanto, appare chiaro che i ratti SFA-MUFA mostrano una flessibilità metabolica alterata che aggrava lo sviluppo dell'obesità (figura 4).

**Figura 4.** Contributo % di lipidi, proteine e carboidrati sulla spesa energetica giornaliera ( $SFA-MUFA = 380 \pm 15$ ,  $PUFA = 410 \pm 25$  kJ / giorno  $\times$  kg<sup>0.75</sup>) in ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.

\* $p < 0.05$  rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA. Le linee orizzontali indicano la % di ciascun macronutriente nella dieta (carboidrati = 20,7 %, proteine = 21,1 %, lipidi = 58,2 %).

### ***Parametri Plasmatici***

In tabella 3 sono riportati sia i livelli basali plasmatici di glucosio e insulina, sia il valore dell'indice HOMA, che indica il grado di insulino-resistenza. È evidente che i ratti sottoposti a due settimane di trattamento con diete isocaloriche, ad alto contenuto di grassi, ma con un differente livello del tipo di acido grasso presente, mostrano un differente grado di resistenza all'insulina. Per quanto riguarda i livelli basali di glucosio non si verifica nessuna variazione significativa tra i due gruppi di ratti, mentre nei ratti PUFA sono stati riscontrati livelli significativamente più bassi sia di insulina circolante sia dell'indice HOMA rispetto ai ratti SFA-MUFA. Poiché un aumento dell'indice HOMA riflette una diminuzione della sensibilità delle cellule bersaglio all'insulina, i ratti PUFA rispondono maggiormente all'insulina e quindi esibiscono una migliore tolleranza al glucosio e sono, così, maggiormente protetti dall'effetto diabetogeno delle diete iperlipidiche.

Per quanto concerne l'analisi del profilo lipidico plasmatico, i dati mostrano un grado maggiore di perossidazione lipidica nei ratti SFA-MUFA rispetto ai ratti PUFA, non si evidenzia invece una significativa variazione dei livelli ematici di trigliceridi e NEFA nei due gruppi, mentre il colesterolo è maggiore nei ratti SFA-MUFA. Tuttavia, l'analisi dell'attività dell'enzima ALT plasmatico, noto indice di danno epatico, ha evidenziato un incremento di questa nel gruppo PUFA. (Tabella 4).

**Tabella 3**

*Indice HOMA e livelli circolanti di glucosio ed insulina in ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
Glucosio, mg/dl	129.4±3.3	129.3±3.6
Insulina a digiuno, mU/L	11.3±1.1	8.4±1.1*
HOMA	3.7±0.3	2.7±0.3*

*I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.*

*\*p<0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.*

*Indice HOMA = (glucosio (mg/dl) x insulina (mU/L)/405*

**Tabella 4**

*Parametri plasmatici in ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

<i>Parametri plasmatici</i>	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
Acidi grassi non esterificati mmol/l	1.8 ± 0.4	1.9 ± 0.3
Trigliceridi, mg/dl	244 ± 15	244 ± 14
Colesterolo, mg/dl	143 ± 10	124 ± 11
Perossidazione lipidica, nmol TBARS/ml	13.2 ± 1.0	16.6 ± 0.8*
ALT, U/L	7.2 ± 0.5	10.0 ± 0.6 *

*I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.*

*\*p<0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.*

### ***Composizione del tessuto epatico***

L'analisi della composizione del tessuto epatico evidenzia che i ratti alimentati con la dieta PUFA presentano una significativa diminuzione dell'acqua epatica, evidente indice dell'accumulo di grasso in situ. Questa condizione poi è confermata dall'aumento dei depositi lipidici sia totali che in forma di trigliceridi e colesterolo. Questi lipidi sono anche maggiormente soggetti a stress ossidativo, visto l'incremento della perossidazione lipidica. Il fatto che il fegato sia stato più colpito dalla dieta PUFA è ulteriormente confermato dai segni di steatosi visibili in tale organo al momento del prelievo e dall'aumento dell'attività dell'ALT nel plasma. (Tabella 5. Figura 5 A,B,C,D,E,F,G,H).

**Tabella 5**

*Composizione epatica in ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

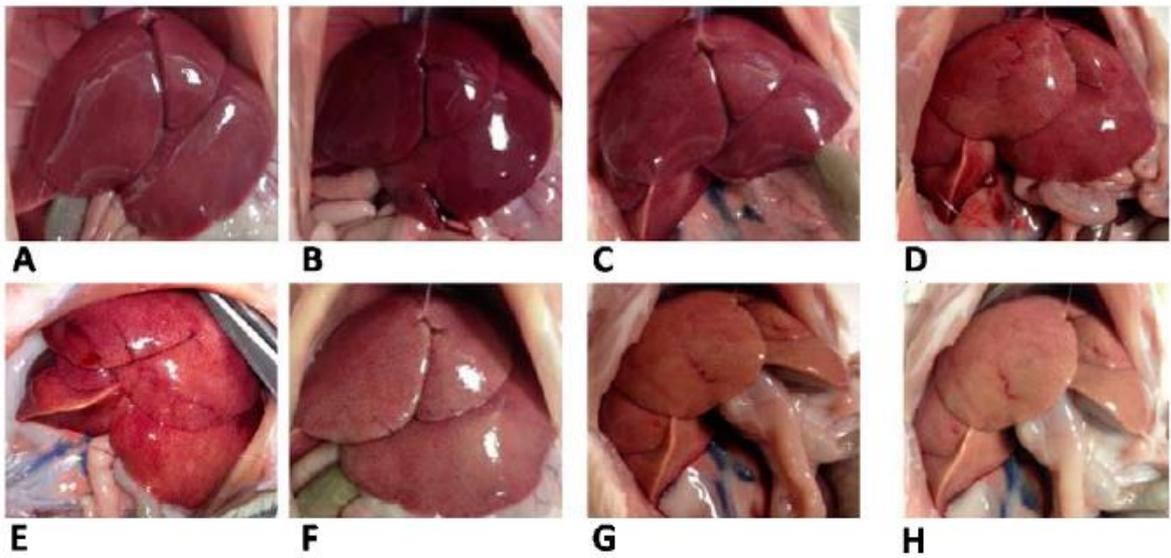
<i>Composizione epatica</i>	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
Peso fegato, g/100 g	4.26 ± 0.21	4.45 ± 0.22
Acqua, mg/g	741 ± 2	670 ± 2 *
Lipidi, mg/g	60.3 ± 5.3	86.9 ± 7.4 *
Trigliceridi, mg/g	26.7 ± 1.8	38.5 ± 3.0 *
Colesterolo,mg/g	6.2 ± 0.6	10.3 ± 0.5 *
Perossidazione lipidica, nmol TBARS/g	61.0 ± 2.0	103.4 ± 7.0*

*I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.*

*\*p<0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.*

**Figura 5**

*Immagini del fegato scattate al momento dell'eutanasia in ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA **A-D**) o polinsaturi (PUFA **E-H**).*



### ***Capacità respiratoria nei mitocondri di fegato***

Un ulteriore parametro determinato è la capacità respiratoria misurata nei mitocondri isolati (Tabella 6).

In questi organelli, la capacità ossidativa massimale (stato 3 della respirazione), misurata in presenza di quantità saturanti di ADP, risulta significativamente più alta nel gruppo PUFA rispetto ai ratti SFA-MUFA, in presenza di substrati sia NAD sia FAD-dipendenti che lipidici. Al contrario, i valori dello stato 4 della respirazione misurati in assenza di ADP in modo da ottenere il valore minimo della respirazione, non variano significativamente nei due gruppi di ratti con qualsiasi substrato utilizzato. Il valore dell'RCR riportato è indice che la procedura utilizzata per l'isolamento mitocondriale non ha apportato danni e dunque i mitocondri isolati da entrambi i gruppi sperimentali sono integri e ben funzionanti.

**Tabella 6**

*Consumo di ossigeno nei mitocondri di fegato isolati da ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

<i>Capacità respiratoria</i>	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
<i>Glutammato + Malato</i>		
stato 4	8.9±0.9	10.3±0.8
stato 3	96±7.1	120.9±5.0*
RCR	10.8	11.7
<i>Palmitoil-carnitina+ Malato</i>		
stato 4	10.7±0.8	12.6±1.2
stato 3	94.2±6.2	118±6.0*
RCR	8.8	9.4
<i>Succinato+Rotenone</i>		
stato 4	26.6±2.7	28.9±2.1
stato 3	153.8±6.1	187.8±6.0*
RCR	5.8	6.5

*I valori sono espressi come ng atomi di ossigeno/(min x mg di proteine) e sono riportati come medie con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.*

*\*P<0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA. RCR= rapporto del controllo respiratorio.*

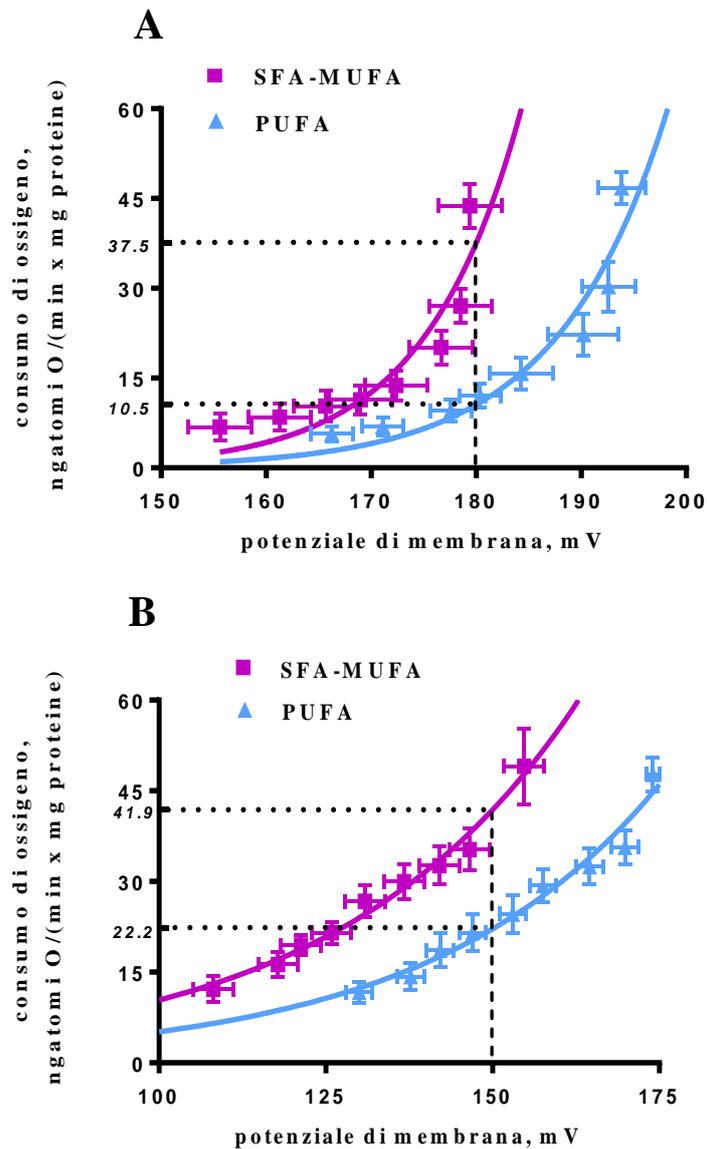
### ***Efficienza energetica mitocondriale***

I mitocondri di fegato di ratti PUFA mostrano una diminuzione significativa sia della conduttanza protonica basale sia di quella indotta da acidi grassi rispetto a ratti SFA-MUFA (Figura 6 A, B). Infatti, allo stesso valore del potenziale di membrana (180 mV per la conduttanza protonica basale) l'ossigeno utilizzato per bilanciare la perdita protonica (SFA-MUFA=  $37.5 \pm 2.1$ ; PUFA=  $10.5 \pm 0.9$  ngatoms ossigeno/(min x mg di proteine), è significativamente più elevato nei ratti SFA-MUFA rispetto ai ratti PUFA.

Analogamente, allo stesso potenziale di membrana (150mV per la conduttanza protonica indotta da acidi grassi), l'ossigeno consumato per bilanciare la perdita protonica (SFA-MUFA=  $41.9 \pm 2.2$ ; PUFA=  $22.2 \pm 1,1$  ngatoms ossigeno/(min x mg di proteine), è significativamente più elevato nei ratti SFA-MUFA rispetto ai ratti PUFA.

**Figura 6**

Conduttanza protonica basale (A) e indotta dagli acidi grassi (B) in mitocondri di fegato isolati da ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



I valori sono espressi come ng atomi di ossigeno/(min x mg di proteine) e sono riportati come medie con i relativi errori standard. Il numero di ratti è  $n = 8$ . L'analisi di regressione non lineare mostra che le curve ottenute per i ratti SFA-MUFA sono significativamente differenti da quelle dei ratti PUFA ( $*P < 0.05$ ).

### ***Stato ossidativo mitocondriale***

Lo stato ossidativo mitocondriale è stato valutato tenendo conto del danno ossidativo ai lipidi, attraverso la determinazione della perossidazione lipidica, del danno ossidativo alle proteine tramite la determinazione dell'attività dell'enzima aconitasi e delle difese antiossidanti tramite la determinazione dell'attività dell'enzima SOD. Dai risultati riportati nella Tabella 7 si evince che la perossidazione lipidica è significativamente più elevata nei mitocondri dei ratti PUFA rispetto ai SFA-MUFA, mentre l'attività della SOD e dell'aconitasi non variano significativamente tra i due gruppi di ratti.

**Tabella 7**

*Stato ossidativo in mitocondri di fegato isolati da ratti alimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
Aconitasi attiva, mU/mg di proteine	3.9±0.2	3.9±0.1
Aconitasi totale, mU/mg di proteine	10.9±0.4	11.2±0.3
Rapporto aconitasi attiva/totale	0.36±0.02	0.35±0.02
Perossidazione lipidica TBARS/mg di proteine	0.25±0.01	0.35±0.01*
SOD, U/mg di proteine	81.7±6.0	87.1±7.1

*I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8. \*p<0.05, rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.*

## *Secondo disegno sperimentale*

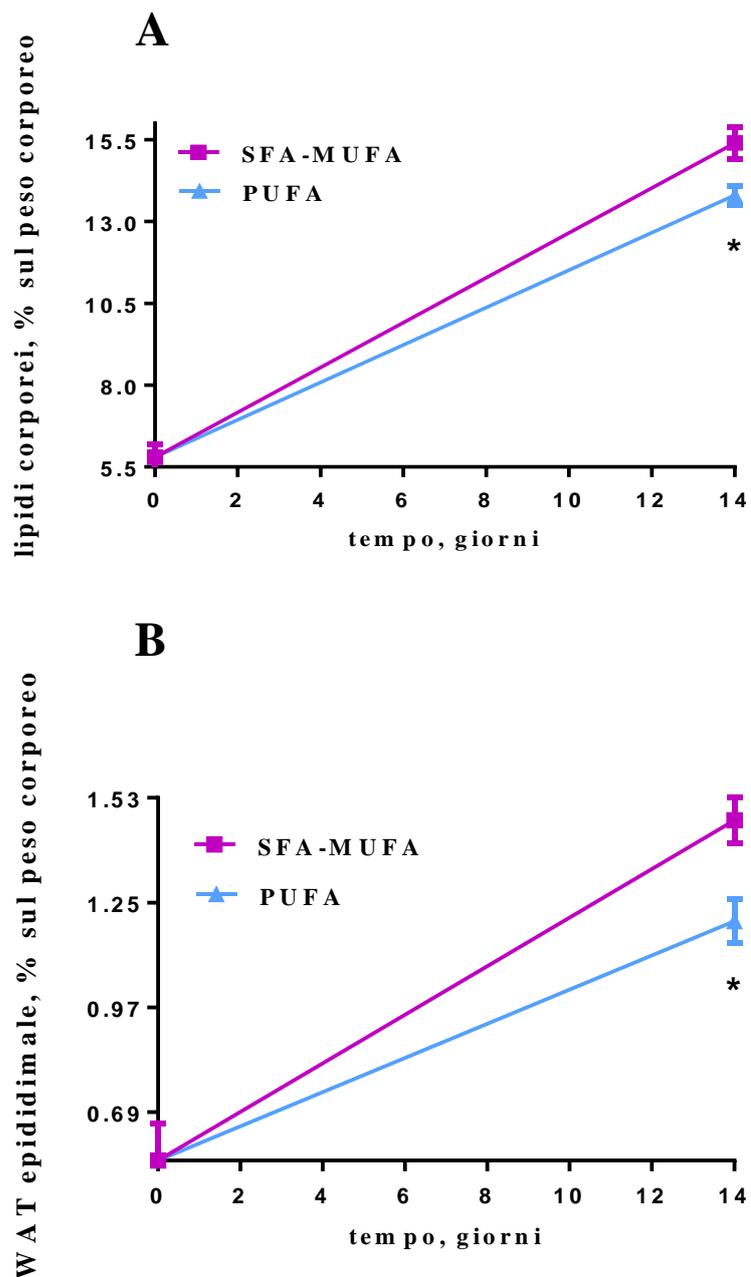
### *Bilancio energetico e composizione corporea*

Dopo due settimane di rialimentazione isocalorica iperlipidica, anche nei ratti del secondo disegno sperimentale è evidente lo sviluppo dell'obesità in entrambi i gruppi. Infatti la percentuale dei lipidi corporei è significativamente incrementata in entrambi rispetto al valore iniziale, pur se nei ratti PUFA il valore finale è risultato significativamente inferiore rispetto al gruppo SFA-MUFA (Figura 7 A). Inoltre, i ratti PUFA mostrano minore livelli di tessuto adiposo epididimale e maggiori quantità di i-BAT ed il contenuto di UCP-1 è aumentato nei ratti PUFA rispetto ai ratti rialimentati con una dieta ricca in SFA-MUFA. (Figura 7B. Figura 8 A,B,C) Infine, la percentuale di proteine corporee risulta più bassa nel gruppo SFA-MUFA rispetto a quello PUFA, indicano che anche in questo gruppo di ratti, la dieta ricca in acidi grassi polinsaturi tende a ridurre la deplezione proteica, preservando la massa magra (Figura 9). Le condizioni riportate si erano riscontrate anche negli animali del primo disegno sperimentale. La diversa composizione corporea finale rappresenta anche in questo caso, il risultato di un accumulo differente di lipidi e proteine verificatosi durante il periodo delle 2 settimane di dieta effettuate. In particolare nei ratti SFA-MUFA i lipidi introdotti in eccesso e che non vengono ossidati si depositano a livello corporeo, aumentando in tal modo l'effetto obesogenico della dieta a base di lardo. Invece i ratti rialimentati con diete arricchite di PUFA immagazzinano meno energia sotto forma di lipidi corporei favorendo la deposizione proteica, pertanto l'assunzione di PUFA è in grado di attenuare l'effetto obesogenico della dieta iperlipidica.

Dall'analisi delle componenti del bilancio energetico, i cui dati sono riportati in tabella 8, appare chiaro che, l'energia metabolizzabile introdotta risulta la stessa nei due gruppi sperimentali, a conferma della rialimentazione isocalorica correttamente effettuata. Per quanto riguarda la spesa energetica, cioè quella parte di energia metabolizzabile introdotta

che viene utilizzata e non depositata, essa risulta aumentata nei ratti PUFA rispetto ai ratti SFA-MUFA anche se l'aumento non è significativo. Inoltre, i ratti rialimentati con una dieta arricchita in PUFA rispetto ad una dieta ricca in SFA-MUFA, presentano un minor guadagno lipidico mentre il guadagno proteico risulta incrementato.

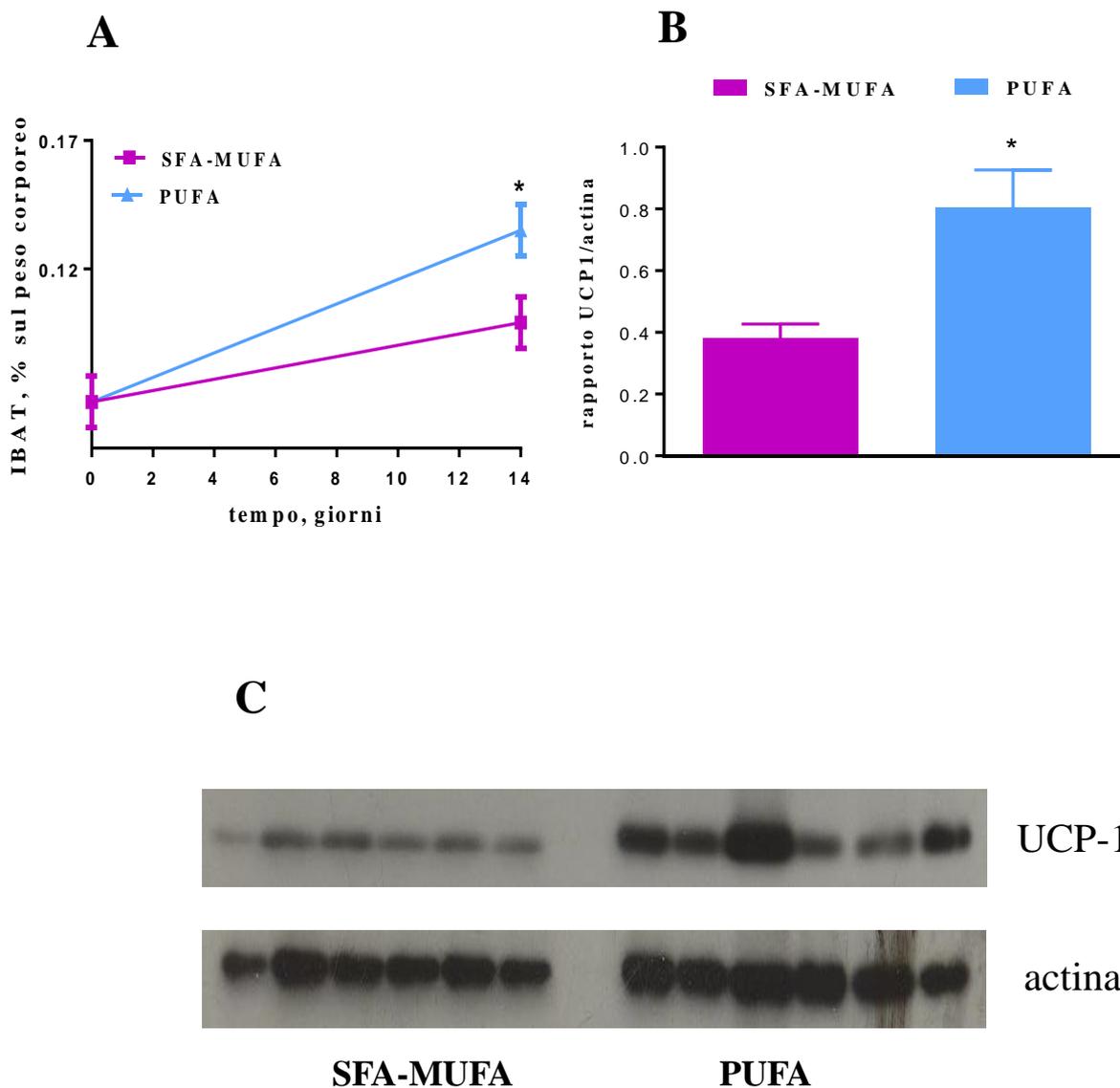
**Figura 7.** Massa grassa corporea: Lipidi corporei (A); Tessuto adiposo bianco epididimale (B), al giorno 0 e dopo 14 giorni dall'inizio dell'esperimento in ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.

\*p<0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.

**Figura 8.** (A) Tessuto adiposo bruno interscapolare al giorno 0 e dopo 14 giorno dall'inizio dell'esperimento; (B) rapporto e (C) Western blot UCP-1 actina, nel tessuto adiposo bruno interscapolare al giorno 14 dell'esperimento in ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).

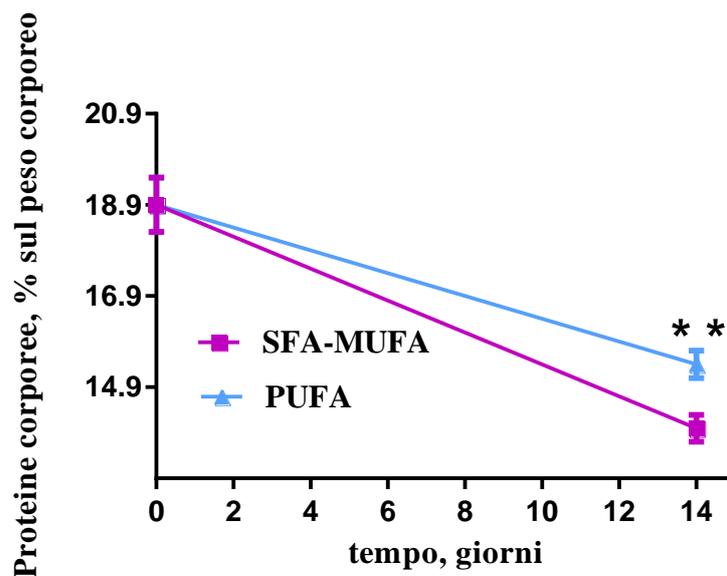


*I valori sono riportati come medie con i relativi errori standard.*

*Il numero di ratti è N = 6.*

*\*P < 0.01 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA*

**Figura 9.** Massa magra: Proteine corporee al giorno 0 e dopo 14 giorni dall'inizio dell'esperimento in ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.

\*\* $p < 0.01$  rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.

**Tabella 8**

*Composizione corporea e bilancio energetico in ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

<i>Bilancio energetico</i>	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
Peso corporeo finale, g	370±6	368±7
Aumento di peso corporeo, g	127±9	128±8
Tessuto adiposo viscerale, g/100 g	0.12±0.01	0.08±0.01*
Energia metabolizzabile introdotta, kJ	5354±76	5325±119
Guadagno lipidico, kJ	1633±98	1362±53*
Guadagno proteico, kJ	255±12	353±13**
Spesa energetica, kJ	3466±102	3610±80

*I valori sono riportati come medie con i relativi errori standard. Il numero di ratti è N= 8.*

*\* P<0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA. \*\*P<0.01 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.*

### *Ossidazione dei nutrienti*

La stima dei nutrienti ossidati ha dimostrato che, rispetto ai ratti rialimentati con una dieta ricca in SFA-MUFA, i ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA per il proprio sostentamento energetico, fanno un utilizzo maggiore di lipidi ed uno inferiore di proteine, come era accaduto nel primo disegno sperimentale, ma, diversamente dal primo gruppo fanno un utilizzo elevato anche di carboidrati. (Figura 10). L'analisi della calorimetria indiretta ha rilevato delle differenze nell'ossidazione dei substrati tra i 2 gruppi di ratti. In particolare, i risultati mostrano che i ratti alimentati con la dieta ricca in PUFA manifestano valori di NPRQ più elevati rispetto a quelli alimentati con una dieta ricca in SFA-MUFA, nonostante i valori di RQ siano paragonabili (Tabella 9). Dunque, per produrre energia, i primi ossidano più carboidrati e meno grassi.

**Tabella 9**

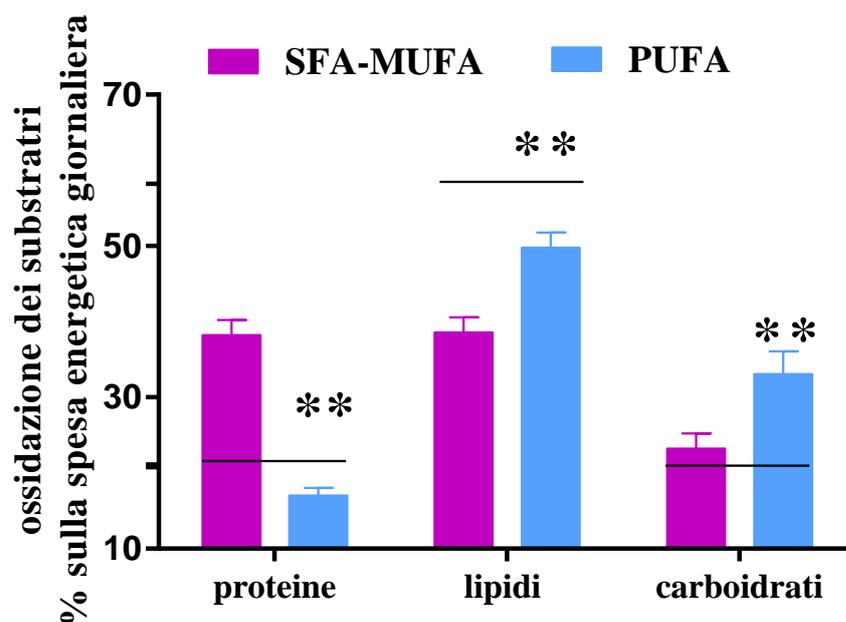
*Bilancio dei substrati in ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-  
monoinsaturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
NPRQ	0.79±0.01	0.83±0.01*
RQ	0.79±0.01	0.78±0.01

*I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.*

*\*p<0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.*

**Figura 10.** Contributo % di lipidi, proteine e carboidrati sulla spesa energetica giornaliera in ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



*I valori sono riportati come media con i relativi errori standard. Il numero di ratti è n=8.*

*\*\*p<0.01 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA. Le linee orizzontali indicano la % di ciascun macronutriente nella dieta (carboidrati = 20,7 %, proteine = 21,1 %, lipidi = 58,2 %).*

### ***Parametri plasmatici***

I ratti rialimentati con la dieta ricca in PUFA, mostrano sia a digiuno che dopo somministrazione di cibo, livelli più bassi di insulina plasmatica e dell'indice HOMA. A tale dato si aggiungono ridotti livelli plasmatici di trigliceridi e colesterolo, riscontrati in questo stesso gruppo di ratti, rispetto al gruppo rialimentato con la dieta ricca in SFA-MUFA (Tabella 10). L'analisi della perossidazione lipidica plasmatica non ha riscontrato differenze significative tra i due gruppi di ratti, mentre una diminuzione significativa dell'attività dell'enzima ALT è stata ritrovata nei ratti rialimentati con la dieta ricca in PUFA rispetto a quelli rialimentati con la dieta ricca in SFA-PUFA (Tabella 10).

**Tabella 10**

*Parametri plasmatici in ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-  
monoinsaturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

<i>Parametri plasmatici</i>	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
Glicemia a digiuno, mg/dl	115.6±3.0	124.1±2.8
Insulina a digiuno, mU/l	14.2±0.5	9.8±1.1*
Indice HOMA	4.0±0.1	3.0±0.1*
Glicemia postprandiale, mg/dl	343±20	358±22
Insulina postprandiale, mU/l	89±4	56±2*
Insulina postprandiale/insulina digiuno	6.3±0.2	5.6±0.2*
Acidi grassi non esterificati, mmol/l	1.9±0.2	1.8±0.2
Trigliceridi, mg/dl	275±21	185±13*
Colesterolo, mg/dl	142±6	122±5*
Perossidazione lipidica, nmol TBARS/ml	14.3±15.8	15.8±1.4
ALT, U/L	13.9±1.0	9.4±1.0*

*I valori sono riportati come medie con i relativi errori standard. Il numero di ratti è N = 8.*

*\*P < 0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA. \*\*P < 0.01 rispetto al gruppo di ratti*

*SFA-MUFA.*

*Indice HOMA = (glucosio (mg/dl) x insulina (mU/L))/405.*

### ***Composizione lipidica e danno ossidativo in fegato e muscolo scheletrico***

In tabella 11 sono riportati i valori relativi al contenuto dei trigliceridi nel fegato e nel muscolo scheletrico. In particolare, mentre nel tessuto epatico il dato relativo è risultato maggiore nei ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA rispetto al gruppo di ratti rialimentati con la dieta ricca in SFA-MUFA, non è stato possibile osservare alcuna variazione significativa nel muscolo scheletrico. Inoltre, la perossidazione lipidica a livello epatico risulta significativamente più bassa nei ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA, mentre, anche in questo caso, nessuna variazione è stata ritrovata nel muscolo scheletrico.

Nessuna variazione significativa è stata trovata nel contenuto di glicogeno, sia nel fegato che nel muscolo. (Tabella 11).

**Tabella 11**

*Composizione del fegato e del muscolo scheletrico in ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
<i>Fegato</i>		
Trigliceridi, mg/g	24.2±1.8	40.5±2.8**
Perossidazione lipidica, nmol TBARS/g	92±5	64±3**
Glicogeno, mg/g	40±2	38±2
<i>Muscolo scheletrico</i>		
Trigliceridi, mg/g	3.0±0.1	2.7±0.1
Perossidazione lipidica, nmol TBARS/g	42±2	45±3
Glicogeno, mg/g	58±3	56±4

*I valori sono riportati come medie con i relativi errori standard.*

*Il numero di ratti è N = 8.*

*\*P < 0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA. \*\*P < 0.01 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.*

### ***Capacità respiratoria mitocondriale***

I risultati relativi alla capacità respiratoria, analizzata sui mitocondri isolati da ratti rialimentati con le due differenti diete iperlipidiche, indicano che né per quanto concerne il fegato né per il muscolo scheletrico, si verificano delle differenze significative nei due gruppi di ratti, dopo il trattamento dietetico (Tabella 12).

**Tabella 12**

*Consumo di ossigeno nei mitocondri di fegato e muscolo scheletrico isolati da ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monounsaturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

<i>Capacità respiratoria</i>	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
<i>Fegato</i>		
Glutammato + Malato	100±7	126±6
Palmitoil-carnitina+ Malato	97±7	112±7
Succinato+Rotenone	171±11	194±10
<i>Muscolo scheletrico</i>		
Glutammato + Malato	742±43	729±33
Palmitoil-carnitina+ Malato	337±43	374±45
Succinato+Rotenone	723±23	657±20

*I valori sono espressi come ng atomi di ossigeno/(min x mg di proteine) e riportati come medie con i relativi errori standard. Il numero di ratti è N=8 ratti.*

### ***Stato ossidativo dei mitocondri epatici e del muscolo scheletrico***

Lo stato ossidativo mitocondriale è stato valutato mediante l'analisi del danno ossidativo ai lipidi, attraverso la determinazione della perossidazione lipidica e alle proteine attraverso la determinazione dell'attività dell'enzima aconitasi, mentre la difesa antiossidante, attraverso la determinazione dell'attività della SOD. I risultati mostrano che non vi è alcuna differenza significativa, relativa sia al danno ai lipidi che alle proteine, sia nei ratti PUFA che nei ratti SFA-MUFA, e ciò in entrambe le popolazioni mitocondriali prese in esame. Di contro, l'attività della SOD è significativamente maggiore nel fegato dei ratti PUFA rispetto ai ratti SFA-MUFA, mentre non è stato possibile riscontrare differenze significative nel muscolo scheletrico. (Tabella 13).

**Tabella 13**

*Stato ossidativo nei mitocondri di fegato e muscolo isolati da ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).*

	<i>SFA-MUFA</i>	<i>PUFA</i>
<b><i>Mitocondri epatici</i></b>		
Aconitasi attiva, mU/mg di proteine	4.4±0.4	5.3±0.5
Aconitasi totale, mU/mg di proteine	11.2±0.3	11.0±0.6
Rapporto aconitasi attiva/totale	0.40±0.04	0.48±0.03
Perossidazione lipidica TBARS/mg di proteine	0.32±0.01	0.31±0.01
SOD, U/mg di proteine	78±7	100±7*
<b><i>Mitocondri muscolo scheletrico</i></b>		
Aconitasi attiva, mU/mg di proteine	15.3±1.1	18.9±1.1*
Aconitasi totale, mU/mg di proteine	32.8±1.8	40.6±1.5**
Rapporto aconitasi attiva/totale	0.47±0.029	0.47±0.018
Perossidazione lipidica TBARS/mg di proteine	3.4±0.1	3.6±0.2
SOD, U/mg di proteine	137±8	135±6

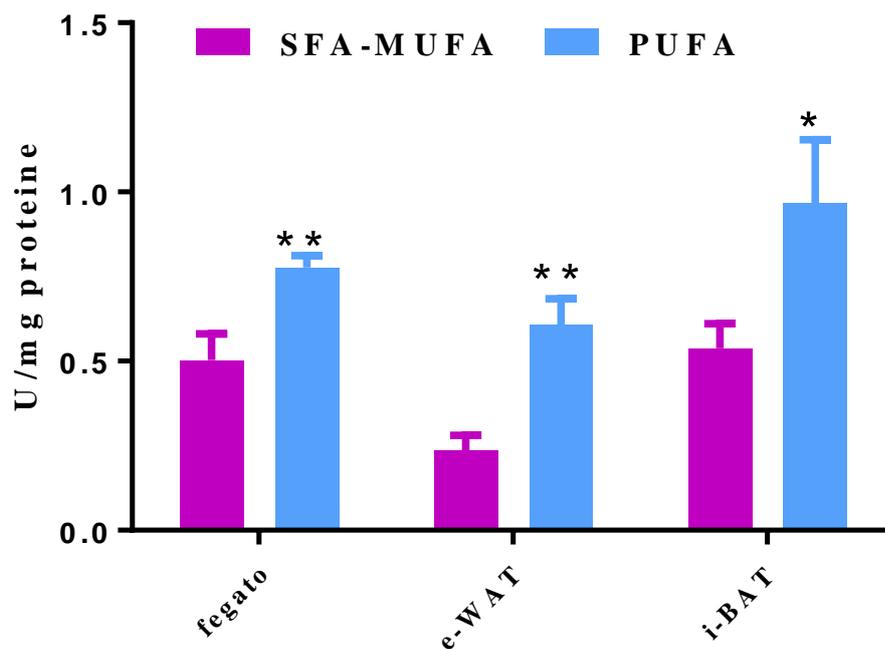
*I valori sono riportati come medie con i relativi errori standard. Il numero di ratti è N=8.*

*\*P < 0.05 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA, \*\*P < 0.01 rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA.*

### ***Attività dell'enzima FAS in fegato, e-WAT e i-BAT***

In figura 11 è riportata l'attività della FAS, il principale enzima coinvolto nel pathway metabolico della lipogenesi- de novo, analizzata nel fegato, nell'e-WAT e nell' i-BAT. In particolare, in tutti e tre i tessuti, (fegato, +50%,  $p < 0.01$ , e-WAT  $> 2$ ,  $p < 0.01$ , and i-BAT (approssimativamente 2,  $p < 0.05$ ) la FAS risulta significativamente più elevata nei ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA rispetto a quelli rialimentati con la dieta SFA-MUFA.

**Figura 11.** Attività dell'acido grasso sintasi nel fegato, e-WAT e i-BAT in ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



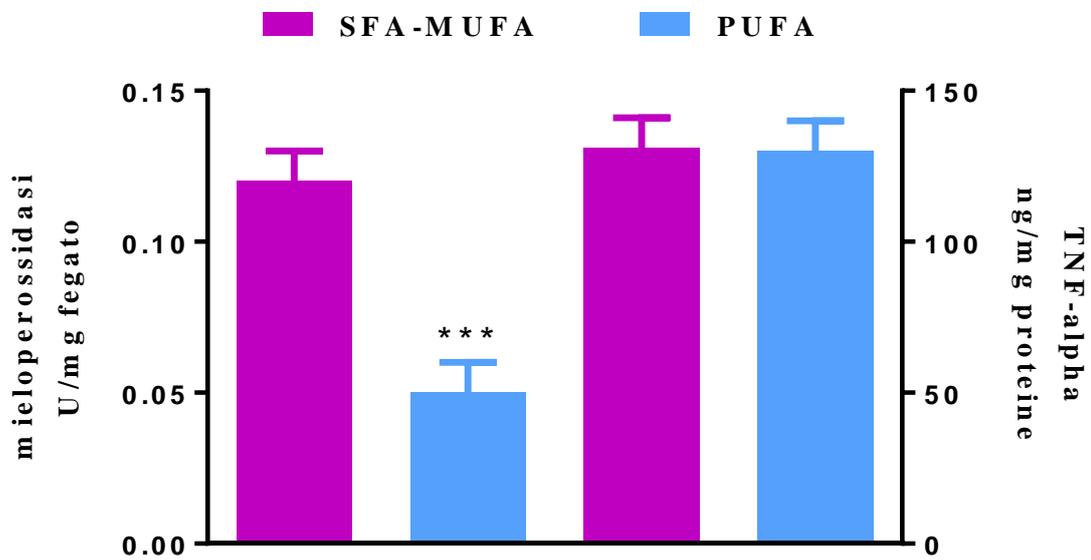
I valori sono riportati come medie con i relativi errori standard. Il numero di ratti è  $N = 8$ .

\* $P < 0.05$  rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA. \*\* $P < 0.01$  rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA

### ***Markers infiammatori epatici***

Il grado di infiammazione epatica è stato valutato misurando l'attività della mieloperossidasi MPO, un enzima prodotto dai leucociti, la cui attività è direttamente proporzionale al livello di infiltrazione dei neutrofili nei tessuti e rappresenta, assieme al TNF- $\alpha$ , una citochina proinfiammatoria, un indice di risposta infiammatoria in condizioni patologiche (Villegas et al. 2003). In particolare, i risultati ottenuti indicano che l'attività della MPO è significativamente più bassa (~60 %,  $p < 0.001$ ) nei ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA rispetto a quelli rialimentati con una ricca in SFA-MUFA, mentre non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nel contenuto epatico di TNF- $\alpha$ . (Figura 12)

**Figura 12.** Attività della mieloperossidasi e contenuto di TNF- $\alpha$  nel fegato di ratti rialimentati con diete ricche di acidi grassi saturi-monoin saturi (SFA-MUFA) o polinsaturi (PUFA).



I valori sono riportati come medie con i relativi errori standard. Il numero di ratti è  $N = 8$ . \*\*\* $P < 0.001$  rispetto al gruppo di ratti SFA-MUFA

## *Discussione*

L'obesità è una condizione di squilibrio tra l'assunzione di energia e l'ossidazione di nutrienti. Infatti, è stato ampiamente dimostrato che essa insorge quando l'apporto energetico supera il dispendio, ma il grado in cui si sviluppa dipende anche dalla capacità di modificare la miscela di substrati ossidati in risposta ai cambiamenti nella composizione dietetica (Galgani and Ravussin 2008). In questo contesto, la flessibilità metabolica è definita come la capacità del corpo o delle cellule di far corrispondere l'ossidazione dei substrati alla loro disponibilità, ed è normalmente valutata analizzando l'adattamento di questi in risposta a cambiamenti isoenergetici nella composizione della dieta (Galgani and Ravussin, 2008; Galgani et al. 2008). Infatti, quando la composizione dei macronutrienti della dieta viene modificata, la stessa necessita di essere modulata per raggiungere un nuovo equilibrio (Galgani et al. 2008). La velocità con cui si realizza tale regolazione è maggiore nella transizione da una dieta a basso contenuto di carboidrati ad una ad alto contenuto; tuttavia, in risposta ad un aumento del contenuto di lipidi, l'ossidazione dei grassi può impiegare più di una settimana per bilanciarne l'introito (Galgani and Ravussin 2008; Galgani et al. 2008). Pertanto, valutarne l'impatto in un contesto di variazioni qualitative e non energetiche della dieta, come nel caso del mio studio, potrebbe essere un importante parametro da considerare. Inoltre, questo diventa ulteriormente importante quando, dopo un periodo di dimagrimento, volontario o dovuto a condizioni patologiche, si rende necessario il recupero del peso corporeo, in modo preponderante quando la rialimentazione deve essere condotta con cibi ad elevata densità energetica. Infatti, da studi epidemiologici è stato dimostrato che, dopo un periodo di ridotto introito calorico, il recupero del peso corporeo è accompagnato da un guadagno di grasso più veloce rispetto a quello proteico, predisponendo pertanto l'organismo alla ricaduta verso l'obesità dopo dimagrimento terapeutico e ad un eccessivo accumulo di grasso durante il recupero della crescita, in particolare durante la riabilitazione nutrizionale con cibi ad alta densità

energetica. Ciò che si verifica in seguito alla deplezione delle riserve adipose, è l'attivazione di risposte adattative in grado di sopprimere una componente della termogenesi inducendo quindi una riduzione della spesa energetica.

In questo contesto, individuare degli approcci nutrizionali che possano rendere ottimale la ripartizione dell'energia depositata a livello corporeo, soprattutto durante il recupero della crescita in seguito a restrizione calorica e comprendere la capacità dell'organismo di modificare la miscela di substrati ossidati in risposta ai cambiamenti nella composizione dietetica, diventa fondamentale.

In questo lavoro ho dimostrato che tale regolazione dipende anche dal tipo di grasso contenuto nella dieta iperlipidica. Infatti, quando la dieta è ricca di acidi grassi insaturi (miscela di olio di cartamo e olio di semi di lino, ratti PUFA) l'equilibrio tra la miscela di substrati ingeriti e quelli ossidati si ottiene già dopo due settimane, mentre con la dieta ricca di grassi saturi (lardo, ratti SFA-MUFA) questo periodo non è sufficiente per il raggiungimento dell'equilibrio. Di conseguenza, nei ratti SFA-MUFA la velocità di ossidazione dei lipidi è inferiore rispetto alla loro assunzione. Questo squilibrio ha due conseguenze metaboliche: il primo è che nei ratti SFA-MUFA i lipidi introdotti in eccesso che non vengono ossidati si depositano come grasso corporeo, aumentando in tal modo l'effetto obesogeno della dieta iperlipidica a base di grassi di origine animale, mentre il secondo è che la ridotta ossidazione dei lipidi, sempre in questo gruppo di ratti, è bilanciata in termini di calorie aumentando l'ossidazione delle proteine, in modo che la massa proteica corporea risulti diminuita. Queste due conseguenze metaboliche sono molto dannose per la salute, dal momento che un aumento dei depositi di grasso corporeo, soprattutto in sede viscerale, può indurre lo sviluppo di alcune patologie metaboliche (resistenza all'insulina, ridotta tolleranza glucidica, ipertensione), mentre la diminuzione della massa proteica corporea induce una riduzione del metabolismo corporeo, aggravando

così l'effetto obesogeno di una dieta ricca di grassi. Sia gli acidi grassi saturi che monoinsaturi, preponderanti nella dieta iperlipidica a base di lardo, possono contribuire a tali alterazioni metaboliche. A tal proposito, è stato dimostrato che anche l'acido oleico è un acido grasso particolarmente obesogeno (Buettner et al. 2006). Questi disturbi metabolici sono in parte evitati con la dieta iperlipidica ricca di acidi grassi polinsaturi, poiché l'equilibrio tra grassi ingeriti e ossidati attenua non solo l'insorgenza dell'obesità, ma permette anche il mantenimento delle proteine corporee.

L'effetto benefico riscontrato sul bilancio corporeo si evidenzia già nel primo disegno sperimentale, confermando dunque l'importanza rivestita dalla qualità dei lipidi introdotti con la dieta, anche nella normale alimentazione.

Questi risultati mi hanno spinto ad individuare un sito cellulare che potesse spiegare il minore potenziale obesogeno nella dieta iperlipidica ricca in acidi grassi polinsaturi. Pertanto, mi sono focalizzata sul BAT, un organo termogenico ben conosciuto, che permette ai roditori di sopravvivere al freddo e quindi contribuire alla termogenesi dieta-indotta (Wijers et al. 2009). Negli ultimi anni l'interesse dei ricercatori nei confronti del BAT si è rinnovato, a causa dell'osservazione che questo tessuto, atrofico nell'uomo adulto, potrebbe essere attivato e reso funzionante (Wijers et al. 2009).

In particolare, ho osservato che nei ratti PUFA è presente una maggiore quantità di BAT ed un contenuto significativamente maggiore di UCP-1, la proteina mitocondriale che permette la dissipazione dell'energia sotto forma di calore piuttosto che la produzione di ATP durante la fosforilazione ossidativa (Porter et al. 2014). Da ciò si può dedurre che un'alta presenza di acidi grassi insaturi nella dieta possa rappresentare uno stimolo proliferativo per la crescita del BAT, come per la sovra-regolazione dell'UCP-1 (Sadurskis et al. 1995). Inoltre, i PUFA sono dei forti ligandi per i recettori PPAR $\alpha$  e PPAR $\delta$  rispetto agli SFA-MUFA (Forman et al. 1997) e per di più, i suddetti recettori PPAR $\alpha$  (Villarroya

et al. 2007) e PPAR $\delta$  (Fürnsinn et al. 2007) controllano l'induzione del gene per UCP-1. Come conseguenza, il potenziale termogenico dell'organo è significativamente aumentato, ciò permette una più alta velocità di ossidazione lipidica che contribuisce al raggiungimento del bilancio lipidico. Quando tale meccanismo fallisce, come nel caso in cui la dieta sia ricca in grassi saturi, l'effetto obesogeno della dieta iperlipidica aumenta.

Un ulteriore effetto benefico della dieta PUFA, è emerso quando ho valutato l'omeostasi glicemica. Dai dati appare chiaro che i ratti sottoposti a due settimane di alimentazione con diete iperlipidiche ricche in SFA-MUFA o PUFA, mostrano un differente grado di resistenza all'insulina. Infatti, nei ratti PUFA ho riscontrato livelli significativamente più bassi sia di insulina circolante sia dell'indice HOMA. Poiché un aumento dell'indice HOMA riflette una diminuzione della sensibilità delle cellule bersaglio all'insulina, i ratti PUFA rispondono maggiormente all'insulina e quindi esibiscono una migliore tolleranza al glucosio e sono, così, più protetti dall'effetto diabetogeno delle diete iperlipidiche. Questo dato è in accordo con quelli riscontrati in altri studi in cui era emerso che, in seguito a somministrazione di una dieta ricca in PUFA, migliorava la sensibilità all'insulina sia sistemica che relativa al muscolo scheletrico (Cavaliere et al. 2016).

Con sorpresa però, quando ho rivolto l'attenzione al fegato, un organo chiave del metabolismo, non ho riscontrato gli stessi effetti benefici osservati a livello del bilancio energetico con la dieta ricca di grassi insaturi, sia per quanto concerne il profilo metabolico sia a livello ematico che in termini di composizione. Infatti, sebbene il livello di colesterolo nel sangue risulti minore nei ratti PUFA, lo stress ossidativo sistemico aumenta significativamente. Inoltre, a livello epatico si osserva una significativa diminuzione dell'acqua, evidente indice di accumulo di grasso in situ. In più, il fatto che il fegato sia stato colpito negativamente dalla dieta ricca di grassi insaturi, è anche confermato dai segni di steatosi, osservata in tale organo nei ratti PUFA al momento del prelievo. Questa

condizione è ulteriormente confermata dall'aumento dei depositi lipidici sia in forma totale che in forma di trigliceridi e colesterolo. Tali lipidi sono poi anche maggiormente soggetti a stress ossidativo, visto l'incremento della perossidazione lipidica, risultato non sorprendente, ed attribuibile alla maggiore suscettibilità all'ossidazione da parte dei ROS degli acidi grassi insaturi. Da ciò si evince che, durante una normale alimentazione effettuata con diete iperlipidiche, come nel caso del mio primo disegno sperimentale, il fegato non sia in grado di gestire l'elevato flusso di acidi grassi insaturi: probabilmente la secrezione di VLDL è meno efficiente con gli acidi grassi insaturi rispetto ai saturi e, come conseguenza, più lipidi si depositano nelle cellule epatiche. A questa condizione già di per sé negativa si aggiunge un'aumentata presenza di ALT plasmatico, noto indice di danno epatico. Inoltre, a causa della loro elevata attività metabolica, le cellule epatiche sono ricche di mitocondri e cambiamenti nella funzione mitocondriale potrebbero esercitare un grande effetto sull'attività metabolica del fegato. Questo aspetto è rilevante, dal momento che gli acidi grassi insaturi sono più inclini al danno ossidativo e i mitocondri sono il sito cellulare principale in cui si producono ROS. In accordo con questo, i risultati ottenuti hanno indicato un maggior grado di danno ossidativo alla componente lipidica dei mitocondri, infatti la perossidazione lipidica aumenta nei mitocondri dei ratti PUFA. Nei mitocondri, la produzione di ROS deriva dai componenti ridotti della catena respiratoria, dai quali gli elettroni vengono rilasciati e reagiscono con l'ossigeno molecolare, dando origine al radicale superossido. Ne consegue che, maggiore è il grado di riduzione dei complessi della catena respiratoria, maggiore è la produzione di ROS. Inoltre, è stabilito che esiste una forte correlazione positiva tra il potenziale di membrana e la produzione di ROS (Miwa and Brand, 2003; Jastroch et al. 2010). In letteratura è stato infatti riportato che, ad elevati valori del potenziale di membrana, anche un piccolo aumento del potenziale è in grado di causare una grande stimolazione della produzione di ROS (Miwa et al. 2003;

Jastroch et al. 2010). Analogamente, solo una piccola diminuzione del potenziale è in grado di inibire la produzione di ROS, esercitando pertanto un effetto antiossidante naturale. In questo contesto, le due vie di conduttanza protonica esistenti nei mitocondri, ovvero quella basale e quella indotta dagli acidi grassi, certamente svolgono un ruolo centrale nel controllo della produzione di ROS. Pertanto, visti i risultati ottenuti sul fegato, ho valutato entrambe le componenti della conduttanza protonica nei mitocondri epatici. In effetti, la diminuzione osservata nei ratti PUFA è in accordo con l'aumento del danno ossidativo stimato in questi organelli. Inoltre, lo stato 3 della respirazione è significativamente maggiore nei mitocondri di fegato di ratti PUFA, per cui l'aumento dell'attività della catena respiratoria mitocondriale, accoppiato con una ridotta permeabilità della membrana interna possono rappresentare i due fattori principali che contribuiscono ad un aumento della produzione di ROS. In questo contesto, le modificazioni nella composizione degli acidi grassi delle membrane mitocondriali, derivanti dalle diverse fonti lipidiche della dieta, potrebbero spiegare le variazioni del danno ossidativo e della conduttanza protonica. In particolare, il passaggio da acidi grassi monoinsaturi ad acidi grassi polinsaturi potrebbe essere alla base del maggior danno ossidativo osservato nei mitocondri dei ratti PUFA. Le vie di conduttanza protonica sono importanti determinanti del grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale e della quantità di substrati che questi organelli bruciano quando producono l'ATP necessario per supportare il turnover di ATP. Infatti, l'idrolisi dell'ATP ne determina la velocità di sintesi, ma il grado di accoppiamento dei mitocondri, a sua volta, determina quanti substrati energetici sono necessari per ottenere una certa quantità di ATP. Se i mitocondri sono più accoppiati, meno energia proveniente dai nutrienti viene persa come calore durante la fosforilazione ossidativa e meno substrati sono necessari per ottenere una certa quantità di ATP, in modo che meno substrati ossidati e più lipidi sono depositati come grasso ectopico. Pertanto, la

ridotta conduttanza protonica e il conseguente maggiore accoppiamento dei mitocondri di fegato dei ratti PUFA potrebbero spiegare il maggior grado di steatosi osservato in questi ratti. È stato dimostrato che le vie di conduttanza protonica sono incrementate nel muscolo scheletrico con la dieta ricca in PUFA (Cavaliere et al. 2016). Appare quindi che l'effetto della dieta ricca in PUFA sulla conduttanza protonica mitocondriale differisce in base al tessuto interessato.

Il secondo disegno sperimentale è stato progettato al fine di individuare una strategia nutrizionale mirata a garantire un recupero di peso salutare, soprattutto nella riabilitazione nutrizionale, che segue un periodo di iponutrizione, dove si rende indispensabile l'utilizzo di diete iperlipidiche, perseguendo dunque l'obiettivo primario del mio progetto di dottorato. Visti anche i risultati positivi ottenuti nel primo disegno sperimentale, soprattutto per quanto concerne il bilancio energetico, ho ritenuto opportuno ripetere le medesime analisi condotte, ampliando tuttavia i risultati e conducendo ulteriori indagini soprattutto sul fegato e sul muscolo scheletrico, organi chiave del metabolismo e di fondamentale importanza nel fenomeno di recupero di peso corporeo e insorgenza dei disordini metabolici ad esso associati. In particolare, nel secondo disegno sperimentale, dove ho adottato un protocollo di restrizione-rialimentazione, ho fornito evidenze che mi hanno permesso di dimostrare che, durante il processo di recupero del peso corporeo, che è la fisiologica risposta dell'organismo ad un periodo di restrizione, nei ratti rialimentati con una dieta ad alto contenuto lipidico, la presenza dei PUFA impedisce l'accumulo di grasso corporeo, stimolando invece la deposizione di proteine e migliorando anche la lipogenesi de-novo nel fegato, nel e-WAT e nel i-BAT, comportando una migliore omeostasi del glucosio e aumentandone così l'utilizzo. Inoltre, i risultati ottenuti dal bilancio energetico e dalla composizione corporea indicano che i ratti rialimentati con una dieta arricchita in PUFA immagazzinano meno energia sotto forma di lipidi corporei a favore di una

maggior deposizione di proteine, nonostante il guadagno energetico sia lo stesso, dato già emerso dal primo disegno sperimentale e che contribuisce ulteriormente a rafforzare l'idea secondo la quale l'effetto obesogenico di una dieta ricca in PUFA sia ridotto. Probabilmente, le differenze riscontrate in termini di bilancio energetico nei due gruppi di ratti derivano da un bilancio di diversi substrati utilizzati. Per avere conferma di tale ipotesi ho valutato il parametro RQ, dato che mi fornisce una stima qualitativa e quantitativa dei nutrienti ossidati. Dall'analisi è emerso che nonostante presentino gli stessi valori di RQ, i ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA rispetto a quelli nutriti con una dieta ricca in SFA-MUFA dipendono meno dalle proteine e più dai carboidrati e dai lipidi per sostenere il loro dispendio energetico quotidiano. Inoltre, il bilancio dei substrati non proteici mi ha permesso di affermare che, per produrre energia, i ratti alimentati con una dieta ricca in PUFA ossidano più carboidrati e meno grassi, dato molto interessante che non si era riscontrato nel primo disegno sperimentale. Questo elevato livello ossidativo dei carboidrati, conferisce loro una maggiore capacità di sostenere l'omeostasi del glucosio, tesi supportata anche dai bassi livelli riscontrati, sia a digiuno che quando alimentati, di insulina nel plasma e dell'indice HOMA. Visto questo dato e poiché l'alto livello ossidativo del glucosio osservato nei ratti rialimentati con dieta ricca in PUFA riflette cambiamenti dei flussi metabolici di organi e tessuti che influenzano notevolmente l'equilibrio dei carboidrati ho ritenuto interessante esaminare il fegato, il muscolo scheletrico, il WAT e il BAT che, con meccanismi diversi, giocano un ruolo differente nell'omeostasi del glucosio (Rosen and Spiegelman, 2006; Stanford et al. 2013). Piuttosto, nel fegato e nel muscolo scheletrico, la capacità ossidativa mitocondriale è stata trovata invariata con la dieta PUFA, escludendo quindi la possibilità di un maggiore utilizzo del glucosio come fonte di energia da parte di questi organelli e visto anche che il contenuto di glicogeno di questi due tessuti è stato trovato invariato, escludendo dunque un incremento

nell'utilizzo di glucosio, ho rivolto l'attenzione ad altre vie metaboliche. In letteratura è riportato che nel fegato, così come nel WAT e nel BAT, una via alternativa di utilizzazione del glucosio è quella della lipogenesi de-novo. In particolare, da studi precedenti è stato dimostrato che questo pathway metabolico, nel fegato come anche nel WAT risulta aumentato quando i ratti sono rialimentati con una dieta a basso contenuto di grassi (Crescenzo et al. 2012). È stato quindi supposto che l'utilizzo del glucosio sia importante nel mantenimento dell'omeostasi glicemica, garantendo nel contempo una rapida ricostituzione delle riserve di grasso corporeo (Crescenzo et al. 2012). Diversamente, nei ratti rialimentati con una dieta SFA-MUFA la lipogenesi de-novo è notevolmente ridotta (Crescenzo et al. 2012), contribuendo probabilmente ad uno squilibrio dell'omeostasi del glucosio. Oltretutto, sembrerebbe che, quando viene utilizzata una dieta ad alto contenuto di grassi e ricca in PUFA per rialimentare i ratti, si verifichi un blocco dell'inibizione della via della lipogenesi de novo dato precedentemente osservato nei ratti rialimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi ma ricca di SFA-MUFA (Crescenzo et al. 2012; Marcelino et al 2013). Dunque, viste le premesse citate, ho ritenuto interessante valutare proprio la lipogenesi de novo, in particolare analizzando l'attività della FAS, un enzima limitante la velocità biosintetica di questa via, ed è direttamente coinvolto nella neo-sintesi degli acidi grassi a partire dal glucosio sia nel fegato che nel WAT e nel BAT. In tutti questi tessuti, ho riscontrato che l'attività dell'enzima era significativamente più alta nei ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA rispetto a quelli rialimentati con la dieta SFA-MUFA. Gli alti livelli di lipogenesi de novo in tutti e tre i tessuti potrebbe rappresentare un sistema rilevante per bilanciare il mantenimento dell'omeostasi glicemica. Inoltre, dal momento che i lipidi derivati da nuova sintesi implicano un dispendio energetico superiore rispetto a quelli derivati dalla dieta, l'incremento della lipogenesi de novo contribuisce a bruciare più calorie e limitare quindi la deposizione di grasso corporeo. In ogni caso, l'aumento della

lipogenesi de novo epatica osservata nei ratti rialimentati con la dieta ricca in PUFA potrebbe comportare una maggiore deposizione di trigliceridi in questo tessuto. Infatti, il fegato dei ratti nutriti con una dieta arricchita in PUFA ha mostrato un contenuto di trigliceridi simile a quello che avevo osservato nel primo disegno sperimentale (Crescenzo et al. 2012). L'accumulo di trigliceridi nel fegato sembra rappresenti il “primo colpo” per lo sviluppo e la progressione della steatosi epatica non alcolica (NAFLD). Tuttavia, è stato però anche suggerito che la capacità di sintetizzare trigliceridi potrebbe rappresentare un meccanismo di protezione, limitando quindi la progressione del danno epatico e della fibrosi (Choi and Diehl, 2008). Infatti, se la sintesi epatica dei trigliceridi viene inibita, gli acidi grassi liberi si accumulano nel fegato, portando ad un'induzione dei processi ossidativi degli acidi grassi che incrementa lo stress ossidativo ed il danno epatico (Choi and Diehl, 2008). Pertanto nel fegato la capacità di sintetizzare trigliceridi, potrebbe rappresentare un meccanismo protettivo in condizioni di eccesso di disponibilità degli acidi grassi. In accordo con queste osservazioni, ho riscontrato nel fegato dei ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA un minor stress ossidativo ed una minore necrosi, come si evince dai dati relativi alla perossidazione lipidica e all'attività dell'ALT. Dal momento però che questi risultati non si erano riscontrati nel primo disegno sperimentale, dove invece la situazione era opposta, ho ritenuto opportuno valutare altri parametri che mi fornissero ulteriori informazioni, considerando anche che l'ALT è un indice di danno aspecifico. Ho dunque misurato la MPO, la cui attività è direttamente proporzionale al livello di infiltrazione dei neutrofili nei tessuti ed il TNF- $\alpha$ , una citochina proinfiammatoria. Queste due molecole rappresentano un indice di risposta infiammatoria in condizioni patologiche (Villegas et al. 2003). In particolare, i risultati ottenuti hanno indicato che l'attività della MPO era significativamente più bassa nei ratti rialimentati con una dieta ricca in PUFA rispetto a quelli rialimentati con una ricca in SFA-MUFA, mentre

non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nel contenuto epatico di TNF- $\alpha$ .

Dal momento che anche dopo restrizione calorica, la successiva rialimentazione con la dieta PUFA ha mostrato risultati migliori, in termini di bilancio energetico, rispetto alla dieta SFA-MUFA, confermando i risultati già ottenuti nel primo disegno sperimentale, ho rivolto ancora una volta l'attenzione al BAT, visto il suo potenziale termogenico e pertanto ottimo candidato nel contribuire al ridotto effetto obesogenico della dieta PUFA. Inoltre poiché è acclarato che l'adipocita del tessuto adiposo bruno, la cui attivazione è controllata dal sistema nervoso simpatico, deve la sua capacità termogenica alla presenza della proteina UCP-1 ho analizzato anche i livelli d'espressione della stessa. Questa proteina mitocondriale è in grado di disaccoppiare la fosforilazione ossidativa dalla sintesi di ATP (Chechi et al. 2013) ed i suoi livelli d'espressione sono fisiologicamente incrementati dalla stimolazione adrenergica (Chechi et al. 2013). I risultati hanno mostrato un aumento dei suddetti livelli nel gruppo PUFA. Questo risultato supporta la tesi secondo la quale il minor incremento di grasso corporeo osservato nei ratti rialimentati con la dieta arricchita in PUFA, non solo è il risultato di una maggiore deposizione della massa magra, ma potrebbe essere anche attribuita ad una maggiore stimolazione termogenica del BAT. È possibile stimare che il minor accumulo di grasso osservato nei ratti nutriti con una dieta arricchita in PUFA, potrebbe essere imputabile per circa l'80% ad un aumento della deposizione della massa magra ed alla relativa spesa di stoccaggio, e per circa il 20% ad un aumento della termogenesi.

I risultati ottenuti rafforzano la tesi secondo la quale la qualità dei lipidi nella dieta è di fondamentale importanza e che, quando si rende necessario l'utilizzo di elevate percentuali di acidi grassi, come nella riabilitazione nutrizionale, prediligere quelli PUFA tende a minimizzare l'impatto negativo che una dieta iperlipidica potrebbe avere sull'organismo.

## **Conclusioni**

In questo lavoro ho dimostrato che, non solo la quantità, ma anche il tipo di grassi presenti nella dieta rappresentano un fattore obesogenico primario. Gli acidi grassi insaturi limitano lo sviluppo della massa grassa e preservano la massa magra, sia in un contesto di normale alimentazione sia in seguito ad un protocollo di restrizione-rialimentazione. Invece, il minore danno epatico riscontrato nella rialimentazione, sembrerebbe suggerire che, a differenza del normale regime dietetico, nella riabilitazione nutrizionale sia possibile utilizzare diete iperlipidiche ricche in acidi grassi insaturi senza incorrere in disturbi epatici, almeno in tempi brevi. Al contrario, nelle normali condizioni iperlipidiche, l'introduzione degli acidi grassi insaturi non è consigliabile, dati i deleteri effetti sul fegato. Pertanto posso concludere che, quando si prende in considerazione la composizione di diete ad alto contenuto di grassi per la riabilitazione nutrizionale, prediligere i PUFA, potrebbe aiutare a migliorare ad aumentare la deposizione di proteine e contemporaneamente mantenere l'omeostasi del glucosio, limitando così l'accumulo dei lipidi nel tessuto adiposo.

Questo studio potrà contribuire a chiarire come i meccanismi che regolano il rapido deposito di lipidi, durante il recupero di peso, possano conferire una maggiore sensibilità allo sviluppo di obesità e disturbi metabolici cronici, fattori di grande importanza clinica, poiché un recupero di peso salutare rappresenta un fondamentale tassello, necessario a ridurre l'insorgenza di patologie, soprattutto in bambini ed adolescenti, preservando quindi anche la salute dell'adulto. Inoltre, pone le basi per approcci futuri in cui, non solo potranno essere saggiati differenti rapporti di PUFA  $\Omega 3/\Omega 6$ , con il fine di comprendere quello ottimale, ma potrà essere esteso il periodo di trattamento dietetico in modo da comprendere anche gli effetti a lungo termine.

## *Bibliografia*

## *Bibliografia Citata*

- Ashworth A. (1969). Growth rates in children recovering from protein-calorie malnutrition. *Br J Nutr* 23, 835–845.
- Awad AB, Zepp EA. (1979). Alteration of rat adipose tissue lipolytic response to norepinephrine by dietary fatty acid manipulation. *Biochem Biophys Res Commun*; 86: 138-144.
- Aydin S, Aksoy A, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Kuloglu T, Citil C, Catak Z. (2014). Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*.;30:1–9.
- Barac-Nieto M, Spurr GB, Lotero H, Maksud MG, Dahners HW. (1979). Body composition during nutritional repletion of severely undernourished men. *Am J Clin Nutr* 32, 981–991.
- Barker DJ, Osmond C, Forsen TJ, Kajantie E, Eriksson JG. (2005). Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *N Engl J Med*; 353: 1802–1809.
- Barr HG, Mc Cracken KJ (1984). High efficiency of energy utilization in 'cafeteria'- and force-fed rats kept at 29 degrees. *Brit J Nutr* 51: 379-387.
- Benefice E, Garnier D, Simondon KB, Malina RM. (2001). Relationship between stunting in infancy and growth and fat distribution during adolescence in Senegalese girls. *Eur J Clin Nutr*; 55:50–58.
- Blaak E (2005). Metabolic fluxes in skeletal muscle in relation to obesity and insulin resistance. *Clin Endocrinol Metab*, 19: 391-403.
- 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, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, Ryan DH, York DA (2002). “The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation”. *J Nutr.* 132(9): 2488-2491.
- Bray GA, Smith SR, de Jonge L, de Jonge L, Xie H, Rood J, Martin CK, Most M, Brock C, Mancuso S, Redman LM. (2012). Effect of dietary protein content on weight gain, energy expenditure, and body composition during overeating: randomized controlled trial. *JAMA* 307:47–55.
- Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wredw CE, Kunz Schughart LA, Scholmerich J, Bollheimer LC (2006). “Defining High-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effect of different fat types”. *J Mol Endocrinol.* 36(3): 485-501.
- Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 15, 798–808.
- Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats, *Am. J. Physiol.* 295: E1269-E1276.
- Caggiula AW, Mustad VA. (1997). Effects of dietary fat and fatty acids on coronary artery disease risk and total and lipoprotein cholesterol concentrations: epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr;* 65: 1597S-1610S.
- Castilla-Serna L, Pe´rez-Ortiz B, Cravioto J. (1996). Patterns of muscle and fat mass repair during recovery from advanced infantile protein energy malnutrition. *Eur J Clin Nutr;* 50: 392–397.
- Cavaliere G, Trinchese G, Bergamo P, De Filippo C, Mattace Raso G, Gifuni G, Putti R, Moni BH, Berni Canani R, Meli R, Mollica MP. (2016). Polyunsaturated fatty acids attenuate diet induced obesity and insulin resistance, modulating mitochondrial respiratory uncoupling in rat skeletal muscle. *PLoS One.* 22;11(2)

- Celi FS, Le TN, Ni B. (2015). Physiology and relevance of human adaptive thermogenesis response. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 238–247.
- Cettour-Rose P, Samec S, Russell AP, Summermatter S, Mainieri D, Carrillo-Theander C, Montani JP, Seydoux J, Rohner-Jeanrenaud F, Dulloo AG (2005). Redistribution of glucose from skeletal muscle to adipose tissue during catch-up fat: A link between catch-up growth and later metabolic syndrome. *Diabetes* 54: 751–756.
- Chechi K, Carpentier AC, Richard, D. (2013). Understanding the brown adipocyte as a contributor to energy homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 408–420.
- Choi SS, Diehl AM. (2008). Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 295–300.
- Cianfarani S, Germani D, Branca F. (1999). Low birth weight and adult insulin resistance: the ‘catch-up growth’ hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 81: F71–F73.
- Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JP, Dulloo AG. (2003). A role for suppressed thermogenesis favouring catch-up fat in the pathophysiology of catch-up growth. *Diabetes* 52: 1090–1097.
- Crescenzo R, Lionetti L, Mollica MP, Ferraro M, D'Andrea E, Mainieri D, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S. (2006). Altered skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial compartment during catch-up fat after caloric restriction. *Diabetes*. 55(8):2286-2293.
- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Tsalouhidou S, Yepuri G, Mougios V, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S. (2012). Hepatic mitochondrial energetics during catch-up fat with high-fat diets rich in lard or safflower oil. *Obesity* 20, 1763–1772.
- De Andrade PB, Neff LA, Strosova MK, Arsenijevic D, Patthey-Vuadens O, Scapozza L, Montani JP, Ruegg UT, Dulloo AG, Dorchies OM. (2015). Caloric

restriction induces energy-sparing alterations in skeletal muscle contraction, fiber composition and local thyroid hormone metabolism that persist during catch-up fat upon refeeding. *Front Physiol.*;6:254.

- Debray C, Zarakovitch M, Ranson B, Jacquemin J, Robert J, Siraga M. (1946). Contribution to the study on the pathology of the deportees. *Seminaire Ho<sup>^</sup>pital de Paris* 22: 863–870.
- Dulloo AG, Girardier L. (1990). Adaptive changes in energy expenditure during refeeding following low calorie intake: evidence for a specific metabolic component favouring fat storage. *Am J Clin Nutr* 52: 415–420.
- Dulloo AG, Girardier L. (1992). Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse. *Metabolism* 41, pp 1336-1342.
- Dulloo AG, Girardier L. (1993 a). Adaptive role of energy expenditure in modulating body fat and protein deposition during catch-up growth after early undernutrition. *Am J clin Nutr*; 58: 614–621.
- Dulloo AG, Girardier L. (1993 b). 24 hour energy expenditure several months after weight loss in the underfed rat: evidence for a chronic increase in whole-body metabolic efficiency. *Int J Obes* 17,pp115-123.
- Dulloo AG, Mensi N, Seydoux J, Girardier L. (1995 a). Differential effects of high-fat diets varying in fatty acid composition on the efficiency of lean and fat tissue deposition during weight recovery after low food intake. *Metabolism* 44,: 273-279.
- Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L. (1995b). Dissociation of enhanced efficiency of fat deposition during weight recovery from sympathetic control of thermogenesis *Am J Physiol* 269, pp R365-369.

- Dulloo AG, Jacquet J, Girardier L. (1996). Autoregulation of body composition during weight recovery in humans : the Minnesota Experiment revisited. *Int J Obes*; 20: 393–405.
- Dulloo AG, Jacquet J, Girardier L. (1997). Poststarvation hyperphagia and body fat overshooting in humans: a role for feedback signals from lean and fat tissues. *Am J Clin Nutr*; 65: 717–723.
- Dulloo AG, Jacquet J. (1998). Adaptive reduction in basal metabolic rate in response to food deprivation in humans: a role for feedback signals from fat stores. *Am J Clin Nutr* 68: 599–606.
- Dulloo AG, Jacquet J. (2001). An adipose-specific control of thermogenesis in body weight regulation. *Int J Obes Rel Metab Disord* 25 (Suppl 5): S22–S29.
- Dulloo AG, Jacquet J, Montani JP. (2002). Pathways from weight fluctuations to metabolic diseases: focus on maladaptive thermogenesis during catch-up fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, Suppl. 2, S46–S57.
- Dulloo AG. (2005). A role for suppressed skeletal muscle thermogenesis in pathways from weight fluctuations to the insulin resistance syndrome. *Acta Physiol. Scand.* 184, 295–307.
- Dulloo AG, Jacquet J, Seydoux J, Montani JP. (2006). The thrifty ‘catch-up fat’ phenotype: its impact on insulin sensitivity during growth trajectories to obesity and metabolic syndrome. *International Journal of Obesity* 30, S23–S35.
- Dulloo AG, Jacquet J, Montani JP, Schutz Y. (2012). Adaptive thermogenesis in human body weight regulation: more of a concept than a measurable entity? *Obes Rev*;13(Suppl. 2):105–121.

- Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ. (1999). Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ*; 318:427–431.
- Estabrook RW. (1967). Ratio mitochondrial respiratory control and polarographic measurement of ADP. *J Meth Enzymol*; 10: 41-47.
- Even, PC, Mokhtarian A, Pele A, (1994). Practical aspects of indirect calorimetry in
- Fernandes MA, Custodo JB, Santos MS, Moreno AJ, Vicente JA. (2006). Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phoosphorylation protect rat mitohondria from oxidative stress. *Mitochondrion*,; 6: 176-185.
- Flohè L, Otting F. (1984). Superoxide dismutase assay. *Meth. Enzymol.* 105, 93-104.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*; 226: 497–510.
- Forman BM, Chen J, Evans RM. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors and . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94,4312–4317.
- Foster GD, Wadden TA, Kendrick ZV, Letizia KA, Lander DP, Connill AM. (1995). The energy cost of walking before and after significant weight loss. *Med Sci Sports Exerc*; 27: 888–894.
- Fürnsinn C, Willson TM, Brunmair B. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor-delta, a regulator of oxidative capacity, fuel switching and cholesterol transport. *Diabetologia*, 50, 8–17.
- Galgani J, Ravussin E. (2008). Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int. J. Obes.*, 32, S109–S119.
- Galgani JE, Moro C, Ravussin E (2008). Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1009–E1017.

- Gardner PR. (2002). Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Meth. Enzymol.* 349, 9–16.
- Garrow JS, Fletcher K, Halliday D. (1965). Body composition in severe infantile malnutrition. *J Clin Invest* 44: 417–425.
- Goglia F, Liverini G, Lanni A, Barletta A, (1988). Mitochondrial DNA, RNA and protein synthesis in normal, hypothyroid and mildly hyperthyroid rat liver during cold exposure. *Molec And Cell Endocrinol* 141-147.
- Graham GG, Cordano A, Blizzard RM, Cheek BD. (1969). Infantile malnutrition. Changes in body composition during nutritional rehabilitation. *Pediatr Res*; 3: 579–589.
- Graham GG, MacLean WC Jr, Brown KH, Morales E, Lembcke J, Gastañaduy A. (1996). Protein requirements of infants and children: growth during recovery from malnutrition. *Pediatrics* 97, 499–505.
- Hariri N, Gougeon R, Thibault L. (2010). A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content”. *Nutr Res.* 30(9),: 632-643.
- Hartree EF. (1972). Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*; 48: 422-427
- Huxley RR, Shiell AW, Law CM. (2000). The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens*; 18: 815–831.
- Ibanez L, Ong K, Dunger DB, de Zegher F. (2006). Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2153–2158.

- Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Liverini G. (2002). Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* , 24: 65-72.
- Jackson AA (1984). Nutritional adaptation in disease and recovery. In *Nutritional Adaptation in Man*, pp. 111–126. K Blaxter and JC Waterlow, editors. London: John Libbey.
- Jamin F, Müller E. (1903). Specific weight of the living man with clinical applications for recovery of body weight. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 50: 1454–1457; 1511–1515.
- Jaquet D, Deghmoun S, Chevenne D, Collin D, Czernichow P, Lévy-Marchal C. (2005). Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. *Diabetologia* 48, 849–855.
- Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 47, 53–67.
- Keys A, Brozek J, Henschel A, Mickelson O, Taylor HL. (1950). *The Biology of Human Starvation*. University of Minnesota Press: Minneapolis, MN.
- Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. (2012). Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. *J. Vis. Exp.* (60), e3678.
- Kotler DP, Tierney AR, Culpepper-Morgan JA, Wang J, Pierson RN Jr. (1990). Effect of home total parenteral nutrition on body composition in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Parenter Enteral Nutr* 14, 454–458.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. Dec; 87(6):1344-50.

- Krishnan S, Cooper JA (2014). Effect of dietary fatty acid composition on substrate utilization and body weight maintenance in humans. *Eur J Nutr.* 53(3): 691-710.
- Kulkarni R, Shetty P. (1992). Net mechanical efficiency during stepping in chronically energy deficient human subjects. *Ann Hum Biol;* 19: 421–425.
- Levy-Marchal C, Jaquet D, Czernichow P. (2002). Long-term metabolic consequences of being born small for gestational age. *Semin Neonatol;* 9: 67–74.
- Liao FH, Liou TH, Chiu WC, Shieh MJ, Chien YW. (2010). Differential effects of high MUFA with high or low P/S ratio (polyunsaturated to saturated fatty acids) on improving hepatic lipolytic enzymes and mediating PPAR gamma related with lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase of white adipose tissue in diet-induced obese hamster. *Int J Obes* 34: 1608-1617.
- Ma SW, Foster DO. (1986). Starvation-induced changes in metabolic rate, blood flow, and regional energy expenditure in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 64: 1252–1258.
- MacLean WC, Graham GG. (1980). The effect of energy intake on nitrogen content of weight gained by recovering malnourished infant. *Am J Clin Nutr* 33, 903–909.
- Marcelino H, Veyrat-Durebex C, Summermatter S, Sarafian D, Miles-Chan J, Arsenijevic D, Zani F, Montani JP, Seydoux J, Solinas G, Rohner-Jeanrenaud F, Dulloo AG. (2013). A role for adipose tissue de novo lipogenesis in glucose homeostasis during catch-up growth: a Randle cycle favoring fat storage. *Diabetes.*;62(2):362-372.
- Martins PA, Hoffman DJ, Fernandes MT, Nascimento CR, Roberts SB, Sesso R, Sawaya AL. (2004). Stunted children gain less lean body mass and more fat mass than their non-stunted counterparts: a prospective study. *Br J Nutr* 92, 819–825.

- Matsuo T, Suzuki M. (1994). Beef tallow diet decreases lipoprotein lipase activities in brown adipose tissue, heart, and soleus muscle by reducing sympathetic activities in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*; 40: 569-581.
- Matsuo T, Takeuchi H, Suzuki H, Suzuki M. (2002). Body fat accumulation is greater in rats fed a beef tallow diet than in rats fed a safflower or soybean oil diet. *Asia Pac J Clin Nutr*; 11: 302-308.
- Meas T. (2010). Fetal origins of insulin resistance and the metabolic syndrome: a key role for adipose tissue? *Diabetes Metab* 36, 11–20.
- Mika C, Herpertz-Dahlmann B, Heer M, Holtkamp K. (2004). Improvement of nutritional status as assessed by multifrequency BIA during 15 weeks of refeeding in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Nutr* 134, 3026–3030.
- Mitchell PB, Truswell AS (1987). Body composition in anorexia nervosa and starvation. In *Handbook of Eating Disorders. Part I: Anorexia and Bulimia Nervosa*, pp. 45–77.
- Miwa S, Brand MD. (2003). Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 1300–1301.
- Morrison JL, Duffield JA, Muhlhausler BS, Gentili S, McMillen IC. (2010). Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity. *Pediatr Nephrol* 25,669–677.
- Nedergaard J (1983). The Relationship between Extramitochondrial  $Ca^{2+}$  Concentration, Respiratory Rate, and Membrane Potential in Mitochondria from Brown Adipose Tissue of the Rate. *Eur J Biochem* 133:185-191.
- Ong KKL, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. (2000). Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ*; 320: 967–971.

- Ounsted M, Sleight G. (1975). The infant's self-regulation of food intake and weight gain. Difference in metabolic balance after growth constraint or acceleration in utero. *Lancet*; 1 (7922): 1393–1397.
- Penicaud L, Ferre P, Assimacopoulos-Jeannet F, Perdereau D, Leturque A, Jeanrenaud B, Picon L, Girard J. (1991). Increased gene expression of lipogenic enzymes and glucose transporter in white adipose tissue of suckling and weaned obese Zucker rats. *Biochem. J.* 279, 303–308.
- Prentice AM, Paul AA. (2000). Fat and energy needs of children in developing countries. *Am. J. Clin. Nutr.* 72(Suppl. 5), 1253S–1265S.
- Porter C, Malagaris I, Sidossis LS. (2014). Is the heat surrounding adipose tissue mitochondria warranted? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 17, 503–508.
- Racette SB, Deusinger SS, Deusinger RH. (2003). Obesity: overview of prevalence, etiology, and treatment. *Phys Ther.* Mar; 83(3):276-88.
- Roehrig KL, Allred JB (1974). Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal Biochem* 58:414-421.
- Rokling-Andersen MH, Rustan AC, Wensaas AJ, Kaalhus O, Wergedahl H, Røst TH, Jensen J, Graff BA, Caesar R, Drevon CA. (2009). Marine n-3 fatty acids promote size reduction of visceral adipose depots, without altering body weight and composition, in male Wistar rats fed a highfat diet. *Br J Nutr*; 102: 995-1006.
- Rosen ED, Spiegelman BM. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847–853.
- Rosenbaum M, Vandenborne K, Goldsmith R, Simoneau JA, Heymsfield S, Joannisse DR, Hirsch J, Murphy E, Matthews D, Segal KR, Leibel RL. (2003). Effects of experimental weight perturbation on skeletal muscle work efficiency in human subjects. *Am J Physiol* 285: R183–R192.

- Rosqvist F, Iggman D, Kullberg J, Cedernaes J, Johansson HE, Larsson A, Johansson L, Ahlström H, Arner P, Dahlman I, Risérus U. (2014). Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes* 63:2356–2368.
- Sadurskis A, Dicker A, Cannon B, Nedergaard J. (1995). Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: Increased UCP content and NST capacity. *Am. J. Physiol.* 269, E351–E360.
- Schmidt MH, Klein M. (1997). Determination of body fat in treatment of anorexia nervosa. *Z Kinder Jugendpsychiat Psychother* 25, 27–34.
- Shimomura Y, Tamura T, Suzuki M. (1990). Less body fat accumulation in rats fed a safflower oil diet than in rats fed a beef tallow diet. *J Nutr*; 120: 1291-1296.
- Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. (2010). Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 91: 502-509.
- Soto N, Bazaes RA, Pena V, Salazar T, Avila A, Iñiguez G, Ong KK, Dunger DB, Mericq MV. (2003). Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in smallfor- gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3645–3650.
- Spangenberg EMF, 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.
- Stanford KI, Middelbeek RJW, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM., Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 123, 215–223.

- Streat SJ, Beddoe AH, Hill GL (1987). Aggressive nutritional support does not prevent protein loss despite fat gain in septic intensive care. *J Trauma* 27, 262–266.
- Takeuchi H, Matsuo T, Tokuyama K, Shimomura Y, Suzuki M. (1995). Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. *J Nutr* 125: 920-925.
- Takeuchi H, Matsuo T, Tokuyama K, Suzuki M. (1996). Effect of dietary fat type on beta-oxidation of brown adipose tissue and Na<sup>+</sup> channel density of brain nerve membrane in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 42: 161-166.
- Van Eys J (1985). Nutrition and cancer: physiological interrelationships. *Annu Rev Nutr* 5, 435–461.
- Villegas I, de la Lastra CA, Orjales A, La Casa C. (2003). A new flavonoid derivative, dosmalfate, attenuates the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 3, 1731–1741.
- Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. (2007). PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression. *PPAR Res.*
- Wajchenberg BL. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*; 21: 697-738.
- Webster AJF. (1993). Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proc Nutr Soc*; 52: 69–76.
- Weyer C, Walford RL, Harper IT, Milner M, MacCallum T, Tataranni PA, Ravussin E. (2000) Energy metabolism after 2 y of energy restriction : the Biosphere 2 experiment. *Am J Clin Nutr*; 72:946–953.
- Widdowson EM, Shaw WT. (1973). Full and empty fat cells. *Lancet* 2: 905.

- Wijers SL, Saris WH, van Marken Lichtenbelt WD. (2009). Recent advances in adaptive thermogenesis: Potential implications for the treatment of obesity. *Obes. Rev.* 10, 218–26.
- Yepuri G, Marcelino H, Shahkhalili Y, Aprikian O, Mace´ K, Seydoux J, Miles L J, Montani JP, Dulloo AG. (2011). Dietary modulation of body composition and insulin sensitivity during catch-up growth in rats: effects of oils rich in n-6 or n-3 PUFA. *British Journal of Nutrition* 105, 1750–1763.

### ***Bibliografia consultata***

- Barr HG, Mc Cracken KJ (1984). High efficiency of energy utilization in 'cafeteria'- and force-fed rats kept at 29 degrees. *Brit J Nutr* 51: 379-387.
- Bray GA, Krauss RM. (2014). Overfeeding of polyunsaturated versus saturated fatty acids reduces ectopic fat. *Diabetes*; 63: 2222–2224.
- Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wredw CE, Kunz Schughart LA, Scholmerich J, Bollheimer LC. (2006) “Defining High-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effect of different fat types”. *J Mol Endocrinol.* 36(3),: 485-501.
- Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats, *Am. J. Physiol.*; 295: E1269-E1276.
- Cettour-Rose P, Samec S, Russell AP, Summermatter S, Mainieri D, Carrillo-Theander C, Montani JP, Seydoux J, Rohner-Jeanrenaud F, Dulloo AG (2005). Redistribution of glucose from skeletal muscle to adipose tissue during catch-up fat: A link between catch-up growth and later metabolic syndrome. *Diabetes* 54: 751–756.
- Chechi K, Carpentier AC, Richard D. (2013). Understanding the brown adipocyte as a contributor to energy homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 408–420.
- Choi SS, Diehl AM. (2008). Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 295–300.
- Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JP, Dulloo AG. (2003). A role for suppressed thermogenesis favouring catch-up fat in the pathophysiology of catch-up growth. *Diabetes* 52: 1090–1097.

- Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Tsalouhidou S, Yepuri G, Mougios V, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S. (2012). Hepatic mitochondrial energetics during catch-up fat with high-fat diets rich in lard or safflower oil. *Obesity* 20, 1763–1772.
- Dulloo AG, Girardier L. (1992). Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse. *Metabolism* 41, pp 1336-1342.
- Dulloo AG. (2005). A role for suppressed skeletal muscle thermogenesis in pathways from weight fluctuations to the insulin resistance syndrome. *Acta Physiol. Scand.* 184, 295–307.
- Dulloo AG, Jacquet J, Seydoux J, Montani JP. (2006). The thrifty ‘catch-up fat’ phenotype: its impact on insulin sensitivity during growth trajectories to obesity and metabolic syndrome. *International Journal of Obesity* 30, S23–S35.
- Estabrook RW. (1967). Ratio mitochondrial respiratory control and polarographic measurement of ADP. *J Meth Enzymol*; 10: 41-47.
- Even PC, Mokhtarian A, Pele A. (1994). Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals. *Neurosci. Biobehav. Rev*, 18, 435–447.
- Fernandes MA, Custodo JB, Santos MS, Moreno AJ, Vicente JA. (2006). Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat mitochondria from oxidative stress. *Mitochondrion*, 6: 176-185.
- Flohè L, Otting F (1984). Superoxide dismutase assay. *Meth. Enzymol.* 105, 93-104.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497–510.
- Forman BM, Chen J, Evans RM. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors and . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94,4312–4317.

- Fürnsinn C, Willson TM, Brunmair B. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor-delta, a regulator of oxidative capacity, fuel switching and cholesterol transport. *Diabetologia* 50, 8–17.
- Galgani J, Ravussin E. (2008). Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int. J. Obes.* 32, S109–S119.
- Galgani JE, Moro C, Ravussin E. (2008). Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1009–E1017.
- Goglia F, Liverini G, Lanni A, Barletta A, (1988). Mitochondrial DNA, RNA and protein synthesis in normal, hypothyroid and mildly hyperthyroid rat liver during cold exposure. *Molec And Cell Endocrinol* 141-147.
- Hartree EF. (1972). Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48: 422-427
- Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Liverini G. (2002). Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 65-72.
- Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 47, 53–67.
- Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. (2012). Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. *J. Vis. Exp.* (60), e3678.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* Dec; 87(6):1344-50.
- Marcelino H, Veyrat-Durebex C, Summermatter S, Sarafian D, Miles-Chan J, Arsenijevic D, Zani F, Montani JP, Seydoux J, Solinas G, Rohner-Jeanrenaud F, Dulloo AG. (2013). A role for adipose tissue de novo lipogenesis in glucose

homeostasis during catch-up growth: a Randle cycle favoring fat storage. *Diabetes*. 62(2):362-372.

- Miwa S, Brand MD. (2003). Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 1300–1301.
- Nedergaard J. (1983). The Relationship between Extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  Concentration, Respiratory Rate, and Membrane Potential in Mitochondria from Brown Adipose Tissue of the Rat. *Eur J Biochem* 133:185-191.
- Porter C, Malagaris I, Sidossis LS. (2014). Is the heat surrounding adipose tissue mitochondria warranted? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 17, 503–508.
- Roehrig KL, Allred JB (1974). Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal Biochem* 58:414-421.
- Rosen ED, Spiegelman BM. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847–853.
- Sadurskis A, Dicker A, Cannon B, Nedergaard J. (1995). Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: Increased UCP content and NST capacity. *Am. J. Physiol.* 269, E351–E360.
- Stanford KI, Middelbeek RJW, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM., Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 123, 215–223.
- Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. (2007). PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression. *PPAR Res.* Wijers SL, Saris WH, van Marken Lichtenbelt WD. (2009). Recent advances in adaptive thermogenesis: Potential implications for the treatment of obesity. *Obes. Rev.* 10, 218–26.