

Università degli studi di Napoli “Federico II”

DOTTORATO DI RICERCA
IN
BIOLOGIA
XXXIV Ciclo

*Relazione tra Insulino-Resistenza e Ipertiroidismo:
Ruolo delle specie reattive dell'ossigeno*

Coordinatore del Dottorato

Prof. Sergio ESPOSITO

Candidato

Dott. Gianluca FASCIOLO

Tutor

Prof.ssa Paola VENDITTI

INDICE

Sommario	2
Introduzione	4
Pathway insulinico	5
Insulina e fegato	8
Insulina e periferia: il muscolo.....	9
Insulino resistenza.....	11
Meccanismi dell'IR.....	12
Insulino resistenza nell'ipertiroidismo	15
Vitamina E	17
Scopo del lavoro.....	18
Materiale e metodi	19
Animali.....	19
Preparazione omogenati tissutali e mitocondriali	20
Contenuto tissutale di Vitamina E	20
Danno ossidativo ai lipidi ed alle proteine.....	21
Susceptibilità allo stress	23
Produzione di ROS.....	23
Contenuto cellulare di ROS (DCF).....	23
Rilascio di H ₂ O ₂ mitocondriale.....	23
Attività dell'enzima NADPH ossidasi	24
Attività degli enzimi antiossidanti (GPX, GR, SOD, Catalasi)	24
Glutazione perossidasi	24
Glutazione reduttasi	25
Superossido dismutasi.....	25
Catalasi.....	26
Respirazione cellulare	26

Western Blot (P-JNK, JNK, P-AKT, AKT).....	27
Valutazione omeostasi glicemica.....	28
Analisi statistica	28
Risultati	29
Efficacia dei trattamenti	29
Danno ossidativo.....	30
Contenuto cellulare di ROS	31
Attività enzimi antiossidanti	33
Suscettibilità allo stress ossidativo.....	35
Respirazione cellulare e mitocondriale	35
P-JNK/JNK	38
Parametri omeostasi glicemica.....	39
P-AKT/AKT.....	40
Discussione	41
Bibliografia	47
Pubblicazioni.....	63
Capitoli.....	64

Sommario

Le specie reattive dell'ossigeno esercitano sugli organismi viventi effetti che dipendono dalla loro concentrazione, esse, in altre parole, si comportano da agenti ormetici in grado di esercitare effetti dose dipendente. A basse concentrazioni sono coinvolte in molteplici processi fisiologici, tra cui il controllo della ventilazione polmonare, la regolazione della massa degli eritrociti, la regolazione di risposte geniche. Quando la loro concentrazione aumenta esercitano effetti che possono essere dannosi per le cellule poiché sono in grado di danneggiare tutte le macromolecole biologiche ossidandole e questo può determinare disfunzioni cellulari. Per difendersi dagli effetti dannosi delle ROS tutte le cellule degli organismi aerobici sono equipaggiate con un complesso sistema di difesa antiossidante. Allorché la produzione di ROS aumenta e/o il sistema di difesa antiossidante risulta meno efficiente, le macromolecole danneggiate ossidativamente si accumulano e tale condizione è definita stress ossidativo. Lo stress ossidativo si riscontra in stati fisiologici, per esempio durante l'attività fisica, ma anche in diversi stati patologici e sembra anche essere causa o concausa delle patologie. Tra le situazioni in cui si verifica stress ossidativo vi è l'alterazione della sensibilità tissutale all'insulina, condizione nota come insulino resistenza (IR). Non è finora noto se l'IR possa essere causata anche dallo stress ossidativo o se lo stress ossidativo rappresenti un epifenomeno che si accompagna a tale alterazione. Studi *in vitro* suggeriscono che le ROS possono attivare dei fattori, in particolare alcune serine treonina chinasi come la c-Jun NH₂ terminal kinase, che sembrerebbero alterare la via di segnalazione insulinica. Per verificare il ruolo delle ROS nell'insorgenza dell'insulino resistenza *in vivo* abbiamo utilizzato come modello di stress ossidativo il ratto ipertiroideo. È noto, infatti, che l'ipertiroidismo è associato con un'alterazione dello stato redox nei tessuti bersaglio dell'ormone che determina un accumulo di macromolecole danneggiate ossidativamente e, quindi, l'insorgenza di stress ossidativo. Inoltre, è anche noto che l'ipertiroidismo può essere associato con una particolare forma di diabete, detto diabete tiroideo. Abbiamo studiato se l'induzione sperimentale dell'ipertiroidismo provochi insulino resistenza e se la somministrazione di un antiossidante, la vitamina E, oltre a ridurre il livello di stress ossidativo, riduca o prevenga l'insulino resistenza. I nostri risultati indicano che nei ratti resi sperimentalmente ipertiroidei insorge una condizione di insulino resistenza, come dimostrato dalle alterazioni della glicemia e dell'insulinemia in seguito a carico di glucosio. Tale condizione è associata all'aumento dei markers di stress ossidativo a livello del tessuto epatico e muscolare e dalla riduzione della sensibilità all'insulina in tali tessuti. Inoltre, per comprendere il meccanismo dell'alterazione della sensibilità all'insulina abbiamo valutato l'attivazione di JNK la quale può interferire con la via di segnalazione attivata dall'insulina. Il trattamento con vitamina E attenua le alterazioni osservate

negli animali ipertiroidei, confermando il ruolo *in vivo* delle ROS nell'insorgenza dell'insulino resistenza negli animali resi sperimentalmente ipertiroidei.

Introduzione

Attualmente l'incidenza del diabete non-insulino dipendente o diabete mellito di tipo (T2DM) è in drammatica crescita in tutto il mondo [1,2].

L'insulino resistenza (IR), uno dei primi segni clinici del T2DM, gioca un ruolo chiave nello sviluppo della malattia. Sebbene attualmente l'incidenza di IR è T2DM sia principalmente dovuta alla epidemia globale di obesità [3], IR e T2DM sono anche associati a disordini della corteccia e della midollare del surrene [4] e della ghiandola tiroidea [5].

Prove di una relazione tra ormoni tiroidei e metabolismo del glucosio sono apparse circa 100 anni fa e fu coniato il termine 'diabete tiroideo' per descrivere l'influenza degli aumentati livelli di ormoni tiroidei sulle alterazioni dell'omeostasi del glucosio [6]. Gli effetti diabetogeni dell'eccesso di ormoni tiroidei sono stati attribuiti ad un'aumentata velocità dell'assorbimento gastrointestinale del glucosio, ad una diminuita capacità del fegato di immagazzinare il glucosio sotto forma di glicogeno, ad un'aumentata gluconeogenesi epatica, ad una riduzione del rilascio di insulina da parte del pancreas, ad un'aumentata IR periferica e alla diminuzione dell'emivita dell'insulina nel plasma [7-9].

Il problema è ulteriormente complicato dalla presenza di elevati livelli di insulina e glucosio nell'ipotiroidismo [10] e dalla presenza di IR sia nell'ipertiroidismo subclinico che [11, 12] nell'ipotiroidismo [13, 14].

Inoltre, il diabete e i disordini tiroidei sembrano influenzarsi a vicenda [15, 16] poiché gli ormoni tiroidei contribuiscono alla regolazione del metabolismo dei carboidrati e alla funzione del pancreas e il diabete influenza la funzione tiroidea in maniera variabile.

Sugli effetti dell'ipertiroidismo sull' IR e il T2DM vi sono dati conflittuali e i meccanismi che sottendono a tale relazione sono ancora oggetto di studio. Poiché nell'ipertiroidismo si osserva sempre un aumento della produzione di radicali e di altre specie reattive dell'ossigeno non è possibile escludere che tali specie siano coinvolte nell'insorgenza di IR e T2DM.

Pathway insulinico

La regolazione della glicemia ematica dipende dall'equilibrio tra due ormoni secreti dalle cellule endocrine del pancreas, l'insulina e il glucagone. Quando, in seguito a un pasto, la concentrazione del glucosio nel sangue aumenta, esso entra nelle cellule β del pancreas per trasporto passivo facilitato utilizzando trasportatori del glucosio espressi costitutivamente, i GLUT2. All'interno delle cellule β , il glucosio è fosforilato dall'enzima esochinasi IV, glucochinasi (GK), con formazione del glucosio-6-fosfato, G6P che è convogliato nella via glicolitica.

L'aumento della velocità del catabolismo del glucosio causa un aumento della concentrazione di ATP determinando un cambiamento del rapporto intracellulare tra ATP e ADP. Questo aumento induce la chiusura dei canali del potassio sensibili all'ATP. La riduzione dell'efflusso di K^+ causa la depolarizzazione della membrana cellulare che induce l'apertura dei canali del calcio voltaggio dipendenti con conseguente aumento dell'afflusso dello ione nelle cellule β . Il Ca^{2+} intracellulare agisce come secondo messaggero attivando eventi che culminano con il rilascio dell'insulina stoccata all'interno di vescicole. Le cellule β del pancreas sono fornite di due pool di vescicole contenenti l'insulina, uno adiacente alla membrana, appartenente al pool della prima fase di rilascio, e uno localizzato più in profondità nella cellula che costituisce il pool della seconda fase di rilascio [17]. La mobilitazione di oltre il 90% delle vescicole dipende dall'efflusso di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico e solo una piccola popolazione di granuli, definita a movimento rapido, risponde all'afflusso del Ca^{2+} extracellulare in seguito a depolarizzazione della membrana plasmatica. Questi granuli di insulina, localizzati più lontano dalla membrana, sono responsabili del rifornimento del pool a rilascio rapido [18], ma tra i due rilasci intercorre un breve lasso di tempo che fa sì che il rilascio dell'insulina sia bifasico [19]. Diverse proteine partecipano all'adesione delle vescicole con la membrana, in particolare la famiglia delle proteine sinaptobrevina/VAMP SNARE (*SNAP Receptor*), SNAP-25, syntaxina, α -SNAP, e le proteine leganti il Ca^{2+} sinaptotagmina I e II. In particolare, l'aumento della glicemia induce l'interruzione del legame tra la F-actina e la syntaxina-4 permettendo il *docking* tra le vescicole e la membrana consentendo la secrezione dell'insulina durante la *Fase 1* del rilascio [17].

Quando, invece, permane lo stimolo indotto dalla glicemia, si innesca la *Fase 2* del rilascio dell'insulina che prevede il rilascio dell'ormone contenuto nel *pool* vescicolare di riserva ATP-dipendente [20].

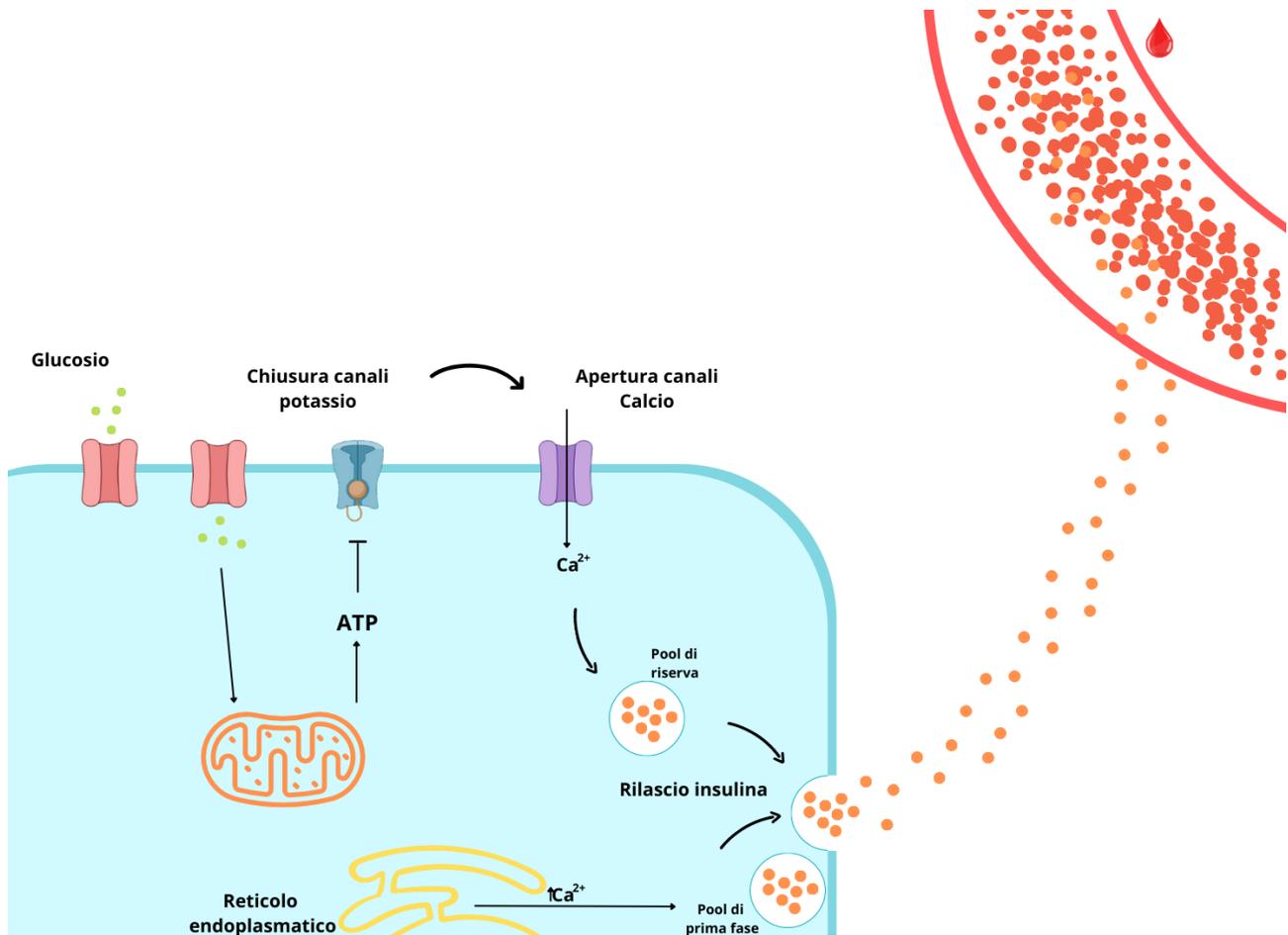


Figura 1 - Rilascio bifasico insulina

I processi cellulari stimolati dall'insulina sono avviati al momento del suo legame al recettore transmembrana che è seguito dall'autofosforilazione del recettore dell'insulina sui residui di tirosina. La fosforilazione del recettore dell'insulina rende possibile il legame e la fosforilazione dei substrati 1 e 2 del recettore dell'insulina (IRS-1, IRS-2), i quali interagiscono con i domini *src homology 2* (SH2) di varie molecole di trasduzione del segnale, inclusa la subunità p85 della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) e della proteina *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2), per propagare il segnale di insulina a valle (Sasaoka e Kobayashi, 2000). Dunque, il legame dell'IRS alla fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) determina l'attivazione di una via PI3K-dipendente che comprende la chinasi fosfoinositide-dipendente (PDK) e la proteina chinasi B (PKB/AKT). AKT è un mediatore cruciale di molti degli effetti metabolici dell'insulina nel fegato, nel cervello, nei muscoli, nel tessuto adiposo e in altri tessuti [21]. Dopo l'attivazione, le isoforme di AKT vengono rilasciate dalla membrana plasmatica e fosforilano vari substrati cellulari che possono regolare in modo specifico un singolo processo cellulare o influenzare pleiotropicamente diverse funzioni cellulari [22].

Il pathway che vede coinvolta l'attivazione di GRB2, invece, può essere attivato o in seguito all'attivazione delle IRS o mediante una via indipendente da queste ultime. Il recettore dell'insulina,

una volta attivato, può reclutare direttamente la proteina *Src homology 2 domain containing* (SHC) , sempre grazie al dominio SH2 [23]. Successivamente, GRB2 si legherà a Ras, una small GTPasi, (Rat sarcoma) promuovendo su di essa il rilascio di GDP e il legame di GTP. Ras, così attivata, si legherà a Raf-1 (*rapidly accelerated fibrosarcoma*), attivandola. Una volta attivata Raf-1 fosforila la proteina Mek (*mitogen-activated protein kinase kinase*, MAKK kinase) su residui di serina, rendendola capace di fosforilare, su residui di tirosina e treonina, la proteina ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) che così si attiva. ERK attivata migra nel nucleo e fosforila fattori nucleari di trascrizione, come Elk1 (*ETS Like-1 protein*). Elk1 fosforilato si può unire a SRF (*serum response factor*) per stimolare la trascrizione e la traduzione di una serie di geni essenziali per la divisione cellulare [24].

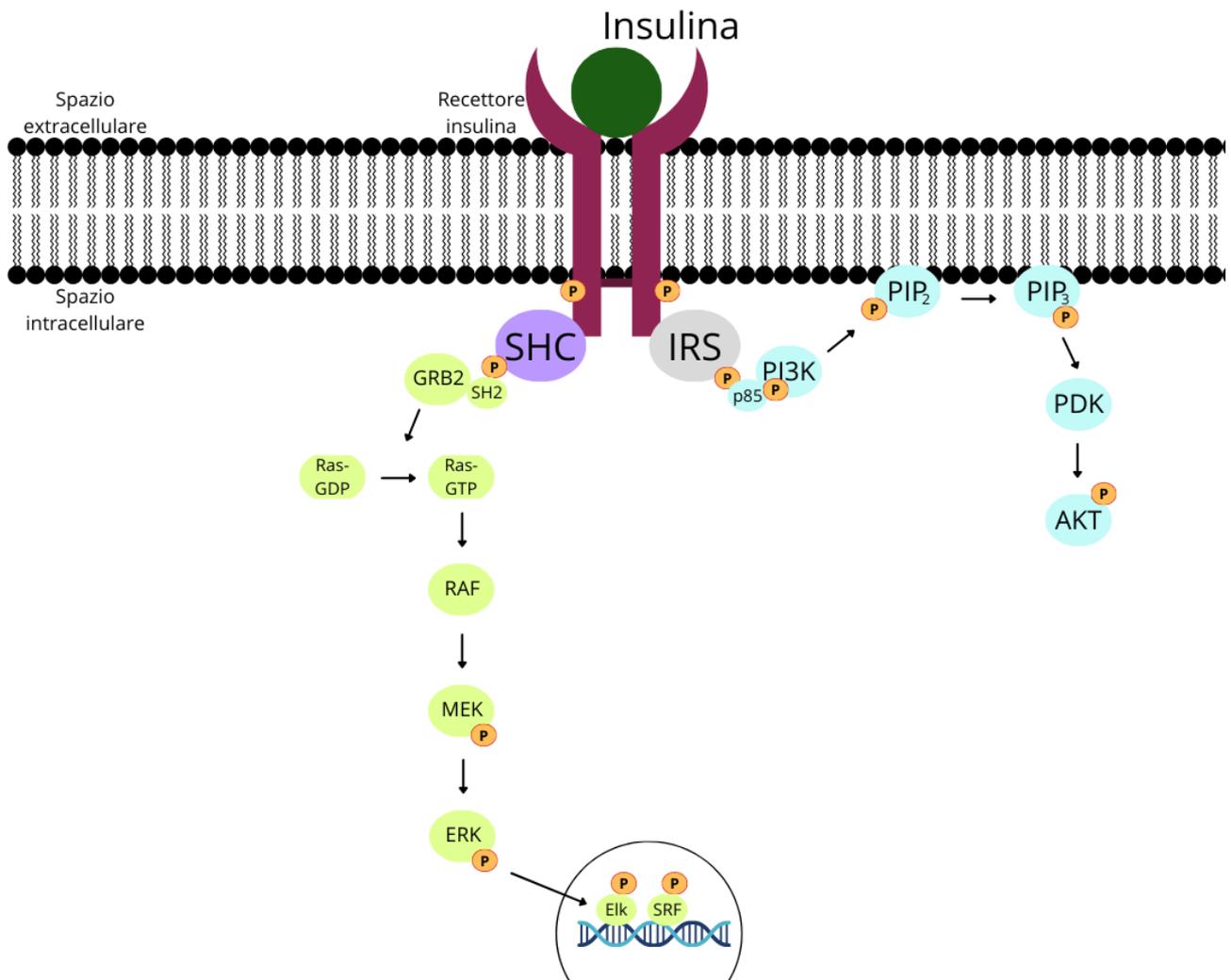


Figura 2 - Via di segnalazione dell'insulina

Insulina e fegato

Una volta immessa in circolo, attraverso la vena porta l'insulina entra in contatto con il fegato, il primo organo con cui interagisce.

Nel fegato, AKT innesca l'accumulo di glucosio come glicogeno, inibisce la degradazione del glicogeno, stimola la conversione dell'eccesso di glucosio in lipidi e inibisce la produzione de novo di glucosio [25].

AKT inibisce la gluconeogenesi epatica fosforilando, e quindi inibendo, la proteina *forkhead box O1* (FOXO1) [26], un fattore di trascrizione che induce la trascrizione dei geni che codificano per fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) e glucosio-6-fosfatasi (G6Pasi).

PEPCK e G6Pasi governano la gluconeogenesi epatica convertendo, rispettivamente l'ossalacetato in fosfoenolpiruvato e il glucosio-6-fosfato in glucosio. In accordo con il loro ruolo nella gluconeogenesi epatica, la produzione epatica di PEPCK e G6Pasi è inibita dall'insulina dopo un pasto e stimolata da glucagone nelle condizioni di digiuno [27,28].

L'insulina sopprime la gluconeogenesi anche attraverso azioni extraepatiche indirette che determinano la riduzione della disponibilità di substrati gluconeogenici. Infatti, essa inibisce la lipasi ormono-sensibile, limitando la lipolisi del tessuto adiposo e riducendo la disponibilità di acidi grassi liberi (FFA) e glicerolo [29] e inibisce la proteolisi muscolare limitando il rilascio di aminoacidi [30]. Gli FFA sono usati come fonte di energia per la gluconeogenesi e il glicerolo e gli aminoacidi sono precursori della gluconeogenesi. Una significativa riduzione dell'afflusso di FFA al fegato insieme a una ridotta fornitura di substrati gluconeogenici determina un potente effetto inibitorio indiretto dell'insulina sulla gluconeogenesi epatica [31]. La riduzione del flusso di FFA al fegato provoca anche una diminuzione delle concentrazioni epatiche di acetil-CoA il quale agisce da regolatore della produzione epatica di glucosio (HGP) modulando l'attività dell'enzima piruvato carbossilasi (PC) che controlla il primo passaggio nella conversione del piruvato in glucosio [32]. Inoltre, l'insulina sopprime il rilascio di glucagone da parte delle cellule α pancreatiche che stimola la produzione di glucosio epatico [33].

All'interno del fegato vi è un enzima, l'insulinasi (glutazione-insulina transidrogenasi), che media la degradazione proteolitica di circa il 50% dell'insulina immessa in circolo dal pancreas.

Per tale motivo solo una quota di insulina prodotta dal pancreas raggiunge gli altri tessuti sensibili all'ormone.

Insulina e periferia: il muscolo

Nel muscolo l'assorbimento del glucosio è principalmente dipendente dall'insulina che promuove l'esposizione sulla membrana plasmatica dell'isoforma 4 del trasportatore del glucosio, il GLUT4, contenuto in vescicole.

L'esposizione dei GLUT4 richiede l'attivazione della chinasi AKT in quanto tra i suoi substrati vi è una proteina di 160 kDa (AKT *substrate* 160, AS160) importante nell'attivazione del trasporto del

glucosio nel muscolo. Infatti, la fosforilazione di AS160 da parte di AKT annulla l'inibizione della traslocazione di GLUT4 dalle vescicole interne alla membrana plasmatica. Tuttavia, la stimolazione completa del trasporto del glucosio da parte dell'insulina sembra richiedere la fosforilazione della proteina chinasi C atipica (PKC ζ) da parte del PDK [34]. Inoltre, il legame con l'insulina avvia anche la disattivazione dei membri della famiglia delle proteine tirosin fosfatasi, come la proteina tirosin fosfatasi 1B (PTP1B) e l'omologo tensina (PTEN), che in condizioni cellulari di riposo esercita un'attività che supera l'attività della chinasi e inibisce la segnalazione dell'insulina [35, 36].

Nel muscolo AKT innesca lo stoccaggio del glucosio sotto forma di glicogeno, inibisce la scissione del glicogeno, induce la sintesi proteica e previene la scissione delle proteine.

L'esposizione delle GLUT-4 a livello muscolare è un evento di fondamentale importanza per il mantenimento dell'omeostasi glicemica in quanto il muscolo è il principale tessuto coinvolto nell'*uptake* del glucosio nella fase postprandiale. Infatti, una ridotta massa muscolare, o una riduzione della sensibilità di questo tessuto all'insulina, possono rappresentare fattori che predispongono l'organismo a patologie metaboliche [37]. Il contributo del muscolo all'*uptake* del glucosio nella fase postprandiale aumenta ulteriormente in seguito all'esercizio. Questo è probabilmente dovuto a vari fattori tra cui un aumento della mobilitazione del glucosio, causata dall'aumentata perfusione capillare, un aumento dei trasportatori di membrana e un aumento del flusso intracellulare dei substrati dovuto alla glicolisi. L'aumento dei trasportatori del glucosio in seguito all'esercizio nel muscolo sembra dipendere dall'attivazione di una via indipendente dall'insulina. Il meccanismo alla base dell'attivazione di tale via non è ancora stato chiarito dettagliatamente ma sia la contrazione che l'insulina mediano l'esposizione dei GLUT-4 in seguito all'attivazione di PKC, NOS (ossido nitrico sintasi), o PKB/AKT [38].

Insulino resistenza

L'insulino resistenza è una condizione in cui la sensibilità delle cellule bersaglio ai livelli normali di insulina è ridotta. L'IR è spesso accompagnata da una varietà di anomalie metaboliche e vascolari, una condizione indicata come "sindrome da insulino resistenza" [39].

Le forme più comuni di IR nell'uomo sono associate con l'obesità e l'inattività fisica anche se l'identificazione di un meccanismo cellulare comune a queste condizioni è un problema non ancora risolto.

Il muscolo scheletrico rappresenta un tessuto importante nello sviluppo dell'IR nell'intero organismo [40]. Sebbene l'IR nel muscolo dipenda da alterazioni sia della via di segnalazione insulinica che nel trasporto del glucosio [41], alcuni studi supportano l'idea che l'IR dipenda primariamente da difetti nell'uptake del glucosio [41]. È stato infatti dimostrato che mentre la distruzione del GLUT4 provoca una severa IR e intolleranza al glucosio [42], l'assenza di recettori per l'insulina nel muscolo scheletrico induce un quadro di sindrome metabolica (elevata massa grassa, alti livelli di trigliceridi, e di acidi grassi) ma i livelli di glucosio e di insulina, e la tolleranza al glucosio appaiono normali [43]. Inoltre, il trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico può anche essere stimolato da un meccanismo insulino indipendente attivato dall'esercizio e dall'ipossia [41].

I soggetti obesi [44] e diabetici [45] presentano più bassi livelli di fosforilazione su residui di tirosina di IRS-1 e minore attività di PI3K rispetto ai controlli. La diminuita fosforilazione su residui di tirosina di IRS-1 e IRS-2 è dovuta ad un' aumentata fosforilazione su residui di serina e treonina [46] operata da chinasi come la chinasi inibitoria kappa B (IKK) [47], la chinasi c-Jun amino terminale (JNK) [48], la proteina mTOR (bersaglio della rapamicina nei mammiferi) [49], isoforme di protein chinasi C [50], e la protein chinasi attivata da mitogeni p38 (p38 MAPK) [51]. A causa della ridotta fosforilazione su residui di tirosina anche i livelli di attivazione della PI3K sono ridotti il che altera di conseguenza gli effettori a valle riducendo la traslocazione sulla membrana o l'attivazione di GLUT4[52-54].

L'insulina stimola due segnali indipendenti che entrambi contribuiscono a favorire il trasporto del glucosio: la PI3K porta alla traslocazione del GLUT4 sulla membrana e la p38 MAPK porta all'attivazione dei trasportatori reclutati sulla membrana. Così l'IR è stata associata con una risposta alterata della p38 MAPK all'insulina in un modello murino di IR (I topi ob/ob), sebbene la risposta della p38 MAPK alla contrazione sembrava essere preservata permettendo una via insulino indipendente di attivazione del GLUT4 [55].

Meccanismi dell'IR

Gli studi volti a comprendere i meccanismi mediante i quali una dieta ricca di grassi o l'obesità possono inibire la via di segnalazione insulinica suggeriscono che è improbabile che l'IR possa essere spiegata da una singola causa, piuttosto è più probabile che l'IR si sviluppi a causa di meccanismi multipli e complementari.

La teoria più diffusa sui meccanismi sottostanti l'IR nell'obesità è basata sulla incapacità del tessuto adiposo di accumulare un eccesso di energia, il che provoca un elevato efflusso di FFA dai depositi di grasso agli altri tessuti incluso il fegato e il muscolo scheletrico [56]. Poiché questi tessuti sono meno capaci di stoccare i lipidi rispetto agli adipociti e ne sono anche influenzati negativamente, la lipotossicità può portare a IR nel muscolo, fegato e pancreas [52]. Tuttavia, fu successivamente osservato che il sovraccarico di lipidi non agisce da solo in questo processo. Poiché i mitocondri sono i siti principali dell'ossidazione degli acidi grassi e della loro utilizzazione, è stato anche suggerito che una ridotta funzionalità mitocondriale possa fornire un contributo importante all'accumulo di metaboliti tossici dei lipidi e che la IR possa verificarsi come conseguenza. Più recentemente è stato proposto che la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) possa essere la conseguenza primaria degli aumentati livelli serici di FFA. L'aumentata produzione di ROS può, a sua volta, causare disfunzioni mitocondriali e portare a IR [57, 58].

Negli organismi aerobici le ROS, che sono prodotte occasionalmente da fattori ambientali, sono generate continuamente come sottoprodotti del normale metabolismo cellulare. La produzione di ROS è iniziata dalla riduzione univalente dell'ossigeno a radicale anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) che porta alla formazione del perossido d'idrogeno (H_2O_2) e di radicale idrossilico ($\cdot OH$). Altre specie reattive contenenti azoto, dette specie reattive dell'azoto (RNS) comprendono l'ossido nitrico (NO^{\cdot}) e il suo derivato il perossinitrito ($ONOO^-$). Le ROS e le RNS sono agenti ossidanti coinvolti nel danno tessutale ed è ormai accertato che l'ossidazione è un meccanismo generale di danno tessutale in varie condizioni patologiche [59, 60]. È anche noto che specie reattive come $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , and NO^{\cdot} possono anche funzionare come molecole segnale regolando processi fisiologici importanti [58].

Per esempio, è stato dimostrato che NO^{\cdot} regola l'interazione tra GK e granuli secretori di insulina [61] e migliora l'esocitosi dei granuli attraverso la S-nitrosilazione della syntaxina 4 [62].

Successivamente, è stato suggerito che bassi livelli di H_2O_2 regolano positivamente l'afflusso mitocondriale di Ca^{2+} [63], un processo importante per aumentare l'attività del ciclo dell'acido tricarbossilico, un importante driver della seconda fase del rilascio di insulina [64].

Inoltre, l'osservazione che la secrezione di insulina è attenuata dagli antiossidanti in modo dose-dipendente, ed è altamente correlata con i livelli di ROS, suggerisce che la produzione basale di ROS è uno stimolo necessario per la secrezione di insulina indotta da glucosio [63].

Infatti, alcuni studi hanno evidenziato il ruolo cruciale dell' H_2O_2 , che agisce come segnale di trasduzione, accoppiando il metabolismo del glucosio alla secrezione di insulina, o lo interrompe a seconda della sua concentrazione [65,66].

Lo stress ossidativo è stato riconosciuto essere un meccanismo chiave nell'IR allorché la ricerca in questo campo ha rivelato una forte correlazione tra lo stress ossidativo corporeo e l'incidenza di IR. La comprensione di questa correlazione è ancora incompleta ma alcune informazioni derivano dallo studio dell'insorgenza di stress ossidativo nell' IR indotta dall'obesità o da una dieta ricca di grassi.

Anche se le cellule contengono diverse fonti di ROS, diversi dati sperimentali indicano che le specie ossidanti coinvolte nell'insorgenza di IR originano principalmente dalla catena di trasporto elettronico e dall'enzima NADPH ossidasi (NOX) [67].

Negli uomini obesi e in modelli animali il contributo della NOX all'IR muscolare sembra essere dovuto ad un over attività del sistema renina angiotensina (RAS) [68].

L'angiotensinogeno (Agt) è tagliato dalla renina e dall'enzima che converte l'angiotensina (ACE) in successione, per formare l'angiotensina II (Ang II), il principale peptide attivo di questo sistema. Studi su miociti L6 in coltura hanno fornito le prime prove del coinvolgimento della NOX nell' IR indotta da Ang II [69]. Questi studi hanno dimostrato che Ang II aumenta l'attività della NOX e, quindi, la generazione di ROS e che ciò è accompagnato alla riduzione della fosforilazione di IRS su residui di tirosina, della attivazione di AKT e della traslocazione del GLUT4 sulla membrana plasmatica quando le cellule erano trattate con insulina [69].

Altri studi hanno dimostrato che un aumento dell'attività della NOX induce IR in altri tipi cellulari, tra cui adipociti [70], epatociti [71], e cardiociti [72].

La prima prova diretta che ha suggerito il coinvolgimento delle ROS mitocondriali nello sviluppo dell'IR è stata ottenuta su adipociti 3T3-L1 trattati con il fattore di necrosi tumorale α (TNF α) [73]. L'insorgenza di IR risultava in un aumento della produzione di ROS mitocondriale che precedeva il declino della sensibilità all'insulina. Inoltre, se si spazzavano o $O_2^{\bullet-}$ o H_2O_2 , la sensibilità all'insulina era parzialmente recuperata [73]. Questo risultato era in accordo con l'idea che la ROS che si genera per prima nei mitocondri sia $O_2^{\bullet-}$ che è, successivamente, convertito in H_2O_2

dall'enzima superossido dismutasi mitocondriale (SOD) [74]. Entrambe le ROS possono raggiungere il citosol poiché la membrana mitocondriale è permeabile all' H_2O_2 e il superossido permea la membrana mitocondriale interna attraverso il canale anionico e la membrana mitocondriale esterna attraverso il canale anionico voltaggio dipendente [75].

Aumenti nella produzione di ROS mitocondriale nell'IR sono stati trovati nel fegato [76], e nel muscolo cardiaco [77] e scheletrico [78].

L'aumento della produzione di ROS indotto dall'obesità potrebbe essere dovuto alla relazione inversa che esiste tra la velocità del flusso di elettroni e il *leak* elettronico lungo la catena di trasporto elettronico, così che *in vitro*, quando la velocità della respirazione è alta (in presenza di ADP, Stato 3), la generazione di ROS è bassa, mentre quando la velocità della respirazione è bassa (in assenza di ADP, Stato 4), la produzione di ROS è alta [58]. *In vivo* una condizione simile allo stato 4 ed un'alta produzione di ROS è probabile che si verifichi durante periodi di sovraccarico di nutrienti con uno stile di vita sedentario.

Sebbene i meccanismi mediante i quali la produzione di ROS altera la segnalazione insulinica non siano stati pienamente caratterizzati, gli effetti delle ROS sull'IR sono stati ascritti ad alterazioni di diverse vie di segnalazione intracellulare. Tra le diverse proteine indicate come possibili effettori ci sono varie chinasi come IKK β , JNK, p38 MAPK, che catalizzano la fosforilazione di residui di serina in IRS, riducendo così la fosforilazione sui suoi residui di tirosina da parte dell'insulina il che inibisce la sua attività [46].

Questa idea è supportata da prove che le attività di queste chinasi sono stimulate da una varietà di stress esogeni ed endogeni comprese le ROS e che il loro contenuto aumenta nell'obesità e nell'IR [79].

Infatti, è stato osservato *in vitro* che incubando colture cellulari con un potente induttore di JNK, l'ansiomicina, veniva indotta una riduzione della fosforilazione di IRS1 e IRS2 su residui di tirosina in risposta all'insulina [48]. La fosforilazione mediata da JNK su IRS1 è stata mappata sul residuo di serina³⁰⁷, ed è stato mostrato che la fosforilazione su questo residuo inibisce l'interazione tra le IRS1 e il recettore dell'insulina in risposta all'insulina [48,80].

L'attività di JNK in muscolo, grasso e fegato di ratti obesi è risultata essere elevata. Infatti, ratti JNK1^{-/-} risultavano resistenti all'obesità indotta dalla dieta e mostravano un miglioramento della sensibilità all'insulina, accompagnata da un maggior grado di fosforilazione di IRS su residui di tirosina e una diminuzione della fosforilazione su residui di serina³⁰⁷ in risposta all'insulina [81].

Inoltre, anche in topi $JNK2^{-/-}$ e $JNK1^{+/-}$ vi era una protezione contro l'obesità indotta dalla dieta, contro la steatosi epatica e contro la resistenza all'insulina, indicando un coinvolgimento di entrambe le isoforme di JNK sulla fosforilazione del residuo di serina³⁰⁷ delle IRS *in vitro* [82,83].

Insulino resistenza nell'ipertiroidismo

Da quando nel 1920 Rohdenburg ha riportato che un eccesso di ormoni tiroidei può condurre ad alterazioni nel metabolismo dei carboidrati e che ci sono associazioni tra gli ormoni tiroidei e il diabete [6] si è osservato che c'è un aumento del T2DM in condizioni di tireotossicosi. Inoltre, si è anche mostrato che lo sviluppo del T2DM durante l'ipertiroidismo peggiora entrambe le malattie, potenzia l'insorgenza di complicazioni come la chetoacidosi e può provocare un aumento della richiesta giornaliera di insulina [84].

L'ipertiroidismo clinico è accompagnato spesso da un'anomala tolleranza al glucosio e IR [85]. Alterata tolleranza al glucosio è stata osservata in circa il 50% dei soggetti ipertiroidei, e circa il 2–3% di tali pazienti ha il diabete [86].

Le alterazioni della tolleranza al glucosio sono state attribuite a diversi fattori, tra cui l'aumento dell'assorbimento del glucosio a livello gastro-intestinale, iperglicemia post assorbitiva, alta produzione epatica di glucosio, alta concentrazione di FFA, alterata secrezione di insulina e riduzione della sensibilità periferica all'insulina [85]. Sebbene ciascuno di questi fattori può contribuire all'aumento dei livelli serici di glucosio, i meccanismi principali sottostanti all'alterazione della tolleranza al glucosio nell'ipertiroidismo sono la riduzione della secrezione dell'insulina e la ridotta sensibilità periferica all'insulina.

Per quanto riguarda il primo aspetto i risultati presenti in letteratura sugli effetti di alti livelli di ormoni tiroidei sono eterogenei. Infatti, sono stati riportati aumenti, riduzioni o assenza di cambiamenti della secrezione dell'insulina associati con l'ipertiroidismo [86].

Anche per quanto riguarda gli effetti dell'ipertiroidismo sull'IR sono riportati risultati variabili, così sebbene l'IR sia comunemente osservata nell'ipertiroidismo [86] e l'IR epatica sia ben stabilita, ci sono effetti contrastanti sull'IR nei tessuti periferici [87].

Come nell'obesità anche nella condizione di ipertiroidismo si assiste ad un aumento del danno ossidativo. I dati attualmente disponibili indicano che nell'ipertiroidismo spontaneo e indotto

sperimentalmente si assiste ad un aumento del danno ossidativo nei tessuti bersaglio dell'ormone causato da un'alterazione nel bilancio tra proossidanti ed antiossidanti dovuto ad un aumento della produzione di ROS e di RNS [88-90].

Attualmente si stanno accumulando prove che lo stress ossidativo dovuto all'ipertiroidismo sia responsabile di alcune delle complicazioni dell'ipertiroidismo, compresa la miopatia tireotossica, [91] danni al fegato [92] e alterazioni dell'attività elettrica [93].

Inoltre, l'idea che lo stress ossidativo sia alla base delle disfunzioni prodotte dall'ipertiroidismo non è in contrasto con la mediazione dell'azione della T_3 attraverso eventi nucleari. Infatti, alcuni dei cambiamenti biochimici che favoriscono l'induzione dello stress ossidativo, compreso l'aumento dei livelli mitocondriali dei carriers che sono in grado di cedere elettroni all'ossigeno con formazione di superossido, i così detti carriers autossidabili, l'attività della NOX, e il grado di insaturazione dei lipidi, sono probabilmente dovuti alla stimolazione dell'espressione di specifici geni indotta dal legame della T_3 con recettori nucleari.

Trattamenti cronici con T_3 hanno confermato che l'ormone tiroideo agisce anche sul rilascio mitocondriale di H_2O_2 . Infatti, 10 giorni di somministrazione di T_3 (10 g/100 g di peso corporeo) ad animali ipotiroidei aumenta la velocità di rilascio di H_2O_2 da parte dei mitocondri del fegato [94], del muscolo scheletrico (gastrocnemio) [95] e del cuore [96]. Lo stesso trattamento con ormoni tiroidei aumenta il danno ossidativo a lipidi e proteine e la suscettibilità a danno ossidativo nel fegato, cuore e mitocondri muscolari [97]. Finora, il coinvolgimento delle ROS nell'IR indotta dall'ormone tiroideo non è stato studiato.

Solo un autore ha associato lo sviluppo del diabete nell'ipertiroidismo con lo stress ossidativo. Infatti, Kocic [98] ha trovato un aumento significativo nella concentrazione plasmatica di prodotti di degradazione dei lipidi danneggiati ossidativamente in un paziente che ha sviluppato diabete mellito durante l'ipertiroidismo. Poiché i radicali liberi sono aumentati nella condizione di tireotossicosi [91] ed era stato ipotizzato che le ROS sono capaci di ridurre la sensibilità all'insulina [99] gli autori suggerirono che l'aumentato stress ossidativo durante l'ipertiroidismo potrebbe essere responsabile dello sviluppo del diabete.

Poiché la tolleranza al glucosio dipende dall'interazione tra la sensibilità dei tessuti all'insulina e l'ampiezza della secrezione pancreatica di insulina è ipotizzabile che l'alterazione della tolleranza al glucosio dipenda da un'aumentata produzione di ROS che altera la sensibilità all'insulina e/o la secrezione dell'insulina.

Finora, mancano prove di un legame tra lo stress ossidativo indotto dall'ormone tiroideo e la IR tissutale. Viceversa, vi sono prove indirette che l'ormone tiroideo possa ridurre la secrezione dell'insulina attraverso un aumento degli ossidanti nelle cellule β .

Vitamina E

Quando la generazione cellulare di ROS aumenta superando la capacità di neutralizzazione dei sistemi antiossidanti mitocondriali, i componenti della catena respiratoria e gli enzimi del ciclo di Krebs possono essere disattivati. Ciò può portare a disfunzione mitocondriale, che può avere conseguenze dannose per le cellule e l'intero organismo, con conseguenti disturbi metabolici e neurodegenerativi tra cui diabete di tipo 2, obesità, demenza e invecchiamento. Il sistema di difesa antiossidante mitocondriale comprende antiossidanti a basso peso molecolare e una serie di enzimi in grado di eliminare le ROS o riparare i danni che causano alle macromolecole biologiche.

Un importante sito di danno ossidativo è il doppio strato fosfolipidico delle biomembrane, con formazione di radicali perossilici e attivazione della cascata perossidativa.

Il principale antiossidante nelle membrane mitocondriali è la vitamina E liposolubile che può reagire con i radicali perossilici più velocemente delle molecole degli acidi grassi polinsaturi, proteggendo così le membrane mitocondriali da un eccessivo danno ossidativo [100].

La proprietà antiossidante della vitamina E è dovuta in primo luogo alla sua capacità di disattivare l'ossigeno singoletto ($^1O^2$) mediante *quenching*. È stato dimostrato che una molecola di α -Tocoferolo può disattivare fino a 120 molecole di $^1O^2$ prima della sua degradazione [101].

I tocoferoli possono anche agire come potenti antiossidanti che rompono la catena di perossidazione, eliminando chimicamente $^1O^2$ e i radicali perossilici. La prima azione produce irreversibilmente chinoni ed epossidi, mentre la seconda porta alla formazione del radicale tocoferossilico [102].

Questo radicale può essere riciclato in α -tocoferolo dall'ascorbato. Pertanto, i tocoferoli possono intrappolare gli intermedi radicalici che si propagano prodotti durante la perossidazione lipidica e arrestare le reazioni a catena.

I tocoferoli possono anche stabilizzare le strutture della membrana interagendo con le catene aciliche dei grassi polinsaturi (funzioni non antiossidanti) [103]

In generale, si presume che il principale ruolo biologico della vitamina E sia quello di proteggere gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) e altri componenti delle membrane cellulari e delle lipoproteine a bassa densità (LDL) dall'ossidazione da parte dei radicali liberi [104]. È stato anche riferito che la vitamina E rappresenta la maggior parte dell'attività antiossidante liposolubile nei tessuti e nel plasma dei mammiferi e la sua carenza è stata associata ad un elevato rischio di aterosclerosi e altre malattie degenerative.

In base alla sua attività antiossidante, la vitamina E riduce i processi infiammatori limitando la generazione di ROS e i loro effetti dannosi [105].

Infatti, Calder ha dimostrato che l' α -tocoferolo riduce il rilascio di citochine pro-infiammatorie e l'attivazione di NF- κ B [105].

È importante sottolineare che con il termine vitamina E si indicano otto diverse molecole, sintetizzate solo nei plastidi degli organismi fotosintetici, caratterizzate da una coda isoprenoide idrofoba, e una testa cromanolica. La coda contiene tre doppi legami nei tocotrienoli ed è saturata nei tocoferoli. Sia i tocoferoli che i tocotrienoli si distinguono in quattro differenti isoforme che differiscono in termini di numero e per la posizione dei gruppi metilici sulle teste del cromonolo [106]. Nelle piante, l' α -isoforma dei tocoferoli (α -T) è la principale isoforma presente nelle foglie, la γ -isoforma (γ -T) è la forma principale nei semi, mentre β - e δ -tocoferoli (β -T e δ -T) sono molto meno abbondante. I tocotrienoli (α , β , δ , e γ -T3) si trovano principalmente nei cereali e sono meno diffusi [100]. L' α -tocoferolo è la forma biologicamente più attiva di vitamina E nel corpo umano [107].

Scopo del lavoro

È noto che durante l'ipertiroidismo vi è un aumento dello stress ossidativo e che l'ipertiroidismo può indurre IR. Tuttavia, non sono noti i meccanismi alla base che sottendono all'insorgenza di IR.

Da studi condotti *in vitro*, sembra che vi sia un legame tra lo stress ossidativo e l'aumento dell'attivazione di JNK, e che un aumento dell'attivazione di questa chinasi sembra essere correlato,

sempre da studi condotti *in vitro*, con un aumento del grado di fosforilazione dei substrati del recettore dell'insulina su residui di serina. Ciò comporta un ingombro sterico per cui quando l'insulina interagisce con i propri recettori, non è possibile mediare l'attivazione dei pathway a valle.

Pertanto, attraverso questo studio vogliamo valutare *in vivo* il coinvolgimento dello stress ossidativo come fattore chiave nell'insorgenza dell'IR, utilizzando come modello di stress ossidativo il ratto reso sperimentalmente ipertiroideo e valutando gli effetti del trattamento con vitamina E in una dose che in precedenti studi è risultata efficace nell'attenuare il danno ossidativo in condizioni in cui si ha aumento di produzione di ROS e/o diminuzione dell'efficacia del sistema di difesa antiossidante.

Materiale e metodi

Animali

Gli esperimenti sono stati effettuati su ratti maschi di 90 giorni del ceppo Wistar (Envigo, Italia). All'ottantesimo giorno di età, gli animali sono stati divisi casualmente in quattro gruppi differenti: eutiroidei alimentati con dieta standard chow (E); eutiroidei alimentati con supplemento di α -tocoferolo (Sigma Aldrich), 650 mg ogni chilogrammo di mangime (E+VE); ipertiroidei resi tali in seguito a somministrazione intraperitoneale di T₃ (Sigma Aldrich), 50 μ g ogni 100gr di peso corporeo [108] e alimentati con dieta standard chow (H); ipertiroidei alimentati con supplemento di vitamina E (H+VE).

Gli animali sono stati stabulati, uno per gabbia, tutti alle stesse condizioni ambientali: ciclo luce/buio artificiale di 12h, temperatura 24°C \pm 1°C, umidità relativa 50 \pm 10%, e hanno ricevuto acqua e cibo *ad libitum*.

Il trattamento degli animali, in questi esperimenti era in conformità con le linee guida stabilite dall'University Animal Care Review Committee (Codice autorizzazione ministeriale 836\2019 PR).

Dopo 10 giorni di trattamento gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia previa anestesia con cloralio idrato (40mg/100g di peso corporeo), è stato rapidamente prelevato il sangue, il cuore, il fegato ed il muscolo gastrocnemio.

Il cuore, dopo essere stato lavato in soluzione fisiologica, è stato asciugato, ripulito dei grandi vasi e degli atri e pesato.

I livelli circolanti di free T₃ (FT3), sono valutati su campioni di plasma, utilizzando un kit ELISA (Rat Free Triiodothyronine (FT3) ELISA Kit CUSABIO (CUSABIO TECHNOLOGY LLC)) [109].

Preparazione omogenati tissutali e mitocondriali

Il fegato e il muscolo sono stati rapidamente escissi e messi in una soluzione tampone (HM: mannitolo 220mM, saccarosio 70mM, EDTA 1mM, Trizma 10mM, 0,1% BSA, pH 7.4), tenuta in ghiaccio.

Aliquote di tessuto sono state congelate a -80°C per le metodiche di Western Blotting.

I tessuti sono stati pesati, finemente sminuzzati, lavati e delicatamente omogenizzati in HM usando un omogenizzatore Potter-Elvehjem di vetro con pistone di teflon. Per l'omogeneizzazione si sono utilizzate le seguenti condizioni: velocità di rotazione del pistone 500 r.p.m. tempo di omogenizzazione 1 minuto. L'omogenato è stato preparato alla concentrazione 1: 5 ossia di 1 grammo di tessuto su 5 mL di volume finale. Aliquote di omogenato 1:5 sono state utilizzate per le procedure analitiche e per la preparazione delle frazioni mitocondriali.

Aliquote di tessuto sono state congelate a -80°C per le metodiche di Western Blotting.

Per la preparazione delle frazioni mitocondriali, gli omogenati sono stati centrifugati a 500g per 10 min. a 4°C per eliminare i debris e nuclei. Il surnatante è stato centrifugato a 3000g per 10 min a 4°C, per ottenere i pellets mitocondriali. Questi sono stati risospesi in soluzione lavaggio (WB) (mannitolo 220mM, saccarosio 70mM, EGTA 1mM, Trizma 20mM, pH 7.4). Le preparazioni mitocondriali sono state risospese e rilavate due volte prima di essere sospesi in fine in WB.

Il contenuto proteico mitocondriale è stato determinato con il metodo del biuretto [110] utilizzando la BSA come standard.

Contenuto tissutale di Vitamina E

Per la determinazione della vitamina E, le aliquote tissutali sono state deproteinizzate con metanolo ed estratte con n-esano. Gli estratti sono stati evaporati sotto N₂ a 40°C ed i residui sono stati sciolti

in etanolo. Il contenuto di vitamina E è stato determinato utilizzando la procedura HPLC di Lang et al. [111]. La quantificazione è stata ottenuta utilizzando uno standard esterno.

Danno ossidativo ai lipidi ed alle proteine

Il contenuto di idroperossidi lipidici (HPs) è stato utilizzato per misurare l'entità dei processi perossidativi lipidici negli omogenati di tessuto e nei mitocondri secondo la metodica di Heath e Tappel [112].

Il contenuto di HPs è stato determinato seguendo spettrofotometricamente la velocità del consumo del NADPH per la rigenerazione del glutatione ossidato nella reazione di eliminazione degli idroperossidi lipidici. Le reazioni coinvolte sono le seguenti:

Nella prima reazione, catalizzata dall'enzima glutatione perossidasi (GPX), il GSH reagendo con gli idroperossidi è ossidato a GSSG:



Nella seconda, il GSSG viene riconvertito a GSH dall'enzima glutatione reduttasi (GR), che sfrutta il potere riducente del NADPH, ossidandolo a NADP^+ :

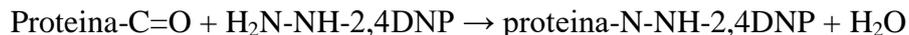


La procedura si articola nelle seguenti fasi: 1) incubazione dei campioni sono incubati in soluzione tampone (EDTA 0,2 mM, Trizma 0,124 mM, pH 7,6) per 5 minuti a temperatura ambiente; 2) innesco della prima reazione aggiungendo in rapida successione GSH 4,25 mM, NADPH 2 mM e GPX 2,5 U/mL; 3) incubazione a 33°C per 15 minuti; 4) innesco della seconda reazione aggiungendo 2,5 U/mL di GR. Le letture sono state effettuate a 340 nm, per 15 minuti, al fine di valutare le variazioni nella quantità di NADPH.

Per determinare il danno ossidativo occorso alle proteine è stata saggiata la quantità di carbonili legati alle proteine (C=O) negli omogenati secondo la procedura di Reznick e Packer [113] e nei mitocondri secondo la procedura modificata di Schild [114].

La metodica utilizza come markers dell'ossidazione proteica i gruppi carbonilici (C=O) che si formano in seguito a ossidazione, da parte delle ROS, dei gruppi amminici delle catene laterali degli amminoacidi lisina, arginina, prolina ed istidina. Le reazioni ossidative sono catalizzate da cationi metallici come Fe^{2+} e Cu^{2+} , che si legano a specifici siti delle proteine.

La quantificazione dei gruppi carbonilici è stata effettuata con una metodica spettrofotometrica che consente di valutare i prodotti di reazione (idrazoni) della dinitrofenilidrazina (DNPH) con i gruppi carbonilici delle proteine:



Per ogni determinazione sono state utilizzate due aliquote di omogenato, 0,5mL ciascuna, le quali sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente con tampone fosfato 50mM (digitonina 0,1%, fenilmetilsulfonil-metile (PMSF) 40µg/mL, aprotonina 5µg/mL, EDTA 1 mM) e successivamente centrifugate a 10000 r.p.m. per 10 minuti; il surnatante è stato poi incubato con streptomina 1% a temperatura ambiente per 10 minuti, per far precipitare il DNA, e centrifugato nuovamente a 10000 r.p.m. per 10 minuti.

In seguito, in una delle due aliquote sono stati aggiunti 4 mL di HCl 2,5M (denominato Bianco), nell'altra 4mL di DNPH 10mM in HCl 2.5M. I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata dall'aggiunta di 5mL di TCA al 20% (acido tricloroacetico, in grado di far precipitare le proteine in soluzioni acquose) e i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati una volta con 4mL di TCA 10%, tre volte con 4mL di una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v) per eliminare i lipidi, e alla fine sono stati disciolti in 2mL di idrocloruro di guanidina 6M (per la denaturazione proteica).

Per i mitocondri sono state utilizzate aliquote contenenti 0,5 mg di proteine mitocondriali. Sono state precipitate in acido tricloroacetico (TCA) al 10%, centrifugate, risospese in 300µL di NaOH 0,1M e incubate a temperatura ambiente per 5 minuti. In una delle due aliquote sono stati aggiunti 2mL di HCl 2,5M (denominato Bianco), nell'altra 2mL di DNPH 10mM in HCl 2,5M. I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata dall'aggiunta di 1,65mL di TCA al 20% e i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati una volta con 1,5mL di TCA 10%, tre volte con una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v) e alla fine sono stati disciolti in 1mL di idrocloruro di guanidina 6 M.

I prodotti delle reazioni sono stati letti spettrofotometricamente a 355nm e a 390nm, per l'omogenato, e a 370nm per i mitocondri, che corrispondono alle lunghezze d'onda a cui si hanno i picchi di massimo assorbimento della DNPH. Il contenuto di carbonili è stato, quindi, calcolato utilizzando il coefficiente di estinzione molare degli idrazoni alifatici ($22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ed espresso come nmoli/mg di proteine.

Suscettibilità allo stress

La suscettibilità allo stress ossidativo del tessuto e dei mitocondri è stata valutata mediante la variazione del contenuto di idroperossidi lipidici in seguito all'incubazione dei campioni con una miscela di ferro e ascorbato (Fe/As), ad una concentrazione di 100/1000 μM , per 10 min a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata aggiungendo 0,2% 2,6-di-t-butil-p-cresolo (BHT) e il contenuto di idroperossido è stato valutato come precedentemente descritto [112].

Produzione di ROS

Contenuto cellulare di ROS (DCF)

Il contenuto cellulare delle ROS è stato determinato in seguito alla conversione indotta dalle ROS della 2',7'-diclorodiidrofluoresceina diacetato (Sigma Aldrich) (DCFH-DA, composto non fluorescente) in diclorofluorescina (DCF, composto fluorescente) [115,116]

Gli omogenati sono stati diluiti 1:400 in buffer fosfato in modo da ottenere una concentrazione in camera pari a 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di proteine. I campioni sono stati incubati per 15 minuti con DCFH-DA 10 μM , a temperatura ambiente, per permetterne l'incorporazione in vescicole di membrana in seguito alla scissione del gruppo diacetato ad opera di esterasi. Successivamente, è stato aggiunto FeCl_3 100 μM che permette la conversione operata dalle ROS della DCFH-DA nel prodotto fluorescente DCF. La lettura è stata effettuata dopo 30 minuti di incubazione utilizzando un lettore di micropiastre multimodale (Synergy™ HTX Multimode Microplate Reader, BioTek) con lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione di 485 e 530 nm, rispettivamente. La fluorescenza di fondo (conversione di DCFH in DCF in assenza di omogenato e mitocondri) è stata corretta con bianchi paralleli. Il dato è stato espresso come Unità di Fluorescenza Relativa (RFU) $\cdot \text{mg proteina}^{-1}$ [117]

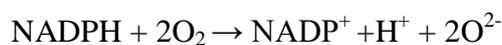
Rilascio di H_2O_2 mitocondriale

La velocità mitocondriale del rilascio di H_2O_2 è stata determinata utilizzando un fluorimetro (JASCO Deutschland GmbH) controllato da computer dotato di una cella termostata a 30°C. L'aumento della fluorescenza (eccitazione a 320 nm, emissione a 400 nm) è legato all'ossidazione della p-idrossifenilacetato (PHPA) in presenza di H_2O_2 , catalizzato dalla perossidasi di rafano (HRP) [118]. Nei nostri esperimenti 0,1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ di proteine mitocondriali sono state incubate con la soluzione di reazione (HRP 6 μmL , PHPA 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, KCl 145 mM , Hepes 30 mM , KH_2PO_4 5 mM , MgCl_2 3 mM , EGTA 0.1 mM , 1% BSA, pH 7.4).

La reazione è stata indotta dall'aggiunta di substrati respiratori legati al complesso I, 10mM di piruvato / 2,5mM di malato. Per ottenere informazioni sul rilascio di H₂O₂ durante lo stato 3 della respirazione mitocondriale, è stato aggiunto ADP alla concentrazione 500µM.

Attività dell'enzima NADPH ossidasi

La NADPH ossidasi è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi che catalizza la formazione dell'anione superossido secondo la reazione:



L'attività dell'enzima è stata valutata spettrofotometricamente seguendo la riduzione del ferricitocromo c acetilato [119] (80µM in camera), a 550nm, in seguito all'aggiunta in camera di 0.2mg di proteine e NADH in buffer fosfato per 10 minuti a temperatura ambiente, a cui segue una seconda lettura nelle stesse condizioni in seguito all'aggiunta di SOD.

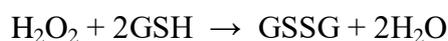
Le membrane mitocondriali possono ridurre il ferricitocromo c acetilato a una velocità di 0.5 nmol/min · mg proteina e tale reazione può essere inibita per l'82% dall'enzima superossido dismutasi 2.8 · 10⁻⁸M. Per cui, l'attività della NOX è calcolata a partire dalla velocità iniziale della riduzione del citocromo c acetilato e sottraendo la pendenza della riduzione in presenza di 100µg/mL di SOD. [120,121]

Attività degli enzimi antiossidanti (GPX, GR, SOD, Catalasi)

Glutatione perossidasi

L'attività dell'enzima glutazione perossidasi è stata valutata secondo la metodica descritta da Flohé e Günzler [122].

La GPX catalizza la reazione in cui il perossido di idrogeno è ridotto ad H₂O e il GSH è ossidato a GSSG:



Il GSSG viene poi riconvertito dalla GR a GSH a spese del NADPH:



L'attività accoppiata del sistema enzimatico GPX/GR è stata quindi valutata seguendo la riduzione di assorbimento del NADPH con uno spettrofotometro.

La determinazione è stata effettuata utilizzando 1mL di mezzo di reazione contenente: tampone potassio fosfato monobasico 0.1M + EDTA 1mM, pH7.0; sodio azide 10mM in tampone (per inibire l'attività della catalasi); GSH 10mM in tampone fosfato monobasico; GR 2.40U/mL in tampone fosfato monobasico. Il campione (40 mg/mL di proteine) è stato incubato in tale miscela per 5 minuti a temperatura ambiente. In seguito, è stato aggiunto NADPH 1,5mM in bicarbonato di sodio 0.1M, lasciandolo in incubazione per altri 5 minuti. La reazione è stata innescata dall'aggiunta dell'H₂O₂ 1,5mM in H₂O distillata. La lettura dell'assorbimento è stata effettuata a 340nm in cuvette di quarzo da 3mL, agitate a 200 r.p.m., ad una temperatura di 37°C.

Il consumo di NADPH è stato ottenuto dividendo la variazione di assorbimento per il coefficiente di estinzione molare moltiplicato per la quantità di proteine cellulari presenti in camera. In questo modo l'attività dell'enzima GPX è stata espressa in μmoli di NADPH consumato/min · mg di proteine.

Glutatione reduttasi

La GR catalizza la reazione in cui il glutatione ossidato (GSSG) viene convertito nella sua forma ridotta (GSH), a spese del NADPH:



La valutazione dell'attività dell'enzima GR è stata effettuata seguendo spettrofotometricamente la riduzione di assorbimento a 340nm, lunghezza d'onda cui assorbe il NADPH nella forma ridotta [123].

Superossido dismutasi

L'attività dell'enzima superossido dismutasi (SOD) è stata valutata seguendo l'aumento dell'assorbimento a 550 nm del citocromo c, il quale viene ridotto dall'anione superossido O²⁻ prodotto dal sistema xantina-xantina ossidasi. La xantina-ossidasi è l'enzima che ossida la ipoxantina (prodotta dalla degradazione dell'adenosina a sua volta derivante dal catabolismo dell'ATP) ad acido urico usando come substrato l'ossigeno e producendo nel corso della reazione l'anione superossido. Al termine della lettura verrà costruita una retta di calibrazione in cui il reciproco delle variazioni di Abs/min del citocromo c viene riportato in funzione della concentrazione di proteine del campione. In questo modo otterremo una relazione di tipo lineare

dalla quale sarà possibile ricavare l'attività del campione espressa come U/mg di proteine sapendo che una Unità di SOD è definita come la quantità di enzima che inibisce del 50% la riduzione del citocromo c. [124].

Catalasi

L'attività dell'enzima catalasi, è stata determinata secondo il metodo di Aebi [125] in seguito alla completa lisi degli organelli presenti nel campione, la quale si ottiene diluendo lo stesso in detergente triton. In seguito all'incubazione con il detergente, i campioni vengono centrifugati a 10000 r.p.m. per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è successivamente posto a dosaggio proteico. La lettura è stata effettuata a 240nm aggiungendo in camera, in tampone fosfato, 0.02mg proteine e H₂O₂ 30mM (5mM in camera) per 2 minuti a temperatura ambiente. Il risultato è espresso come $\mu\text{mol di H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$.

Respirazione cellulare

L'attività respiratoria nei tessuti e nei mitocondri isolati è stata misurata con metodica polarografica mediante l'utilizzo di un respirometro *Hansatech* dotato di elettrodo di Clark.

L'elettrodo è costituito da un catodo di platino e un anodo di argento, immersi in una soluzione salina e separati dal campione in esame tramite una membrana pervia al solo ossigeno. Il trasferimento di elettroni genera una corrente che viene letta da un computer collegato all'apparecchio. Applicando agli elettrodi un voltaggio di 0,5–0,8 V, e mantenendo la temperatura costante durante le letture, la corrente registrata dipende solo dalla concentrazione di ossigeno presente nella camera di misura. Variazioni di tali concentrazioni sono espresse in termini di variazioni di pendenza della curva disegnata sul computer.

Le misurazioni dei tassi di consumo di ossigeno negli omogenati tissutali e nei mitocondri sono state effettuate in 1,0mL di mezzo di incubazione (KCl 145mM, MgCl₂ 3mM, Hepes 30mM, EGTA 0,1mM, KH₂PO₄ 5mM, a pH 7,4) con 50 L di omogenato al 20% (p/v) o 0,25mg di proteina mitocondriale per mL, a 30°C, ponendo il campione in una camera termostata. L'aggiunta del campione in soluzione determina un temporaneo decremento della concentrazione di ossigeno in soluzione dovuto al consumo dei substrati endogeni (Fase1). Dopo la stabilizzazione, viene aggiunto substrato in eccesso, una miscela di piruvato (10mM) e malato (2,5mM), come substrati

che producono equivalenti riducenti (NADH) che entrano nella catena respiratoria a livello del complesso I, in modo da provocare un costante e prolungato consumo di ossigeno (Fase2).

La Fase 3 insorge in seguito all'aggiunta di quantità saturanti di ADP (500 μ M) che, stimolando l'ATP-sintasi, costringe il sistema a lavorare più intensamente per mantenere il gradiente protonico. Il risultato è un immediato e brusco aumento del consumo di ossigeno che declina quando tutto l'ADP è stato consumato, riportando i livelli di ossigeno a quelli osservati durante la fase 2, cioè la fase 4. La misurazione del consumo d'ossigeno durante lo stato 4 è stata effettuata in seguito all'aggiunta di oligomicina [126]

I valori raccolti durante la Fase 3 e la Fase 4 della respirazione sono espressi come nmol O/minuto \cdot gr di tessuto o mg di proteine mitocondriali.

Il rapporto tra il consumo di ossigeno in fase 3 e quello in fase 4, detto rapporto di controllo respiratorio (RCR), rappresenta un indice dell'integrità dei mitocondri: è il rapporto tra la velocità di respirazione dei mitocondri in presenza di notevoli quantità di ADP e la velocità di respirazione in assenza di ADP.

Western Blot (P-JNK, JNK, P-AKT, AKT)

I livelli di espressione di P-JNK, JNK, P-AKT, AKT e sono stati determinati tramite la metodica del Western Blot. Aliquote di tessuto sono state trattate con un tampone di omogenizzazione (p/v 1:10) contenente NaCl 500mM, nonidet P-40 allo 0.5%, EDTA 6mM, EGTA 6mM, ditiotreitolo 1mM, Tris-HCl 40mM, pH 8,0 con una miscela di antiproteasi contenente PMS (fenilmetil sulfonil fluoruro) 40 μ g/mL, leupeptina 5 μ g/mL, aprotinina 5g/mL, pepstatina 7g/ mL. Gli omogenati sono stati centrifugati a 600 g per 10 minuti a 4°C e il surnatante è stato utilizzato per determinare la concentrazione proteica tramite il metodo del biureto [110].

Le aliquote tessutali per la determinazione del rapporto P-AKT-AKT sono state pre-incubate con soluzione Krebs o con soluzione Krebs più Insulina 1 μ M, per 30 minuti a 37°C, per stimolare il pathway insulinico [127,128]

I campioni in analisi sono stati preparati per la separazione con gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) diluendo 10 μ L di sospensione proteica, contenente 1,5mg/mL di proteine, con 5 μ L di SDS al 3%, glicerolo al 30%, β -mercaptoetanololo al 15%, blu di bromofenolo allo 0.1%, Tris base 0.187M, pH 6,8 e bolliti per 5 minuti. Successivamente, 30 μ g di proteine di ciascun campione sono stati caricati sul gel SDS-PAGE alle concentrazioni 6% nello

stacking gel, e al 12% nel *running-* secondo il metodo di Laemmli [84]. Per la corsa del gel si è utilizzato un apparecchio mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories) e il gel ha corso per circa 1h a voltaggio costante (25 V).

Le proteine separate sono state trasferite su una membrana di PVDF (polivinilidenefluoruro) tramite elettroblotting, a 0,2 A per 45 minuti. Successivamente le membrane sono state incubate per una notte con gli anticorpi P-JNK, JNK, P-AKT, AKT (Santa Cruz Biotechnology) diluiti 1:1000 in NaCl 154mM, Tris-HCl 10mM, pH 8.0, latte scremato al 2.5%, Tween 20 al 10%. Il riconoscimento dell'anticorpo primario, ottenuto mediante interazione con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi del rafano (HRP), ha consentito la visualizzazione delle bande di interesse attraverso fluorescenza, con l'ausilio del ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories), dovuta alla conversione del luminolo in una sostanza fluorescente, reazione catalizzata dall'HRP in presenza di luminolo e perossido di idrogeno. Come proteina *housekeeping* è stata utilizzata la β -actina (Santa Cruz Biotechnology).

Valutazione omeostasi glicemica

La valutazione dell'omeostasi glicemica è stata effettuata il giorno prima dell'eutanasia seguendo le variazioni della glicemia e della insulinemia indotte dalla iniezione di una soluzione di glucosio. A ratti tenuti a digiuno per tutta la notte è stata somministrata per via intraperitoneale una soluzione di glucosio, 2gr / 100gr di peso corporeo [129]. Il sangue è stato collezionato tramite prelievi dalla coda al tempo 0 e dopo 15, 30, 60, 90, 120 minuti dall'iniezione.

La glicemia ematica è stata valutata grazie a un glucometro commerciale (Glucomen Areo 2K, A. Menarini Diagnostics). L'insulinemia sierica è stata valutata con un kit ELISA (Mercodia)[130].

L'indice HOMA (*Homeostasis model assessment*) [131], è stato adottato come modello matematico che descrive il grado di insulino-resistenza, calcolato dalla concentrazione sierica dell'insulina e del glucosio a digiuno:

$$\text{Glicemia a digiuno (mg/dL)} \cdot \text{Insulina a digiuno (\mu UI/ml)} \cdot 445^{-1}$$

Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come valori media \pm l'errore standard di otto diversi esperimenti. I dati sono stati analizzati con il metodo ANOVA a due vie e, quando si è trovata una differenza

significativa si è applicato il post test di **Tukey**. Le differenze tra i gruppi sono state considerate significativamente diverse quando si è trovato un valore di $(p) < 0,05$.

Risultati

Efficacia dei trattamenti

Gli istogrammi in Figura 3 mostrano gli effetti dell'ipertiroidismo indotto sperimentalmente sul rapporto tra il peso del cuore, espresso in milligrammi, e il peso del corpo, espresso in grammi e sul contenuto di triiodotironina libera. Il rapporto peso corpo peso cuore risulta significativamente aumentato negli animali resi sperimentalmente ipertiroidi, in accordo con i noti effetti dell'ormone sull'ipertrofia cardiaca [132,133]. La supplementazione con Vitamina E riduce tale rapporto negli animali ipertiroidi, che, tuttavia, risulta significativamente più alto rispetto a quello osservato negli animali di controllo e in quelli di controllo alimentati con supplemento di vitamina E. Come atteso, il contenuto di FT3 risulta significativamente maggiore negli animali trattati con l'ormone e non modificato dalla supplementazione antiossidante.

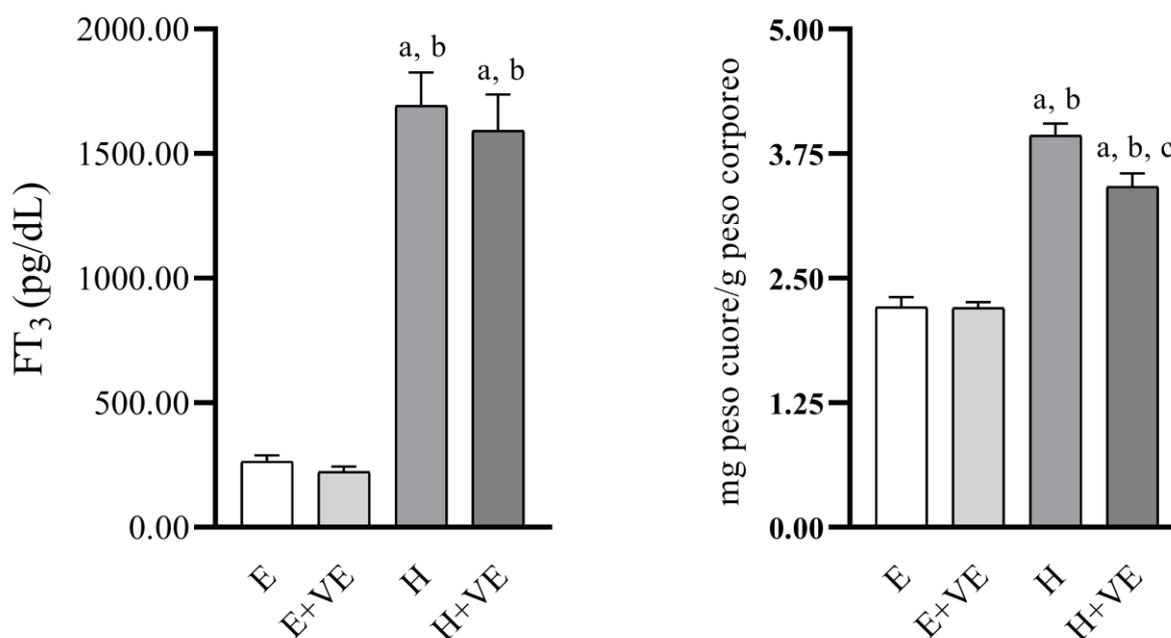


Figura 3 - Parametri ipertiroidismo.

E, animali eutiroidi; E+VE animali eutiroidi trattati con vitamina E; H animali ipertiroidi; H+VE, animali ipertiroidi trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard dei dati ottenuti su otto animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

Nella figura 4 è riportato il contenuto di vitamina E nel fegato e nel muscolo dei gruppi sperimentali. Il contenuto di vitamina E aumenta in seguito alla supplementazione con l'antiossidante sia negli animali eutiroidei che in quelli resi sperimentalmente ipertiroidei. Il contenuto di vitamina E risulta, inoltre, leggermente aumentato dall'ipertiroidismo.

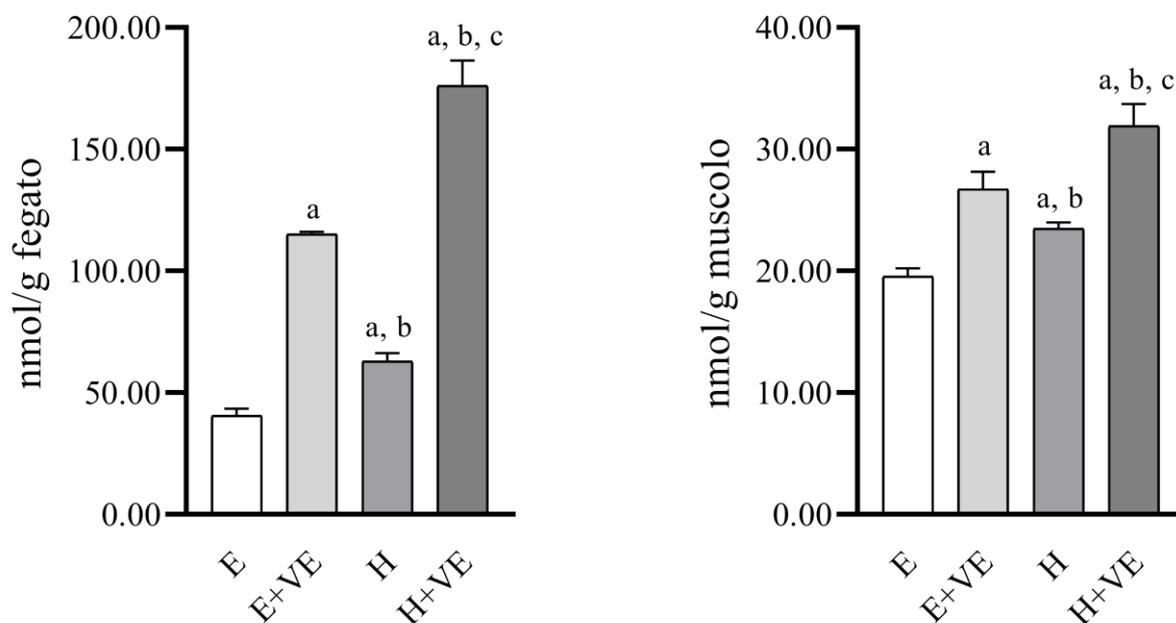


Figura 3 - Contenuto della Vitamina E nel fegato e nel muscolo.

E, animali eutiroidei; E+VE animali eutiroidei trattati con vitamina E; H animali ipertiroidei; H+VE, animali ipertiroidei trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard dei dati ottenuti su otto animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

Danno ossidativo

Gli istogrammi riportati in figura 5 mostrano le variazioni del contenuto degli indici di danno ossidativo ai lipidi (gli idroperossidi lipidici, HP) e alle proteine (i carbonili proteici, CO) negli omogenati di fegato e muscolo e nei mitocondri isolati da tali tessuti. Nei tessuti epatico e muscolare, pannelli A e B, si può osservare che i livelli di entrambi i markers aumentano significativamente negli animali resi sperimentalmente ipertiroidei. La supplementazione con vitamina E attenua tali aumenti anche se i livelli di tali indici rimangono più alti nel fegato e nel muscolo degli animali H+VE rispetto ai controlli (E). Negli animali di controllo gli indici di danno ossidativo sono significativamente ridotti dalla supplementazione con vitamina E.

Un quadro simile degli effetti dei trattamenti si riscontra anche nei mitocondri isolati da fegato e muscolo (pannelli C e D).

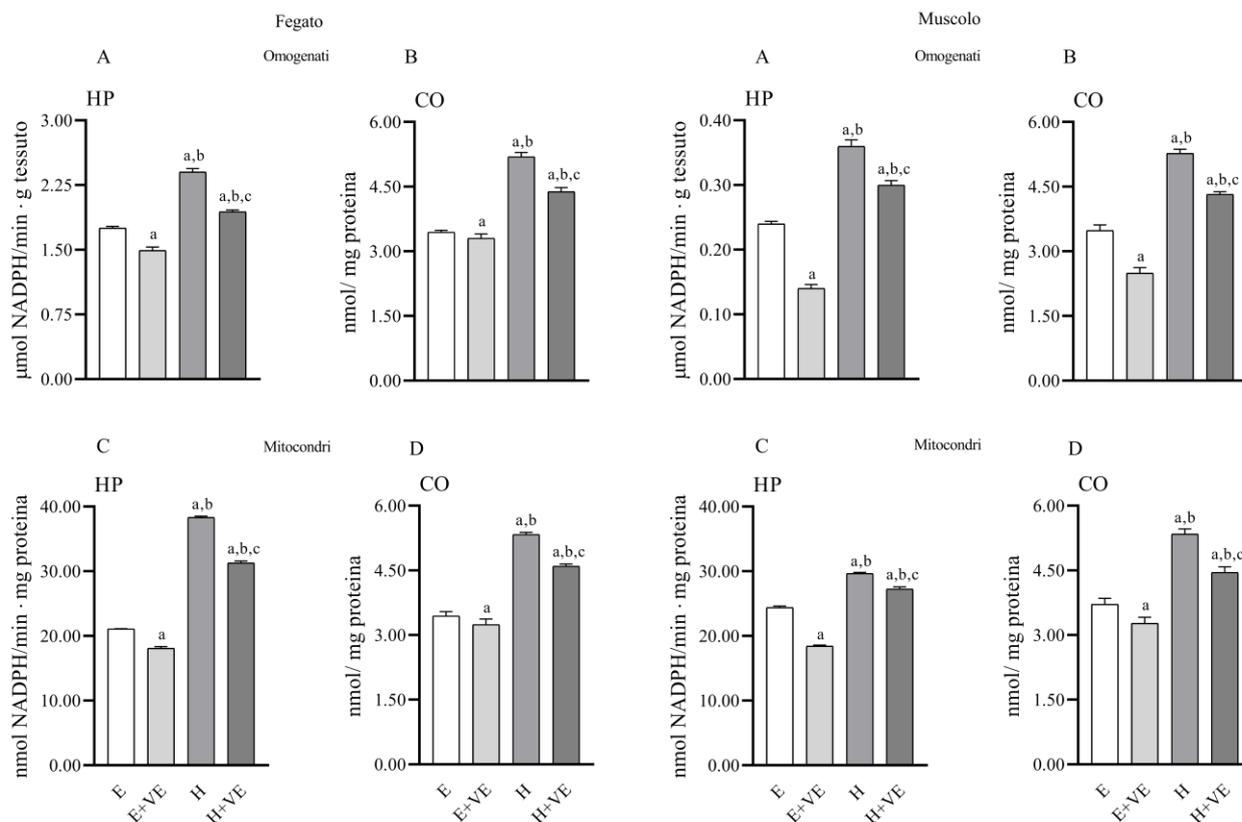


Figura 4 - Markers danno ossidativo. A) Contenuto di idroperossidi lipidici in omogenati. B) Contenuto di carbonili proteici in omogenati. C) Contenuto di idroperossidi lipidici in mitocondri. D) Contenuto di carbonili proteici in mitocondri.

E, animali eutiroidi; E+VE animali eutiroidi trattati con vitamina E; H animali ipertiroidi; H+VE, animali ipertiroidi trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard dei dati ottenuti su otto animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

Contenuto cellulare di ROS

Nella figura 6 è riportato il contenuto totale di ROS, la produzione mitocondriale di H_2O_2 e l'attività dell'enzima NADPH ossidasi nel fegato e nel muscolo.

Il contenuto totale di ROS nel fegato e nel muscolo è riportato nei pannelli A. Tale contenuto aumenta significativamente negli animali resi sperimentalmente ipertiroidi ed è ridotto dal trattamento con la vitamina E sia negli animali eutiroidi che in quelli ipertiroidi. In questi ultimi, tuttavia, la riduzione indotta dalla vitamina E non è sufficiente a riportare il contenuto di ROS ai livelli osservati nei controlli.

Il rilascio mitocondriale di ROS è stato valutato durante la respirazione sostenuta da piruvato più malato come substrati respiratori, in condizioni basali (Stato 4, pannelli C) e stimolata da ADP (Stato 3, pannelli B). L'ipertiroidismo aumenta il rilascio dell'idroperossido in entrambi i tessuti ed in entrambe le fasi della respirazione. Il trattamento con l'antiossidante riduce il rilascio mitocondriale di ROS negli animali ipertiroidei in entrambi i tessuti ed in entrambe le fasi della respirazione. La riduzione è tale che la velocità di rilascio di H₂O₂ ritorna ai livelli osservati nei controlli tranne che nello stato 4 nel fegato, in cui rimane più alta.

Nei pannelli D sono riportate le attività dell'enzima NOX in entrambi i tessuti. Le attività dell'enzima sono aumentate dall'ipertiroidismo e gli aumenti indotti dalla T₃ sono attenuati dalla supplementazione con vitamina E. La vitamina E riduce l'attività dell'enzima NOX anche negli animali eutiroidei.

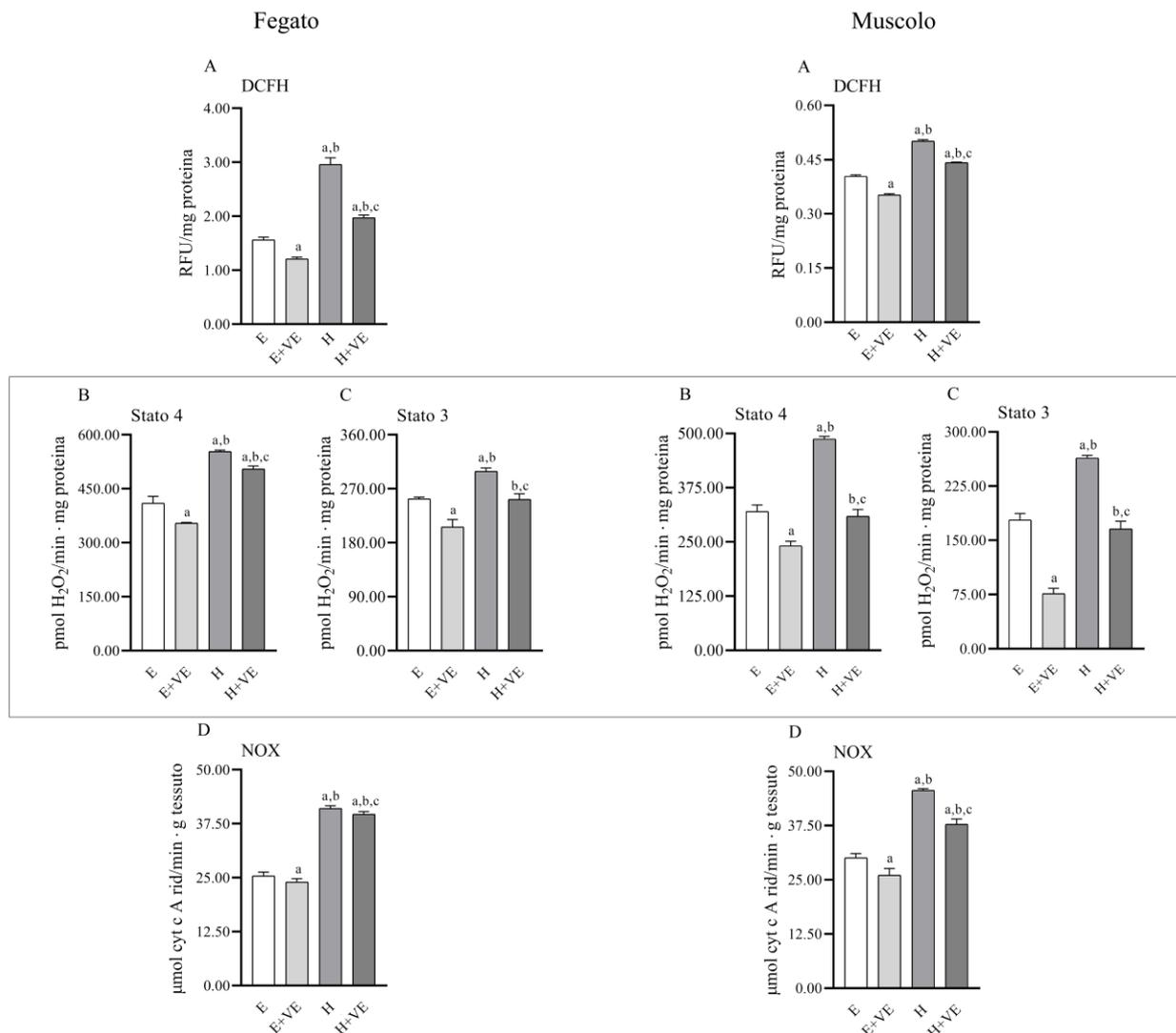


Figura 5 - Contenuto cellulare di ROS. A) Contenuto cellulare di ROS. B) Rilascio di H₂O₂ durante lo stato 4 della respirazione mitocondriale. C) Rilascio di H₂O₂ durante lo stato 3 della respirazione mitocondriale. D) Attività dell'enzima NADPH ossidasi.

E, animali eutiroidi; E+VE animali eutiroidi trattati con vitamina E; H animali ipertiroidi; H+VE, animali ipertiroidi trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard dei dati ottenuti su otto animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

Attività enzimi antiossidanti

Negli istogrammi presenti in figura 7 sono riportate le attività dei principali enzimi antiossidanti presenti nei tessuti epatico e muscolare (glutazione perossidasi, GPX; glutazione reduttasi, GR; catalasi, e superossido dismutasi SOD). L'ipertiroidismo provoca un aumento significativo delle attività di tutti gli enzimi antiossidanti mentre il trattamento con la vitamina E riduce tali aumenti. Le attività degli enzimi antiossidanti sono ridotte in alcuni casi anche negli animali eutiroidi dalla supplementazione antiossidante (GPX in fegato e muscolo, GR solo nel muscolo, SOD nel fegato).

L'ipertiroidismo influenza anche le attività degli enzimi GPX e GR nei mitocondri di fegato e muscolo (Figura 8). Le attività di GPX e GR mitocondriali sono aumentate dall'ipertiroidismo, mentre la supplementazione con vitamina E provoca una riduzione significativa di tali attività non solo nei mitocondri degli animali ipertiroidici ma anche in quelli degli animali eutiroidei.

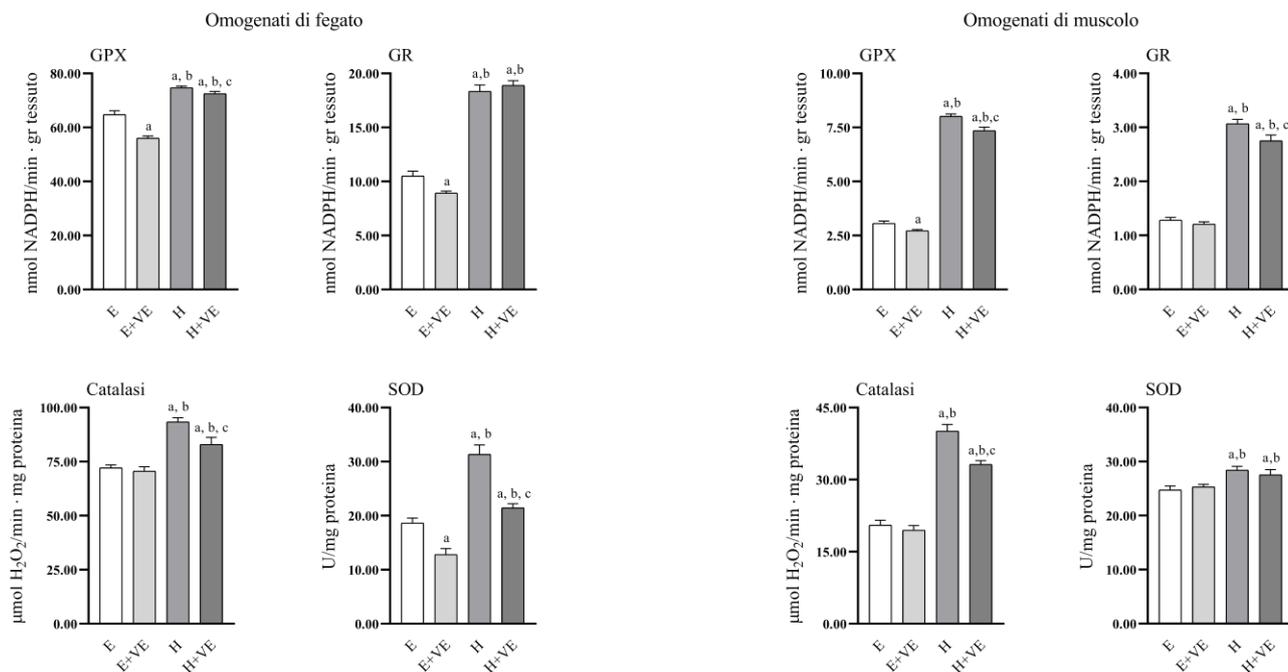


Figura 6 - Attività enzimi antiossidanti: Glutazione Perossidasi (GPX), Glutazione Reduttasi (GR), Catalasi, Superossido Dismutasi (SOD).

E, animali eutiroidei; E+VE animali eutiroidei trattati con vitamina E; H animali ipertiroidici; H+VE, animali ipertiroidici trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media ± l'errore standard dei dati ottenuti su otto animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

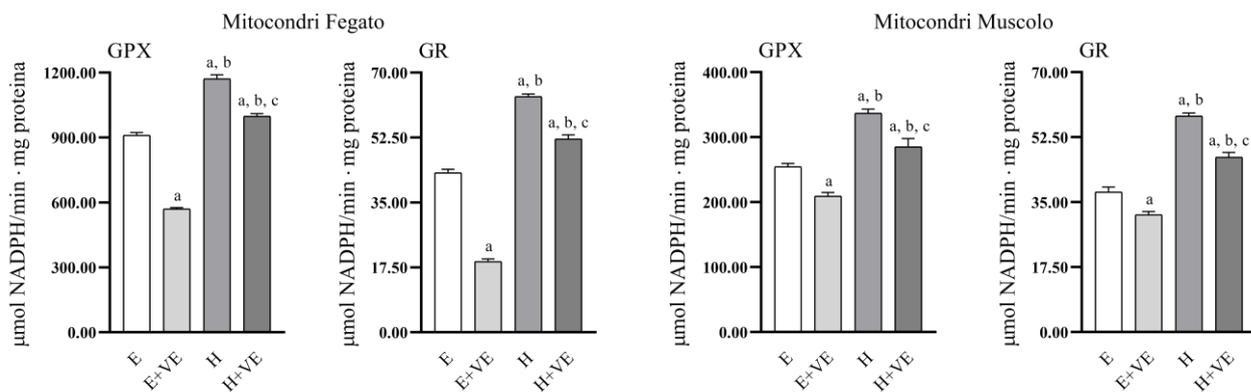


Figura 7 - Attività enzimi antiossidanti mitocondriali: Glutazione Perossidasi (GPX), Glutazione Reduttasi (GR).

E, animali eutiroidei; E+VE animali eutiroidei trattati con vitamina E; H animali ipertiroidici; H+VE, animali ipertiroidici trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media ± l'errore standard dei dati ottenuti su otto animali per gruppo.

Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

Suscettibilità allo stress ossidativo

In figura 9 è riportata la risposta *in vitro* ad un insulto ossidativo valutata in termini di variazioni del contenuto di idroperossidi lipidici. I tessuti epatico e muscolare e i mitocondri da essi isolati risultano meno capaci di fronteggiare un insulto ossidativo, come si evince dal maggiore aumento dei livelli di idroperossidi. La supplementazione con vitamina E potenzia la resistenza alla sfida ossidativa sia nei preparati eutiroidei che ipertiroidei. Tuttavia, i preparati ipertiroidei rimangono più sensibili allo stress ossidativo di quelli ipertiroidei.

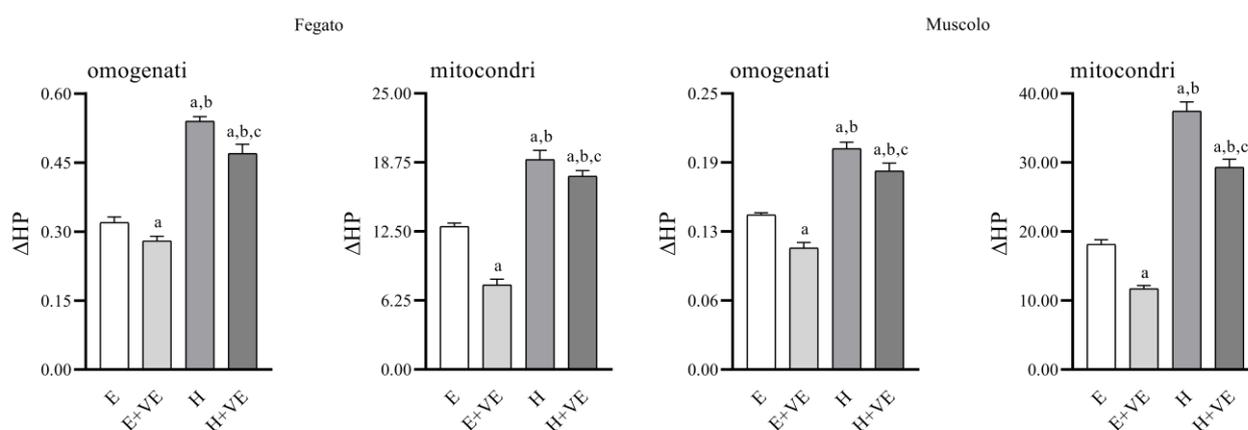


Figura 8 – Variazione del contenuto idroperossidi in seguito all'induzione di stress ossidativo *in vitro* con Fe^{2+} + ascorbato, nel tessuto epatico e muscolare.

E, animali eutiroidei; E+VE animali eutiroidei trattati con vitamina E; H animali ipertiroidei; H+VE, animali ipertiroidei trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard dei dati ottenuti su otto animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

Respirazione cellulare e mitocondriale

In figura 10 è riportato il consumo di ossigeno tissutale e mitocondriale misurato in presenza di piruvato più malato come substrati respiratori durante la respirazione basale (Stato 4) e stimolata da ADP (Stato 3).

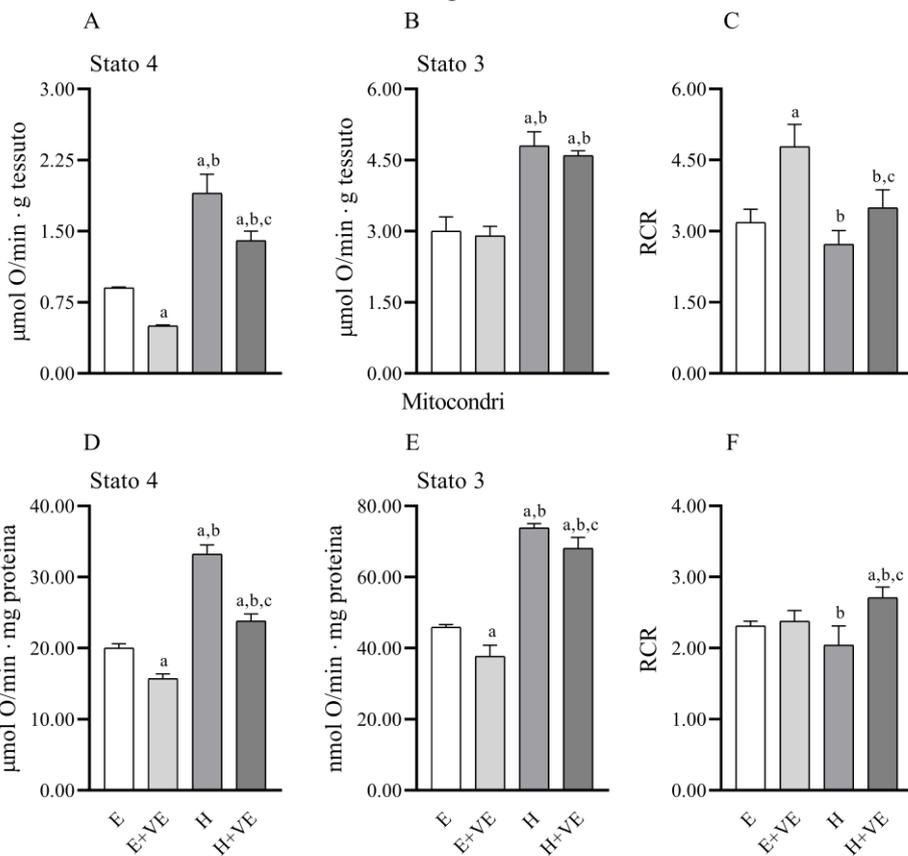
Nei tessuti epatico e muscolare l'ipertiroidismo determina un aumento del consumo in entrambi gli stati della respirazione. Il trattamento con vitamina E riduce significativamente gli aumenti indotti dall'ormone del consumo di ossigeno in stato 3 solo nel tessuto epatico e solo negli animali resi sperimentalmente ipertiroidei. Una riduzione significativa della velocità del consumo di ossigeno si

osserva durante lo stato 4 della respirazione sia negli animali eutiroidei che ipertiroidei, anche se in questi ultimi rimane significativamente maggiore rispetto a quella osservata negli animali ipertiroidei.

Nei mitocondri l'ipertiroidismo aumenta la velocità del consumo di ossigeno in entrambi gli stati della respirazione. Il trattamento con vitamina E riduce la velocità della respirazione sia durante lo stato 3 che durante lo stato 4 della respirazione negli animali eutiroidei ed ipertiroidei. Negli animali ipertiroidei e trattati con l'antiossidante le velocità del consumo di ossigeno rimangono più elevate che negli animali ipertiroidei in entrambi gli stati della respirazione.

Fegato

Omogenati



Muscolo

Omogenati

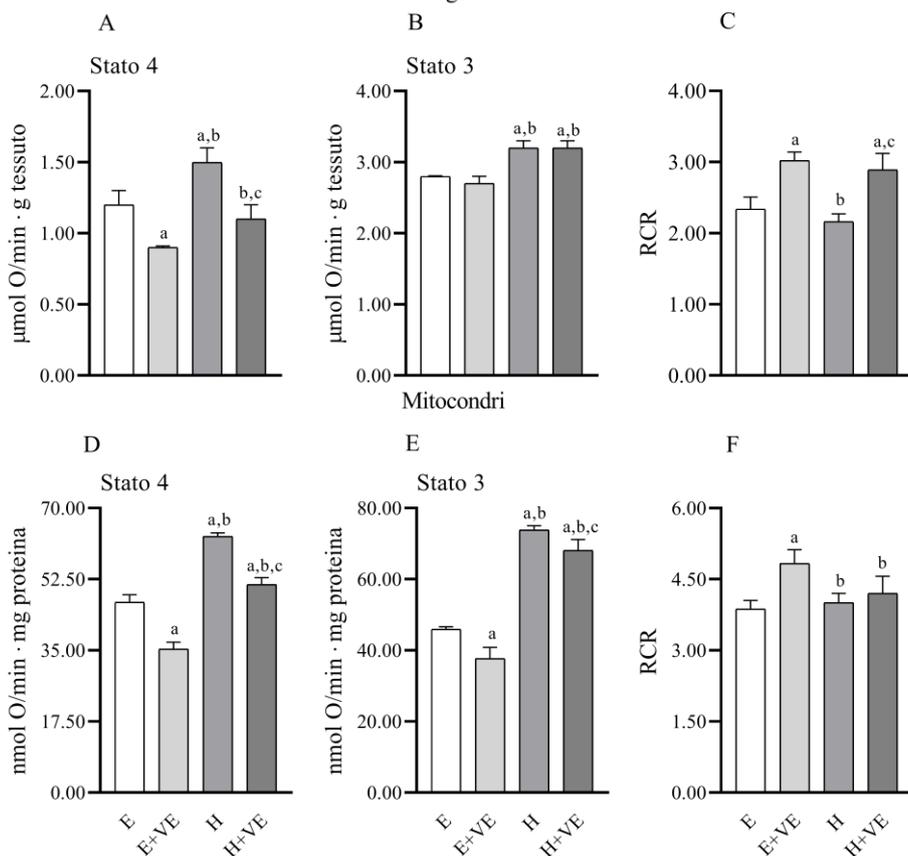


Figura 9 - Consumo d'ossigeno durante la respirazione mitocondriale. A) Consumo d'ossigeno durante lo stato basale, stato 4, della respirazione in omogenato. B) Consumo d'ossigeno durante lo stato stimolato con ADP, stato 3, della respirazione in omogenato. C) Rapporto tra stato 3 e stato 4 della respirazione in omogenato. D) Consumo d'ossigeno durante lo stato basale, stato 4, della respirazione nei mitocondri. E) Consumo d'ossigeno durante lo stato stimolato con ADP, stato 3, della respirazione nei mitocondri. F) RCR, rapporto del controllo respiratorio ottenuto dal rapporto tra stato 3 e stato 4 della respirazione nei mitocondri.

E, animali eutiroidi; E+VE animali eutiroidi trattati con vitamina E; H animali ipertiroidi; H+VE, animali ipertiroidi trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard dei dati ottenuti su otto animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

P-JNK/JNK

In figura 11 sono riportati negli istogrammi i rapporti tra le densitometrie ottenute dai blotting di JNK fosforilata e non fosforilata nel tessuto epatico e muscolare e nelle immagini un blotting rappresentativo di JNK fosforilato, non fosforilato e della proteina di controllo *housekeeping*, la beta actina. Negli animali ipertiroidi vi è un significativo aumento del contenuto di JNK fosforilata. Il trattamento con vitamina e non influenza il contenuto di JNK-P negli animali eutiroidi, ma attenua l'aumento indotto dall'ipertiroidismo.

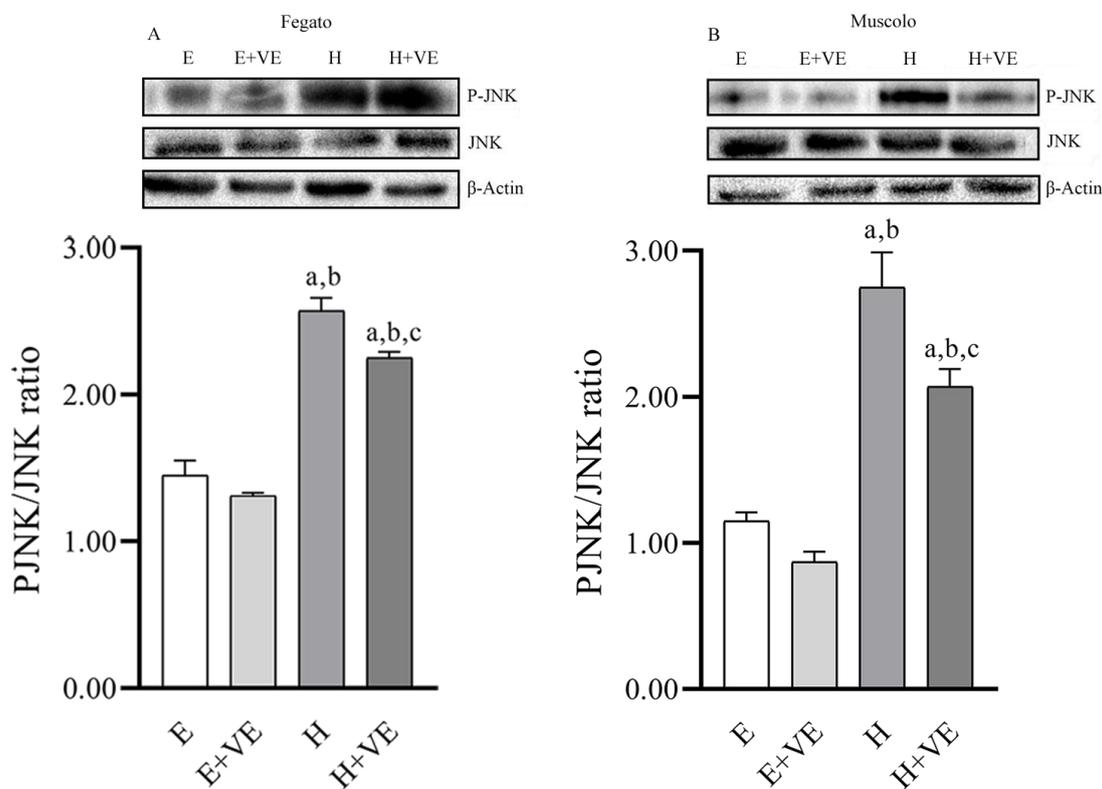


Figura 10 - Rapporto tra l'espressione della forma fosforilata di c-Jun-NH₂ Terminal Kinase e la forma non fosforilata.

E, animali eutiroidi; E+VE animali eutiroidi trattati con vitamina E; H animali ipertiroidi; H+VE, animali ipertiroidi trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard dei dati ottenuti su 4 animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

Parametri omeostasi glicemica

Negli animali ipertiroidei i livelli basali di glicemia a digiuno risultano significativamente più alti di quelli degli animali ipertiroidei alimentati con supplemento antiossidante, infatti il trattamento con vitamina E riporta tali livelli a quelli osservati negli animali di controllo. In seguito ad un carico di glucosio negli animali ipertiroidei i valori della glicemia sono più alti di quelli degli animali di controllo a 15 e 30 minuti e, in seguito, ritornano ai livelli osservati negli animali di controllo. La supplementazione con vitamina E negli animali ipertiroidei ha l'effetto di rendere le variazioni della glicemia in seguito al carico di glucosio non diverse rispetto a quelle osservate negli animali di controllo.

I livelli di insulina negli animali ipertiroidei sono più alti rispetto ai controlli a tutti i tempi di determinazione. Il trattamento con vitamina E abbassa i livelli di insulina negli animali ipertiroidei, che comunque rimangono significativamente più alti rispetto agli animali di controllo. In seguito a carico di glucosio i livelli di insulina negli animali H+ VE rimangono significativamente maggiori rispetto ai controlli ai tempi 15 e 30 minuti.

L'HOMA index nei ratti ipertiroidei raggiunge un valore che risulta essere il doppio del valore limite che indica insulino resistenza. Negli animali ipertiroidei il trattamento con vitamina E riduce il valore dell'HOMA index, che però non ritorna ai valori di controllo rimanendo al limite massimo del valore che indica insulino resistenza.

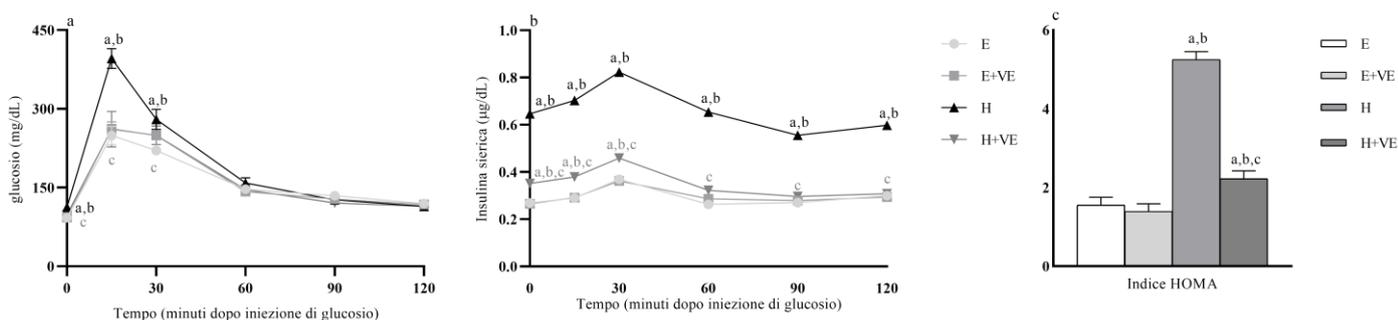


Figura 11 - Parametri ematici riguardanti l'IR e raffigurazione indice HOMA. a) Curva da carico di glucosio. b) Curva insulinemica. c) Indice HOMA. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard.

E, animali eutiroidei; E+VE animali eutiroidei trattati con vitamina E; H animali ipertiroidei; H+VE, animali ipertiroidei trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard dei dati ottenuti su otto animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

P-AKT/AKT

In figura 13 sono riportati negli istogrammi i rapporti tra le densitometrie ottenute dai blotting di AKT fosforilata e non fosforilata nel tessuto epatico e muscolare. I blotting sono stati effettuati su tessuti non trattati e trattati con insulina. Le immagini sono rappresentative dei blotting ottenuti nei gruppi sperimentali. Nei tessuti epatico e muscolare non stimolati da insulina, il rapporto P-AKT/AKT non mostra significative differenze tra i gruppi. Nei tessuti trattati con insulina, il rapporto P-AKT/AKT è significativamente più basso sia nel fegato che nel muscolo degli animali ipertiroidei. Il trattamento con vitamina E aumenta il rapporto P-AKT/AKT nel fegato e nel muscolo degli animali ipertiroidei che, però rimane significativamente inferiore rispetto agli animali di controllo e a quelli di controllo trattati con vitamina E.

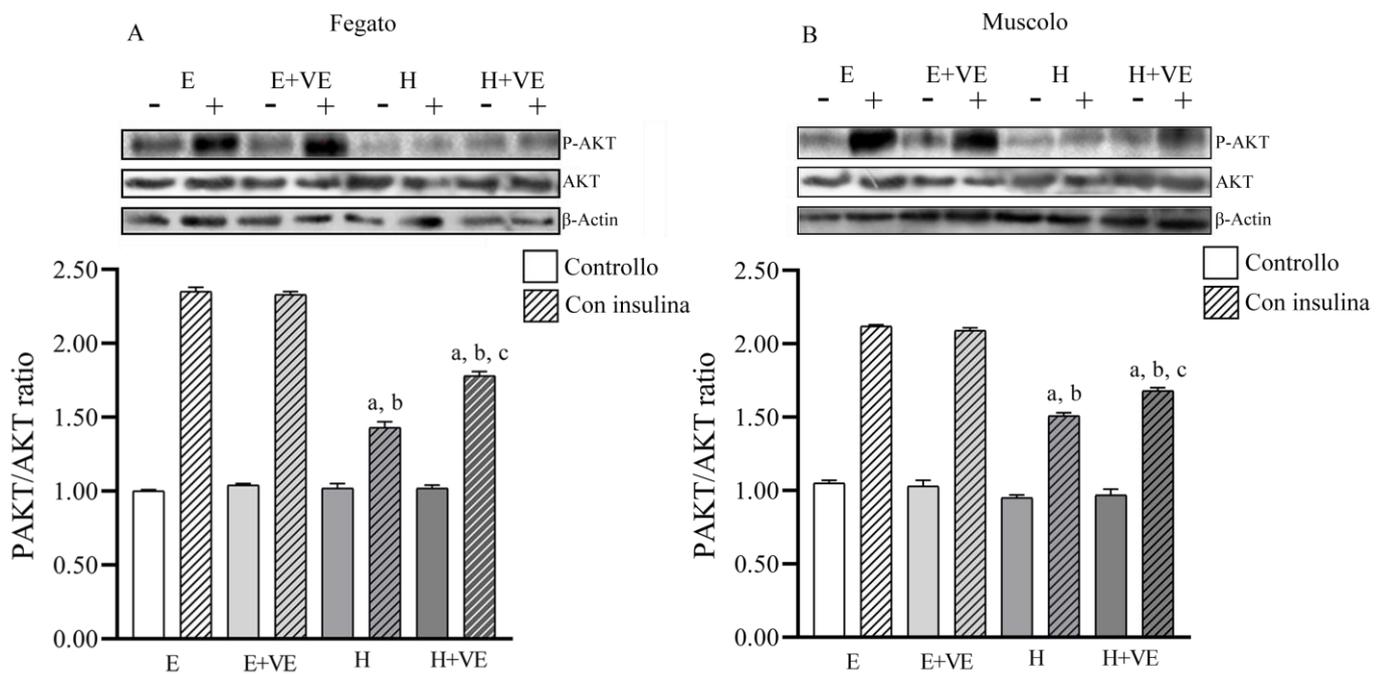


Figura 12 - Rapporto tra l'espressione della forma fosforilata di AKT e la forma non fosforilata

E, animali eutiroidi; E+VE animali eutiroidi trattati con vitamina E; H animali ipertiroidei; H+VE, animali ipertiroidei trattati con vitamina E. I valori rappresentano la media \pm l'errore standard dei dati ottenuti su 4 animali per gruppo. Ogni dato è la media di 3 diverse determinazioni. ^a significativo rispetto ad E; ^b significativo rispetto a E+VE; ^c significativo rispetto ad H.

Discussione

Finora esistono solo prove indirette che l'alterazione tissutale della sensibilità all'insulina, che insorge durante l'ipertiroidismo, dipenda dallo stress ossidativo indotto dall'aumentata produzione di ossidanti [87].

Gli effetti dell'ormone tiroideo sull'omeostasi glicemica dipendono dalla durata del trattamento e dalla dose di ormone somministrato. Per esempio, in ratti resi sperimentalmente diabetici, un trattamento cronico con una bassa dose di ormone ($1,5\mu\text{g}/100\text{g}$ di peso corporeo) riduce le alterazioni dell'omeostasi glicemica, aumenta la sensibilità all'insulina [134] e diminuisce la produzione epatica e il riassorbimento renale del glucosio [135]. Il trattamento acuto con T_3 un'ora prima dell'iniezione di glucosio fa aumentare la glicemia, ma non l'insulinemia più di quanto avviene in animali non trattati con l'ormone. Inoltre, l'aumento della glicemia è tanto maggiore quanto più alta è la dose di T_3 [136].

In pazienti ipertiroidei un'anomala tolleranza al glucosio e IR [85] è osservata in circa il 50 % dei casi anche se una piccola percentuale di questi sviluppa il diabete [86].

La variabilità degli effetti osservati sulla tolleranza al glucosio nell'ipertiroidismo può essere spiegata in parte dall'osservazione che tale risposta dipende dalla dose di ormone somministrato. L'ipertiroidismo è infatti un fenomeno graduato, che va da casi molto lievi, in cui sono presenti anomalie biochimiche senza alcun sintomo a casi molto gravi, con sintomi diffusi che possono evolvere fino a tireotossicosi potenzialmente letali [137-140]. Durante una prima fase dello studio abbiamo cercato di individuare le dosi di ormone tiroideo adeguate a indurre insulino resistenza. Inizialmente abbiamo somministrato per 15 o 30 giorni $10\mu\text{g}/100\text{gr}$ di peso corporeo di T_3 tramite iniezione intraperitoneale. In questi animali resi moderatamente ipertiroidei non vi era sempre un'alterazione della curva glicemica in seguito a iniezione intraperitoneale di glucosio. Viceversa, aumentando la dose di ormone (T_3 pari a $50\mu\text{g}/100\text{g}$ di peso corporeo) in tutti gli animali trattati insorgeva insulino resistenza. Tale modello sperimentale è stato, quindi, scelto per valutare gli effetti dello stress ossidativo sull'omeostasi glicemica e gli effetti della supplementazione con l'antiossidante liposolubile, vitamina E.

L'efficacia del trattamento con ormone nell'indurre ipertiroidismo è confermata dai livelli di FT3 plasmatica che è significativamente aumentata negli animali ipertiroidei e dall'aumento del rapporto tra il peso del cuore e il peso corporeo, un noto effetto dell'ipertiroidismo [132,133]. La vitamina E, riduce significativamente gli aumenti indotti dall'ormone del rapporto tra il peso del cuore e il peso

corporeo in accordo con l'ipotesi che le ROS svolgano un ruolo nel determinare l'ipertrofia cardiaca [133].

La supplementazione dietetica con vitamina E ha determinato un aumento del contenuto di vitamina sia nel fegato che nel muscolo sia negli animali di controllo che in quelli resi sperimentalmente ipertiroidi. È interessante notare che i livelli di α -tocoferolo aumentano anche in seguito all'ipertiroidismo. Tale aumento potrebbe dipendere dalla capacità dell'ormone tiroideo di aumentare o la mobilizzazione delle riserve endogene o di indurre una maggiore assimilazione della vitamina dal cibo [100].

Tuttavia, l'aumento dei livelli di vitamina E non è in grado di prevenire lo stress ossidativo indotto dall'ormone, nonostante la dose scelta nel disegno sperimentale si è dimostrata efficace nell'indurre un congruo aumento dei livelli tissutali di vitamina E e nella riduzione del danno ossidativo in ratti sedentari e allenati [141] e nell'attenuare le modificazioni indotte dall'ormone tiroideo sull'attività elettrica cardiaca nei ratti [142].

Infatti, i livelli dei markers di danno ossidativo aumentano nel fegato e nel muscolo degli animali ipertiroidi. Inoltre, poiché i mitocondri sono i principali siti di produzione di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule e sono anche i principali bersagli delle ROS e poiché la disfunzione mitocondriale è ritenuta una delle cause della ridotta sensibilità all'insulina nei tessuti ad essa sensibili [57,58], è stata valutata l'entità dello stress ossidativo in tali organelli. I livelli di markers di danno ossidativo ai lipidi ed alle proteine aumentano nei mitocondri degli animali ipertiroidi e sono ridotti dalla supplementazione con vitamina E anche se non ritornano ai livelli osservati negli animali di controllo. Inoltre, la riduzione dei markers di danno ossidativo si verifica anche nei preparati tissutali e mitocondriali ottenuti dai ratti di controllo alimentati con il supplemento di vitamina E rispetto ai controlli alimentati con dieta standard, dimostrando l'efficacia del rinforzo delle difese antiossidanti.

All'aumentato danno ossidativo contribuisce sicuramente l'aumentato contenuto di ROS come dimostrato dall'analisi dei livelli di diclorofloresceina. Nei ratti ipertiroidi, soprattutto a livello epatico, il contenuto di ROS totali è notevolmente aumentato e la vitamina E lo riduce significativamente pur non riportandolo ai livelli osservati negli animali di controllo. Nella cellula esistono diverse fonti di ROS, tra queste i mitocondri e l'enzima NADPH ossidasi sono ritenute le principali [74,143]. Per avere informazioni sul contributo di tali siti e sulle alterazioni indotte dai trattamenti abbiamo valutato il rilascio mitocondriale di H_2O_2 durante sia la respirazione basale che la respirazione stimolata da ADP e l'attività dell'enzima NOX.

Negli animali ipertiroidi entrambe le fonti producono più ROS, mentre la supplementazione con vitamina E attenua tali aumenti. In particolare, nei mitocondri di fegato e muscolo la velocità di rilascio di H₂O₂ è fortemente ridotta dalla vitamina E durante la respirazione basale e la riduzione è maggiore nei mitocondri di muscolo. La vitamina E si inserisce nei doppi strati lipidici delle membrane, l'anello benzenico può reagire con i perossidi lipidici interrompendo le catene di perossidazione lipidica, ma sembra anche essere in grado di reagire con l'anione superossido neutralizzandolo, inoltre, ciascun anello benzenico sembra reagire con due molecole di superossido [144]. Questo risultato suggerisce che il supplemento di vitamina E riduce la possibilità che il superossido, che si forma quando gli elettroni sfuggono alla catena di trasporto elettronico mitocondriale, possa innescare una serie di reazioni di perossidazioni a catena [100].

La riduzione legata alla vitamina E anche dell'attività dell'enzima NADPH ossidasi è probabilmente dovuta, invece, alla capacità della vitamina di ridurre la traslocazione della proteina citosolica p^{47phox}, una delle componenti dell'enzima, riducendone pertanto l'attivazione, come dimostrato da studi *in vitro* condotti su monociti [145,146].

Tuttavia, poiché lo stress ossidativo può insorgere o per un aumento delle specie pro-ossidanti o per una diminuzione delle difese antiossidanti o per entrambi gli eventi, nel presente studio sono state analizzate le attività dei principali enzimi antiossidanti, nello specifico gli enzimi glutazione perossidasi, glutazione reduttasi, catalasi e superossido dismutasi.

Gli organismi aerobi possiedono la capacità di adattare l'efficacia del sistema di difesa antiossidante alle necessità del tessuto. Quindi, l'aumento osservato dell'attività di tali enzimi nei gruppi ipertiroidi è probabilmente un meccanismo che le cellule mettono in atto per fronteggiare l'aumentato danno ossidativo. Questa idea è confermata anche dall'osservazione che in seguito alla supplementazione di vitamina E, il ridotto stress ossidativo è associato con una riduzione dell'attività degli enzimi antiossidanti osservabile sia nei ratti ipertiroidi che nei ratti di controllo.

Tuttavia, la capacità antiossidante totale dipende da azioni sinergiche ed antagoniste dei vari antiossidanti e anche se si misurassero le attività di tutti gli enzimi antiossidanti o i livelli di tutti gli antiossidanti a basso peso molecolare non si potrebbe avere un quadro chiaro della capacità di un preparato di fronteggiare un insulto ossidativo. Per tale motivo, per avere informazioni su tale capacità i preparati tissutali e mitocondriali sono stati sottoposti ad uno stress ossidativo *in vitro* e sono state valutate la variazione nel contenuto di markers di danno ossidativo ai lipidi. Lo stress *in vitro* è stato indotto utilizzando una miscela di ferro e ascorbato. In presenza di ascorbato il ferro ferrico si riduce a ferro ferroso, il quale reagendo con gli idroperossidi catalizza la reazione di

Fenton con formazione di radicale idrossilico. Il radicale idrossilico che si forma può o innescare reazioni di ossidazione a catena, tra cui la perossidazione lipidica, o essere neutralizzato dagli antiossidanti presenti nel campione. Per tale motivo variazioni nel contenuto di idroperossidi dipendono anche dall'efficacia del sistema di difesa antiossidante. Negli animali ipertiroidei l'aumento del contenuto di idroperossidi suggerisce una ridotta capacità dei tessuti a fronteggiare un insulto redox. Il trattamento con vitamina E, invece, potenziando il sistema di difesa antiossidante, rende i preparati meno pronti all'insulto ossidativo.

Questi risultati suggeriscono che lo stress ossidativo negli animali ipertiroidei è dovuto all'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno e a una ridotta capacità antiossidante. Poiché è stato suggerito che una delle principali cause dell'IR possa essere rappresentata dalla disfunzione mitocondriale è stata valutata la respirazione sia nei preparati tissutali che mitocondriali. Il consumo d'ossigeno incrementa durante lo Stato 3 della respirazione negli animali ipertiroidei, il che è in accordo con quanto è noto riguardo la capacità degli ormoni tiroidei di indurre la sintesi dei carriers della catena di trasporto elettronico mitocondriale [147]. L'aumento che si verifica durante lo stato 4 sembra dipendere dall'aumentato leak protonico, che, a sua volta può dipendere dal disaccoppiamento basale o inducibile legato alle proteine disaccoppianti [148]. Il danno ossidativo induce un aumento del leak protonico basale [149]. Noi troviamo che la riduzione del danno ossidativo ai lipidi riflette la riduzione del consumo di ossigeno durante lo stato 4 che è ridotto negli animali ipertiroidei e alimentati con supplemento di vitamina E.

Tuttavia, la funzionalità mitocondriale non sembra essere alterata neanche negli animali H, come dimostrato dall'aumento della respirazione mitocondriale durante lo stato 3, nonostante vi sia un elevato stress ossidativo. È possibile comunque osservare i benefici dovuti all'integrazione analizzando i valori dell'RCR, il rapporto tra lo stato 3 e lo stato 4 della respirazione, parametro che indica l'accoppiamento mitocondriale, il quale aumenta negli animali trattati con l'aggiunta antiossidante, dimostrando l'efficacia del trattamento con vitamina E sul benessere mitocondriale.

Perché, se è vero che un aumento dell'accoppiamento mitocondriale può essere causa di un aumento di rilascio di ROS durante lo stato 4 causato dall'aumento del grado di riduzione dei carriers autoossidabili della catena di trasporto elettronico mitocondriale, è anche vero che mitocondri disaccoppiati sono indice di danno mitocondriale e sono alla base di molteplici patologie [150,151]. Questo perché la produzione mitocondriale di ROS dipende fortemente dal gradiente protonico sulla membrana mitocondriale interna (che guida la sintesi di ATP) e un gradiente protonico elevato ne aumenta la produzione. Un modo per abbassare il gradiente protonico è il cosiddetto disaccoppiamento mitocondriale, un processo in cui una riduzione del gradiente

protonico non è accoppiata alla produzione di ATP, ma è dovuta alla perdita di protoni. Poiché la relazione tra la produzione di ROS e il gradiente protonico è esponenziale, già una piccola diminuzione del potenziale di membrana ("mild uncoupling") ridurrà considerevolmente la produzione di ROS mitocondriali [150-154]

Escludendo, dunque, un'alterazione della funzionalità mitocondriale nel nostro disegno sperimentale, abbiamo valutato il grado di fosforilazione di JNK che da studi *in vitro* ha mostrato essere uno dei principali candidati come link tra lo stress ossidativo e l'insulino resistenza. Infatti, in ratti con steatosi epatica non alcolica (NAFLD), è stato osservato che trattando i ratti con un inibitore di JNK, l'insulino-resistenza indotta da NAFLD era attenuata [155].

Ancora, Litwak e collaboratori hanno riportato che l'accumulo di grasso in fegato di topi aumenta l'attivazione dell'asse JNK/c-Jun/BIM (*BCL-2 interacting mediator of cell death*) negli epatociti. Ciò comporta che, in seguito all'attivazione di BIM mediata da JNK, vi è un aumentato stress ossidativo, un'aumentata steatosi epatica e un'aumentata insulino-resistenza. Alterazioni attenuate nei topi BIM-*knockout* [156].

L'alterazione dell'omeostasi glicemica correlata ai livelli di JNK-P è stata riportata anche da Hirosumi nel 2002. Infatti, in topi obesi, i parametri ematici riguardanti la glicemia e l'insulinemia erano significativamente migliorati nei topi JNK+/-, ma ancor di più nei topi JNK-/- [81]

Nei nostri ratti ipertiroidei la fosforilazione della chinasi è significativamente più alta, ma la supplementazione con vitamina E ne attenua l'attivazione confermando, *in vivo*, la correlazione che vi è tra l'aumentato stress ossidativo e la fosforilazione di JNK.

L'efficacia della vitamina E nel ridurre lo stress ossidativo indotto dall'ipertiroidismo e il coinvolgimento dello stress ossidativo, *in vivo*, nelle variazioni dei livelli di fosforilazione di JNK, sono associati con variazioni dei parametri ematici associati con l'omeostasi glicemica, ossia la risposta glicemica e insulinica ad un carico di glucosio. Negli animali resi sperimentalmente ipertiroidei vi è un aumento della resistenza all'insulina. Infatti, sia al tempo 0 che dopo 15 e 30 minuti dall'iniezione intraperitoneale di glucosio la glicemia è significativamente più alta nei ratti ipertiroidei, valore che successivamente torna ai livelli di controllo. Tuttavia, nei ratti ipertiroidei alimentati con supplemento di vitamina E non vi sono differenze significative rispetto ai ratti di controllo nei livelli di glicemia. Diversamente si comportano le variazioni ematiche di insulina in quanto nei ratti ipertiroidei sia al tempo 0 che per tutta la durata dell'osservazione i livelli di insulina sono significativamente più alti. Invece, nei ratti ipertiroidei alimentati con supplemento di

vitamina E, vi è un significativo aumento dell'insulina sia al tempo 0 che dopo 15 e 30 minuti dall'iniezione di glucosio.

L'insulino-resistenza è confermata anche dall'indice HOMA che indica insulino-resistenza per valori che vanno oltre 2,5. L'indice è significativamente più alto, oltre i valori standard, nei ratti ipertiroidi rispetto agli animali di controllo. Tuttavia, questo valore torna ai livelli borderline, ma non di controllo, nei ratti ipertiroidi alimentati con supplemento di vitamina E, indicando quindi che l'insulino-resistenza è attenuata in seguito alla supplementazione con l'antiossidante.

L'insorgenza di insulino resistenza è anche associata alla riduzione della fosforilazione della chinasi serina-treonina AKT nel fegato e nel muscolo in seguito a stimolazione con insulina. Infatti, l'ipertiroidismo è associato con una drastica riduzione del rapporto tra la forma attiva e la forma inattiva dopo stimolazione con insulina, il che suggerisce una ridotta sensibilità tissutale all'ormone sia nel fegato che nel muscolo. L'integrazione con vitamina E aumenta significativamente tale rapporto confermando l'effetto protettivo della vitamina E per la via di segnalazione dell'insulina.

In conclusione, da quanto osservato, è possibile escludere il coinvolgimento dell'alterata funzionalità mitocondriale nell'insorgenza dell'IR, nonostante vi sia un elevato stress ossidativo anche nei mitocondri. Questo è in accordo con quanto osservato da Fazakerley e collaboratori in cui, inducendo lo stress ossidativo nei preparati mitocondriali con mitochondria-targeted paraquat (MitoPQ), esso generava superossido all'interno dei mitocondri senza interrompere direttamente la catena respiratoria. A concentrazioni di MitoPQ <10M, aumentava specificamente il superossido mitocondriale e il perossido di idrogeno senza alterare la respirazione mitocondriale nelle cellule. In queste condizioni, è stato possibile osservare che sono proprio le ROS mitocondriali a indurre l'alterazione dell'assorbimento del glucosio stimolato dall'insulina e la traslocazione del trasportatore del glucosio 4 (GLUT4) sulla membrana plasmatica sia negli adipociti che nei miotubi, ma senza alterare l'attività della catena di trasporto elettronico mitocondriale [157]

Pertanto, è possibile affermare che è l'aumento dello stress ossidativo a indurre l'attivazione di determinati pathway che sembrano essere coinvolti nell'induzione della resistenza all'insulina, come osservato dall'aumento del rapporto tra la forma fosforilata di JNK e JNK non fosforilato, e dall'aumento dell'indice HOMA. Tuttavia, da questo studio è anche possibile affermare che, *in vivo*, la supplementazione con α -tocoferolo, aumentando l'efficienza del sistema di difesa antiossidante e riducendo lo stress ossidativo migliora tutti i parametri osservati, migliorando in particolare l'omeostasi glicemica e il benessere mitocondriale, seppur non facendo tornare gli indici riguardanti l'insulino-resistenza ai livelli basali. È possibile dunque confermare, *in vivo*, il

coinvolgimento dello stress ossidativo nell'insorgenza dell'Insulino-Resistenza e l'utilità del potenziamento delle difese antiossidanti come arma di prevenzione.

Bibliografia

1. Day C. Metabolic syndrome, or what you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* 2007; 4:32-38.
2. Keller U. From obesity to diabetes. *Int J Vitam Nutr Res.* 2006; 76:172-177.
3. Amati F, Dubé JJ, Coen PM, Stefanovic-Racic M, Toledo FGS, Goodpaster BH. Physical inactivity and obesity underlie the insulin resistance of aging. *Diabetes Care.* 2009; 32:1547-1549.
4. Nestler JE, McClanahan MA. Diabetes and adrenal disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1992;6: 829-847.
5. Wang C. The relationship between type 2 diabetes mellitus and related thyroid diseases. *J Diabetes Res.* 2013:390534, 2013.
6. Rohdenburg GL. Thyroid diabetes. *Endocrinology*, 4:63-70, 1920.
7. Wajachenberg BL, Cesar FP, Leme CE, Souza IT, Pieroni PR, Mattar E. Carbohydrate metabolism in thyrotoxicosis: studies on insulin secretion before and after remission from the hyperthyroid state. *Horm Metab Res.* 1978; 10: 294-299.
8. Lenzen S. Dose-response studies on the inhibitory effect of thyroid hormones on insulin secretion in the rat. *Metabolism.* 27: 81-88, 1978.
9. Marecek RL, Feldman JM. Effect of hyperthyroidism on insulin and glucose dynamics in rabbits. *Endocrinology*, 92: 1604-1611, 1973.
10. Upadya U, Suma M, Srinath K, Prashant A, Parveen Doddamani SS. Effect of insulin resistance in assessing the clinical outcome of clinical and subclinical hypothyroid patients. *J Clin Diagn Res: JCDR.* 2015;9: OC01-OC04.

11. Maratou E, Hadjidakis DJ, Peppas M, Alevizaki M, Tsegka K, Lambadiari V, Mitrou P, Boutati E, Kollias A, Economopoulos T, Raptis SA, Dimitriadis G. Studies of insulin resistance in patients with clinical and subclinical hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2010; 163: 625-630.
12. Rezzonico J, Niepomniszcze H, Rezzonico M, Pusiol E, Alberto M, Brenta G. The association of insulin resistance with subclinical thyrotoxicosis. *Thyroid*. 21: 945-949, 2011.
13. Handisurya A, Pacini G, Tura A, Gessl A, Kautzky-Willer A. Effects of thyroxine replacement therapy on glucose metabolism in subjects with subclinical and overt hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 69: 963-969.
14. Dessein PH, Joffe BI, Stanwix AE. Subclinical hypothyroidism is associated with insulin resistance in rheumatoid arthritis. *Thyroid*. 2004; 14: 443-446.
15. Feely J, Isles TE. Screening for thyroid dysfunction in diabetics. *BMJ*. 1979; 2: 1439.
16. Gray RS, Irvine WJ, Clarke BF. Screening for thyroid dysfunction in diabetics. *BMJ*. 1979; 2: 1439.
17. Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci*. 2009 1;122(7):893-903.
18. Hao M, Li X, Rizzo MA, Rocheleau JV, Dawant BM, Piston DW. Regulation of two insulin granule populations within the reserve pool by distinct calcium sources. *J Cell Sci*. 2005 Dec 15;118(Pt 24):5873-84. doi: 10.1242/jcs.02684. Epub 2005 Nov 29. PMID: 16317050.
19. Pedersen MG, Tagliavini A, Henquin JC. Calcium signaling and secretory granule pool dynamics underlie biphasic insulin secretion and its amplification by glucose: experiments and modeling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019 Mar 1;316(3):E475-E486. doi: 10.1152/ajpendo.00380.2018. Epub 2019 Jan 8. PMID: 30620637.
20. Rorsman P, Eliasson L, Renström E, Gromada J, Barg S, Göpel S. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci*. 2000; 15:72-77.
21. Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA. Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci*. 2005; 118:5675-5678.

22. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007; 29: 1261-1274.
23. Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1999 Apr;103(7):931-43. doi: 10.1172/JCI6609. PMID: 10194465; PMCID: PMC408269.
24. Bernal-Mizrachi E, Wen W, Srinivasan S, Klenk A, Cohen D, Permutt MA. Activation of Elk-1, an Ets transcription factor, by glucose and EGF treatment of insulinoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Dec;281(6):E1286-99. doi: 10.1152/ajpendo.2001.281.6.E1286. PMID: 11701445.
25. Burgess SC. Regulation of glucose metabolism in the liver. In: de Fronzo RA, Ferrannini E, Zimmet, P, Alberti GMM. (eds.) *International textbook of diabetes mellitus*, John Wiley & Sons, Inc 2015.
26. Matsumoto M, Pocai A, Rossetti L, Depinho RA, Accili D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab*. 2007; 6(3):208-16.
27. Taniguchi CM, Kondo T, Sajan M, Luo J, Bronson R, Asano T, Farese R, Cantley LC, Kahn CR. Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC λ/ζ . *Cell Metab*. 2006; 3: 343-353.
28. Lu M, Wan M, Leavens KF, Chu Q, Monks BR, Fernandez S, Ahima RS, Ueki K, Kahn CR, Birnbaum MJ. Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nature Med*. 2012; 18: 388-395.
29. Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Ann Rev Nutr*. 2000; 20: 365-393.
30. Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, Milne J, Meyers DJ, Cole P, Yates J 3rd, Olefsky J, Guarente L, Montminy M. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature*. 2008;456: 269-273.

31. Ader M, Bergman RN. Peripheral effects of insulin dominate suppression of fasting hepatic glucose production. *Am J Physiol.* 1990;258: E1020-E1032.
32. Perry RJ, Camporez JP, Kursawe R, Titchenell PM, Zhang D, Perry CJ, Jurczak MJ, Abudukadier A, Han MS, Zhang XM, Ruan HB, Yang X, Caprio S, Kaeck SM, Sul HS, Birnbaum MJ, Davis RJ, Cline GW, Petersen KF, Shulman GI. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell.* 2015;160: 745-758.
33. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol.* 2003;284: E671-E678.
34. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV: Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)- ζ and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology.* 1997;138: 4721-4731.
35. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science.* 1999;283: 1544-1548.
36. Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, Jefferies C, Liadis N, Giacca A, Crackower M, Suzuki A, Mak TW, Kahn CR, Klip A, Woo M. Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Mol Cell Biol.* 2005;25: 1135-1145.
37. Yang J. Enhanced skeletal muscle for effective glucose homeostasis. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014; 121:133-63.
38. Rose AJ, Richter EA. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiology (Bethesda).* 2005; 20:260-70.
39. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 1991;14: 173-194.

40. Lark DS, Fisher-Wellman KH, Neuffer PD. High-fat load: mechanism(s) of insulin resistance in skeletal muscle. *Int J Obes (Suppl 2)*. 2012;2: S31-S36.
41. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia*. 2000;43: 821-835.
42. Zisman A, Peroni OD, Abel D, Michael D, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nature Med*. 2000;6: 924-928.
43. Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*. 1998;2: 559-569.
44. Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. Insulin-receptor phosphorylation, insulin-receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal-muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*. 1995;95: 2195-2204.
45. Bjornholm M, Kawano Y, Lehtihet M, Zierath JR. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes*. 1997;46: 524-527.
46. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997;272: 29911-29918.
47. Gao ZG, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon M, Ye J: Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. *J Biol Chem*. 2002;277: 48115-48121.
48. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH₂-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem*. 2000; 275: 9047-9054.

49. Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 4640-4645.
50. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*. 2002; 277: 50230-50236.
51. de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor κ B kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem*. 2004; 279: 17070-17078.
52. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000; 106: 171-176.
53. Farese RV. Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol*. 2002; 283: E1-E11.
54. Somwar R, Perreault M, Kapur S, Taha C, Sweeney G, Ramlal T, Kim DY, Keen J, Côte CH, Klip A, Marette A. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase α and β by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. *Diabetes*, 2000;49 1794-1800.
55. Leng Y, Steiler TL, Zierath JR. Effects of insulin, contraction, and phorbol esters on mitogen activated protein kinase signaling in skeletal muscle from lean and ob/ob mice. *Diabetes*. 2004; 53: 1436-1444.
56. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*. 2007; 48: 1253-1262.
57. Di Meo S, Iossa S, Venditti P. 1 Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. *J Endocrinol*. 2017;234: R159-R181.
58. Di Meo S, Iossa S, Venditti P. 2 Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. *J Endocrinol*. 2017;233: R15-R42.

59. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. University Press Oxford, Oxford, UK, 2015.
60. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016. (doi: 10.1155/2016/1245049)
61. Rizzo MA, Piston DW. Regulation of β cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase. *J Cell Biol*. 2003;161: 243-248.
62. Wiseman DA, Kalwat MA, Thurmond DC. Stimulus induced S-nitrosylation of syntaxin 4 impacts insulin granule exocytosis. *J Biol Chem*. 2011;286: 16344-16354.
63. Leloup C, Turrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani A-L, Ktorza A, Casteilla L, Pénicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose induced insulin secretion. *Diabetes*. 2009;58: 673-681.
64. Jacobson J, Duchon MR. Interplay between mitochondria and cellular calcium signaling. *Mol Cell Biochem*. 2004;256/257: 209-218.
65. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2007;56: 1783-1791.
66. Krippeit-Drews P, Kramer C, Welker S, Lang F, Ammon HP, Drews G. Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic β -cells. *J Physiol* 1999;514: 471-481.
67. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011;51: 993-999.
68. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N: The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obesity Rev*. 2011;13: 136-149.
69. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM-E, Clark SE, Morris EM, Szary N, Manrique C, Stump CS. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2006;281: 35137-35146.
70. Den Hartigh LJ, Omer M, Goodspeed L, Wang S, Wietecha T, O'Brien KD, Han CY: Adipocyte-specific deficiency of NADPH oxidase 4 delays the onset of Insulin resistance and

attenuates adipose tissue Inflammation in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Mar;37(3):466-475. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308749.

71. Gao D, Nong S, Huang X, Lu Y, Zhao H, Lin Y, Man Y, Wang S, Yang J, Li J. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem.* 2010; 285: 29965–29973. doi: 10.1074/jbc.M110.128694
72. Balteau M, Tajeddine N, de Meester C, Ginion A, Des Rosiers C, Brady NR, Sommereyns C, Horman S, Vanoverschelde JL, Gailly P, Hue L, Bertrand L, Beauloye C. NADPH oxidase activation by hyperglycaemia in cardiomyocytes is independent of glucose metabolism but requires SGLT1. *Cardiovasc Res.* 2011; 2: 237–246. (doi:10.1093/cvr/cvr230)
73. Houstis N, Rosen ED, Lander ES: Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006; 440: 944–948. (doi:10.1038/nature04634)
74. Napolitano G, Fasciolo G, Venditti P. Mitochondrial Management of Reactive Oxygen Species. *Antioxidants (Basel).* 2021 Nov 17;10(11):1824. doi: 10.3390/antiox10111824. PMID: 34829696; PMCID: PMC8614740.
75. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem.* 2003. 278: 5557–5563.
76. Vial G, Dubouchaud H, Couturier K, Cottet-Rousselle C, Taleux N, Athias A, Galinier A, Casteilla L, Leverve XM. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *J Hepatol.* 2011; 54: 348-356. doi: 10.1016/j.jhep.2010.06.044.
77. Watanabe T, Saotome M, Nobuhara M, Sakamoto A, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Funaki M, Hayashi H. Roles of mitochondrial fragmentation and reactive oxygen species in mitochondrial dysfunction and myocardial insulin resistance. *Exp Cell Res.* 2014; 323: 314-325. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.02.027.
78. Fisher-Wellman KH, Weber TM, Cathey BL, Brophy PM, Gilliam LA, Kane CL, Maples JM, Gavin TP, Houmard JA, Neuffer PD. Mitochondrial respiratory capacity and content are normal in young insulin-resistant obese humans. *Diabetes.* 2014; 63: 132–141. (doi:10.2337/ db13-0940).

79. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23: 599-622.
80. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem.* 2002; 277(2):1531-7.
81. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002 ; 420(6913):333-6.
82. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(28):10741-6.
83. Solinas G, Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Mol Metab.* 2016;6(2):174-184. doi: 10.1016/j.molmet.2016.12.001.
84. Cooppan R, Kozak GP. Hyperthyroidism and diabetes mellitus. An analysis of 70 patients. *Arch Intern Med.* 1980;140: 370-373.
85. Dimitriadis GD, Raptis SA. Thyroid hormone excess and glucose intolerance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109: S225-S239.
86. Gierach M, Gierach J, Junik R: Insulin resistance and thyroid disorders. *Endokrynol Pol.* 2014;65: 70-76.
87. Venditti P, Reed TT, Victor VM, Di Meo S. Insulin resistance and diabetes in hyperthyroidism: a possible role for oxygen and nitrogen reactive species. *Free Radic Res.* 2019 Mar;53(3):248-268. doi: 10.1080/10715762.2019.1590567. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30843740.
88. Venditti P, Di Meo S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63: 414-434.
89. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Vitamin E management of oxidative damage-linked dysfunctions of hyperthyroid tissues. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70: 3125-3144.

90. Venditti P, Napolitano G, Di Meo S. Role of mitochondria and other ROS sources in hyperthyroidism-linked oxidative stress. *Immunol Endocr Metab Agent Med Chem* 2015;15: 5-36.
91. Asayama K, Kato K. Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. *Free Radic Biol Med*. 1990;8: 293-303.
92. Videla LA. Energy metabolism, thyroid calorigenesis, and oxidative stress: Functional and cytotoxic consequences. *Redox Rep*. 2000;5: 265-275.
93. Venditti P, De Leo T, Di Meo S. Antioxidant-sensitive shortening of action potential induced by T3 is independent of lipid peroxidation. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;142: 15-23.
94. Venditti P, De Rosa R, Di Meo S. Effect of thyroid state on H₂O₂ production by rat liver mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 205(1-2):185-92.
95. Venditti P, Puca A, Di Meo S. Effect of thyroid state on rate and sites of H₂O₂ production in rat skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 411(1):121-8.
96. Venditti P, Puca A, Di Meo S. Effects of thyroid state on H₂O₂ production by rat heart mitochondria: sites of production with complex I- and complex II-linked substrates. *Horm Metab Res*. 2003; 35(1):55-61.
97. Venditti P, De Rosa R, Di Meo S. Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35(5):485-94.
98. Kocic R, Radenkovic S, Mikic D, Kocik G, Cvetkovic T, Pavlovic D. Oxidative stress in the development of diabetes during hyperthyroidism. *Postgrad Med J*. 1998;74: 381-382.
99. Wittmann I, Nagy J. Are insulin resistance and atherosclerosis the consequences of oxidative stress? *Diabetologia*. 1996;139: 1003-1004.
100. Napolitano G, Fasciolo G, Di Meo S, Venditti P. Vitamin E Supplementation and Mitochondria in Experimental and Functional Hyperthyroidism: A Mini-Review. *Nutrients*. 2019;11(12):2900.

101. Mukai K, Ishikawa E, Ouchi A, Nagaoka SI, Abe K, Suzuki T, Izumisawa K. Measurements of Singlet Oxygen-Quenching Activity of Vitamin E Homologs and Palm Oil and Soybean Extracts in a Micellar Solution. *Lipids*. 2018; 53(6):601-613.
102. Munné-Bosch S. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol*. 2005; 162(7):743-8.
103. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot*. 2003; 91 Spec No(2):179-94.
104. Niki E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radic Biol Med*. 2014; 66:3-12.
105. Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F, Løvik M, Macfarlane S, Meyer PD, M'Rabet L, Serafini M, van Eden W, van Loo J, Vas Dias W, Vidry S, Winklhofer-Roob BM, Zhao J. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr*. 2009; 101 Suppl 1:S1-45.
106. Bramley P, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA, Wagner KH. Vitamin E. *J. Sci. Food Agric*. 2000; 80:913-38.
107. Manolescu B, Atanasiu V, Cercasov C, Stoian I, Oprea E, Buşu C. So many options but one choice: the human body prefers alpha-tocopherol. A matter of stereochemistry. *J Med Life*. 2008;1(4):376-82.
108. Dimitriadis G, Parry-Billings M, Bevan S, Leighton B, Krause U, Piva T, Tegos K, Challiss RA, Wegener G, Newsholme EA. The effects of insulin on transport and metabolism of glucose in skeletal muscle from hyperthyroid and hypothyroid rats. *Eur J Clin Invest*. 1997; 27(6):475-83.
109. El Deib MM, El-Sharkawy NI, Beheiry RR, Abd-Elhakim YM, Ismail SA, Fahmy EM, Saber T, Saber TM. Boldenone undecylenate disrupts the immune system and induces autoimmune clinical hypothyroidism in rats: Vitamin C ameliorative effects. *Int Immunopharmacol*. 2021 Oct;99:107939. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107939. Epub 2021 Jul 2. PMID: 34224995.
110. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. 1949; 177(2):751-66.

- 111.Lang JK, Gohil K, Packer L. Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal Biochem.* 1986; 157(1):106-16.
- 112.Heath RL, Tappel AL. A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal Biochem.* 1976; 76(1):184-91.
- 113.Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233:357-63.
- 114.Schild L, Schneeberger E, Gautschi I, Firsov D. Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *J Gen Physiol.* 1997; 109(1):15-26.
- 115.Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem.* 1965;11:1-5.
- 116.LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990; 104(1):17-24.
- 117.Okamoto T, Kawashima H, Osada H, Toda E, Homma K, Nagai N, Imai Y, Tsubota K, Ozawa Y. Dietary Spirulina Supplementation Protects Visual Function From Photostress by Suppressing Retinal Neurodegeneration in Mice. *Transl Vis Sci Technol.* 2019; 8(6):20.
- 118.Hyslop PA, Sklar LA. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem.* 1984; 141(1):280-6.
- 119.Azzi A, Montecucco C, Richter C. The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975 Jul 22;65(2):597-603. doi: 10.1016/s0006-291x(75)80188-4. PMID: 167777.
- 120.Suzuki Y, Lehrer RI. NAD(P)H oxidase activity in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate. *J Clin Invest.* 1980; 66(6):1409-18.

121. Minkenbergh I, Ferber E. Lucigenin-dependent chemiluminescence as a new assay for NAD(P)H-oxidase activity in particulate fractions of human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol Methods*. 1984; 71(1):61-7.
122. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984; 105:114-21.
123. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985; 113:484-90.
124. Flohé L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*. 1984; 105:93-104.
125. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-6.
126. Napolitano G, Fasciolo G, Salbitani G, Venditti P. Chlorella sorokiniana Dietary Supplementation Increases Antioxidant Capacities and Reduces Ros Release in Mitochondria of Hyperthyroid Rat Liver. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(9):883.
127. Amouzou C, Breuker C, Fabre O, Bourret A, Lambert K, Birot O, Fédou C, Dupuy AM, Cristol JP, Sutra T, Molinari N, Maimoun L, Mariano-Goulart D, Galtier F, Avignon A, Stanke-Labesque F, Mercier J, Sultan A, Bisbal C. Skeletal Muscle Insulin Resistance and Absence of Inflammation Characterize Insulin-Resistant Grade I Obese Women. *PLoS One*. 2016; 11(4):e0154119.
128. Song C, Liu D, Yang S, Cheng L, Xing E, Chen Z. Sericin enhances the insulin-PI3K/AKT signaling pathway in the liver of a type 2 diabetes rat model. *Exp Ther Med*. 2018; 16(4):3345-3352.
129. Fu C, Jiang L, Zhu F, Liu Z, Li W, Jiang H, Ye H, Kushida CA, Li S. Chronic intermittent hypoxia leads to insulin resistance and impaired glucose tolerance through dysregulation of adipokines in non-obese rats. *Sleep Breath*. 2015; 19(4):1467-73.
130. Lionetti L, Mollica MP, Donizzetti I, Gifuni G, Sica R, Pignalosa A, Cavaliere G, Gaita M, De Filippo C, Zorzano A, Putti R. High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. *PLoS One*. 2014; 9(3):e92753.
131. Appleton DJ, Rand JS, Sunvold GD. Basal plasma insulin and homeostasis model assessment (HOMA) are indicators of insulin sensitivity in cats. *J Feline Med Surg*. 2005; 7(3):183-93.

132. Barreto-Chaves ML, Senger N, Fevereiro M, Parletta AC, Takano A. Impact of hyperthyroidism on cardiac hypertrophy [published online ahead of print, 2020 Feb 1]. *Endocr Connect.* 2020;9(3):R59-R69. doi:10.1530/EC-19-0543
133. Araujo AS, Schenkel P, Enzweiler AT, Fernandes TR, Partata WA, Llesuy S, Ribeiro MF, Khaper N, Singal PK, Belló-Klein A. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol.* 2008 Dec;41(6):423-30. doi: 10.1677/JME-08-0024. Epub 2008 Sep 11. PMID: 18787053.
134. Prieto-Almeida F, Panveloski-Costa AC, Crunfli F, da Silva Teixeira S, Nunes MT, Torrão ADS. Thyroid hormone improves insulin signaling and reduces the activation of neurodegenerative pathway in the hippocampus of diabetic adult male rats. *Life Sci.* 2018 Jan 1;192:253-258. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.013. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29132997.
135. Teixeira SD, Panveloski-Costa AC, Carvalho A, Monteiro Schiavon FP, Ruiz Marque AC, Campello RS, Bazotte RB, Nunes MT. Thyroid hormone treatment decreases hepatic glucose production and renal reabsorption of glucose in alloxan-induced diabetic Wistar rats. *Physiol Rep.* 2016 Sep;4(18):e12961. doi: 10.14814/phy2.12961. PMID: 27655796; PMCID: PMC5037915.
136. Patel K, Joharapurkar A, Dhanesha N, Patel V, Kshirsagar S, Raval P, Raval S, Jain MR. Thyroid hormone modulates food intake and glycemia via ghrelin secretion in Zucker fatty rats. *Drug Res (Stuttg).* 2014 Oct;64(10):523-9. doi: 10.1055/s-0033-1363222. Epub 2013 Dec 19. PMID: 24357139.
137. Sheffield JS, Cunningham FG. Thyrotoxicosis and heart failure that complicate pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Jan;190(1):211-7. doi: 10.1016/s0002-9378(03)00944-x. PMID: 14749662.
138. Magner JA, Clark W, Allenby P. Congestive heart failure and sudden death in a young woman with thyrotoxicosis. *West J Med.* 1988 Jul;149(1):86-91. PMID: 3407167; PMCID: PMC1026262.
139. Kositanurit W, Kittipibul V, Srichomkwun P, Boonyaratavej S, Puwanant S. Clinical phenotypes and prognosis of thyrotoxic heart failure and cardiomyopathy in patients hospitalized for acute heart failure. *ESC Heart Fail.* 2021 Aug;8(4):2776-2783. doi: 10.1002/ehf2.13347. Epub 2021 May 1. PMID: 33932131; PMCID: PMC8318454.

140. Faccia M, Porfidia A, Montalto M. Acute Right Ventricular Heart Failure: An Uncommon Case of Thyrotoxicosis. *Am J Med Sci*. 2018 Sep;356(3):309-312. doi: 10.1016/j.amjms.2018.03.017. Epub 2018 Mar 27. PMID: 30139580.
141. Venditti P, Napolitano G, Barone D, Di Meo S. Effect of training and vitamin E administration on rat liver oxidative metabolism. *Free Radic Res*. 2014 Mar;48(3):322-32. doi: 10.3109/10715762.2013.867959. Epub 2013 Dec 16. PMID: 24255967.
142. Venditti P, De Leo T, Di Meo S. Vitamin E administration attenuates the tri-iodothyronine-induced modification of heart electrical activity in the rat. *J Exp Biol*. 1997 Mar;200(Pt 5):909-14. PMID: 9100363.
143. Wen Y, Liu R, Lin N, Luo H, Tang J, Huang Q, Sun H, Tang L. NADPH Oxidase Hyperactivity Contributes to Cardiac Dysfunction and Apoptosis in Rats with Severe Experimental Pancreatitis through ROS-Mediated MAPK Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 May 9;2019:4578175. doi: 10.1155/2019/4578175. PMID: 31210840; PMCID: PMC6532283.
144. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, Nakagawa K, Miyazawa T. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life*. 2019 Apr;71(4):430-441. doi: 10.1002/iub.2008. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30681767
145. Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gougerot-Pocidalo MA, Leger CL. alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem*. 1998; 273(49):32801-5
146. Calvisi DF, Ladu S, Hironaka K, Factor VM, Thorgeirsson SS. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF-alpha transgenic mouse model of liver cancer. *J Hepatol*. 2004; 41(5):815-22.
147. Lanni A, Moreno M, Goglia F. Mitochondrial Actions of Thyroid Hormone. *Compr Physiol*. 2016 Sep 15;6(4):1591-1607. doi: 10.1002/cphy.c150019. PMID: 27783852.
148. Lanni A, Beneduce L, Lombardi A, Moreno M, Boss O, Muzzin P, Giacobino JP, Goglia F. Expression of uncoupling protein-3 and mitochondrial activity in the transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscle. *FEBS Lett*. 1999 Feb 12;444(2-3):250-4. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00061-7. PMID: 10050769.

149. Considine MJ, Goodman M, Echtay KS, Laloi M, Whelan J, Brand MD, Sweetlove LJ. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J Biol Chem.* 2003 Jun 20;278(25):22298-302. doi: 10.1074/jbc.M301075200. Epub 2003 Apr 2. PMID: 12672801.
150. de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sci.* 2018; 192:26-32.
151. Wu YN, Munhall AC, Johnson SW. Mitochondrial uncoupling agents antagonize rotenone actions in rat substantia nigra dopamine neurons. *Brain Res.* 2011; 1395:86-93.
152. Yazıcı D, Sezer H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 960:277-304.
153. Naven RT, Swiss R, Klug-McLeod J, Will Y, Greene N. The development of structure-activity relationships for mitochondrial dysfunction: uncoupling of oxidative phosphorylation. *Toxicol Sci.* 2013; 131(1):271-8.
154. Boelsterli UA, Lim PL. Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 220(1):92-107.
155. Yan H, Gao Y, Zhang Y. Inhibition of JNK suppresses autophagy and attenuates insulin resistance in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Med Rep.* 2017 Jan;15(1):180-186. doi: 10.3892/mmr.2016.5966. Epub 2016 Nov 24. PMID: 27909723; PMCID: PMC5355648.
156. Litwak SA, Pang L, Galic S, Igoillo-Esteve M, Stanley WJ, Turatsinze JV, Loh K, Thomas HE, Sharma A, Trepo E, Moreno C, Gough DJ, Eizirik DL, de Haan JB, Gurzov EN. JNK Activation of BIM Promotes Hepatic Oxidative Stress, Steatosis, and Insulin Resistance in Obesity. *Diabetes.* 2017 Dec;66(12):2973-2986. doi: 10.2337/db17-0348. Epub 2017 Sep 19. PMID: 28928277.
157. Fazakerley DJ, Minard AY, Krycer JR, Thomas KC, Stöckli J, Harney DJ, Burchfield JG, Maghazal GJ, Caldwell ST, Hartley RC, Stocker R, Murphy MP, James DE. Mitochondrial oxidative stress causes insulin resistance without disrupting oxidative phosphorylation. *J Biol Chem.* 2018 May 11;293(19):7315-7328. doi: 10.1074/jbc.RA117.001254. Epub 2018 Mar 29. PMID: 29599292; PMCID: PMC5950018.

Pubblicazioni

1. Napolitano G, Fasciolo G, Venditti P. Mitochondrial Management of Reactive Oxygen Species. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Nov 17;10(11):1824. doi: 10.3390/antiox10111824. PMID: 34829696; PMCID: PMC8614740.
2. Napolitano G, Fasciolo G, Agnisola C, Venditti P. Urea Excretion and Arginase Activity as New Biomarkers for Nitrite Stress in Freshwater Aquatic Animals. *Water*. 2021; 13(24):3521. <https://doi.org/10.3390/w13243521>
3. Napolitano G, Fasciolo G, Salbitani G, Venditti P. *Chlorella sorokiniana* Dietary Supplementation Increases Antioxidant Capacities and Reduces Ros Release in Mitochondria of Hyperthyroid Rat Liver. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Sep 17;9(9):883. doi: 10.3390/antiox9090883. PMID: 32957734; PMCID: PMC7555375.
4. Napolitano G, Fasciolo G, Di Meo S, Venditti P. Vitamin E Supplementation and Mitochondria in Experimental and Functional Hyperthyroidism: A Mini-Review. *Nutrients*. 2019 Dec 1;11(12):2900. doi: 10.3390/nu11122900. PMID: 31805673; PMCID: PMC6950234.
5. Cigliano L, Spagnuolo MS, Napolitano G, Iannotta L, Fasciolo G, Barone D, Venditti P. 24S-hydroxycholesterol affects redox homeostasis in human glial U-87 MG cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2019 Apr 15;486:25-33. doi: 10.1016/j.mce.2019.02.013. Epub 2019 Feb 23. PMID: 30802527.
6. Napolitano G, Venditti P, Fasciolo G, Esposito D, Uliano E, Agnisola C. Acute hypoxia/reoxygenation affects muscle mitochondrial respiration and redox state as well as swimming endurance in zebrafish. *J Comp Physiol B*. 2019 Feb;189(1):97-108. doi: 10.1007/s00360-018-1198-6. Epub 2018 Dec 17. PMID: 30560503.
7. Venditti P, Napolitano G, Fasciolo G, Di Meo S. Thyroid state affects H₂O₂ removal by rat heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 2019 Feb 15;662:61-67. doi: 10.1016/j.abb.2018.11.025. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30508506.
8. Napolitano G, Fasciolo G, Magnacca N, Goglia F, Lombardi A, Venditti P. Oxidative damage and mitochondrial functionality in hearts from KO UCP3 mice housed at

thermoneutrality. *J Physiol Biochem*. 2022 Mar 3. doi: 10.1007/s13105-022-00882-9. Epub ahead of print. PMID: 35237934.

Capitoli

1. Napolitano G, Fasciolo G, Di Meo S, Venditti P. Chapter 4 - Mitochondrial redox biology: Reactive species production and antioxidant defences. Editor(s): Marcos Roberto de Oliveira. *Mitochondrial Physiology and Vegetal Molecules*, Academic Press. 2021; 105-21. ISBN 9780128215623. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821562-3.00053-8>.