

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA APPLICATA
XX CICLO**

Ruolo del muscolo scheletrico nella soppressione della
termogenesi adiposo specifica.

Coordinatore

Ch.mo Prof.

AMALIA VIRZO DE SANTO

Candidata

Dott.ssa

FRANCESCA BIANCO

Docente Tutore

Ch.ma Prof.ssa

SUSANNA IOSSA

INDICE

INTRODUZIONE	<i>pag</i>	4
<i>Recupero di peso successivo ad una perdita di peso negli adulti</i>	“	4
<i>Ripresa della crescita in seguito ad una stentata crescita fetale o neonatale</i>	“	5
<i>Ripresa della crescita dopo nascita prematura</i>	“	6
<i>Ripresa della crescita: uno stato di insulino-resistenza</i>	“	7
<i>Il fenomeno di recupero di grasso</i>	“	8
<i>Recupero di grasso in neonati e bambini SGA</i>	“	9
<i>Recupero di grasso in bambini nati prematuri</i>	“	12
<i>Recupero di grasso negli adulti</i>	“	12
<i>Sistema di controllo che regola il recupero di grasso</i>	“	14
<i>La termogenesi adattativa durante il recupero di grasso</i>	“	16
<i>Studi umani</i>	“	19
<i>Studi animali</i>	“	23
<i>Significato biologico del duplice sistema di controllo della termogenesi adattativa</i>	“	28
<i>Svantaggi del sistema a duplice termogenesi</i>	“	30
<i>Respirazione ed efficienza mitocondriale</i>	“	32

<i>La conduttanza protonica mitocondriale</i>	“	38
SCOPO DELLA TESI	“	41
MATERIALI E METODI	“	45
<i>Animali e disegno sperimentale 1: restrizione- rialimentazione</i>	“	45
<i>Animali e disegni sperimentali 2: restrizione- rialimentazione ipolipidica e iperlipidica</i>	“	46
<i>Bilancio energetico</i>	“	49
<i>Misura della composizione corporea</i>	“	51
<i>Determinazione dei livelli plasmatici di glucosio e insulina</i>	“	52
<i>Preparazione dei mitocondri SS e IMF del muscolo scheletrico</i>	“	53
<i>Dosaggio proteico</i>	“	54
<i>Determinazione della massa proteica mitocondriale</i>	“	55
<i>Misura dell'attività respiratoria dei mitocondri isolati</i>	“	56
<i>Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati</i>	“	57
<i>Misura della conduttanza protonica basale</i>	“	59
<i>Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi</i>	“	60
<i>Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale</i>	“	60
<i>Determinazione dell'attività della superossido dismutasi</i>	“	62
<i>Analisi statistica</i>	“	63

RISULTATI	“	64
<i>Disegno sperimentale 1: restrizione-rialimentazione</i>	“	64
<i>Disegno sperimentale 2: restrizione-rialimentazione ipolipidica e iperlipidica</i>	“	87
DISCUSSIONE	“	96
<i>Restrizione-rialimentazione</i>	“	96
<i>Restrizione-rialimentazione ipolipidica e iperlipidica</i>	“	101
BIBLIOGRAFIA CONSULTATA	“	104
BIBLIOGRAFIA CITATA	“	107

INTRODUZIONE

Le variazioni dinamiche del peso corporeo sono già da tempo considerate come importanti indicatori di successivi disturbi debilitanti. Severe perdite di peso o una crescita discontinua possono portare, infatti, ingenti danni muscolari, aumento della suscettibilità alle infezioni e al malfunzionamento degli organi, disturbi cardiovascolari, predisposizione al diabete di tipo II e sviluppo dell'obesità, con insulino-resistenza che si instaura precocemente nella patogenesi di questi disturbi cronici.

Negli ultimi 10 anni numerosi studi scientifici hanno condotto alla teoria secondo la quale il processo di recupero del peso corporeo, successivo ad una perdita di peso o a ritardi nella crescita, sia il fenomeno maggiormente implicato nella patogenesi di questi disturbi cronici.

RECUPERO DI PESO SUCCESSIVO AD UNA PERDITA DI PESO NEGLI ADULTI

L'analisi di molti dati epidemiologici ha rivelato una più alta morbosità ed una maggiore mortalità cardiovascolare in uomini e in donne che precedentemente avevano subito marcate fluttuazioni del peso corporeo [Hamm P et al, 1989; Lissner L et al, 1989; Holbrook TL et al, 1989]. Anche in uno studio pubblicato recentemente negli Stati Uniti [Diaz VA et al, 2005], il quale include diverse misurazioni del peso effettuate tra il 1971 ed il 1992, le fluttuazioni di peso sono associate con un più alto rischio di mortalità cardiovascolare. Queste associazioni risultano essere indipendenti dall'eccesso di peso e dal suo andamento nel tempo, e risultano, quindi, clinicamente rilevanti non solo per le persone obese che falliscono il tentativo di mantenere la perdita

di peso, ma anche per i non obesi che variano spesso il loro peso a causa del ripetuto riacutizzarsi di disturbi cronici, come alcolismi o problemi gastrointestinali, oppure a causa di una percezione, non reale, di un peso corporeo eccessivo al continuo inseguimento della magrezza. La correlazione tra fluttuazioni di peso e maggiori rischi cardiovascolari è, infatti, più marcata nella popolazione in generale, piuttosto che nei soli obesi in particolare. In questo tipo di ricerche è stato riscontrato che, per i gruppi di persone appena descritti, anche un singolo ciclo di perdita e recupero del peso corporeo in età giovanile aumenta i rischi di successivi disturbi e di mortalità conseguenti a problemi coronarici [Hamm P et al, 1989]. Queste conclusioni, frutto di studi retrospettivi effettuati in Europa e in nord America, sono stati recentemente rafforzati da ulteriori studi a lungo termine condotti in Giappone, nei quali si evidenzia un aumento dei rischi per diverse componenti della sindrome metabolica sia negli individui sovrappeso sia nei normopeso affetti da ampie fluttuazioni del peso corporeo [Yatsuya H et al, 2003; Zhang H et al, 2005].

RIPRESA DELLA CRESCITA IN SEGUITO AD UNA STENTATA CRESCITA FETALE O NEONATALE

Forse il più importante anello di congiunzione tra il recupero di peso ed i rischi cardiovascolari può essere evidenziato da studi longitudinali estesi attraverso un'intera generazione in varie parti del mondo. Neonati ipoponderali, bambini ed adolescenti che presentano una crescita stentata, ma che in seguito riprendono a crescere, risultano in età avanzata molto più suscettibili ad obesità centrale, problemi di intolleranza al glucosio, diabete, ipertensione e disturbi cardiovascolari [Eriksson JG et al, 1999;

Huxley RR et al, 2000; Levy-Marchal C et al, 2000]. Per esempio l'analisi dei dati provenienti dalla Finlandia indica che bambini magri alla nascita ma che diventano obesi durante l'adolescenza, hanno un rischio di mortalità 5 volte maggiore rispetto ad individui con un alto BMI (Body Mass Index) alla nascita e magri durante l'adolescenza. La ripresa della crescita, quindi, sebbene porti benefici a breve termine, può a lungo andare, comportare problemi a lungo termine, come si evince anche da studi condotti in paesi sottoposti a transizioni nutrizionali. In studi condotti in Cina, Brasile e Russia, infatti, è stato osservato che i bambini che stentano a crescere presentano rischi dalle 2 alle 8 volte maggiori di essere, da adulti, in soprappeso [Popkin BM et al, 1996] e/o hanno una maggiore incidenza di disturbi cardiovascolari cronici [Levitt NS et al, 2000; Sawaya AL et al, 2003].

Questi alti livelli di rischio sono inoltre associati con insulino resistenza, e sono fortemente correlati all'aumento di BMI durante l'infanzia piuttosto che in qualsiasi altra età, mostrando la fondamentale importanza degli aspetti dinamici della ripresa della crescita sull'insorgenza dell'insulino resistenza e sui disturbi cardiovascolari.

RIPRESA DELLA CRESCITA DOPO LA NASCITA PREMATURA

Anche la ripresa della crescita negli individui nati prematuri è associata con una successiva insorgenza dell'insulino resistenza. Infatti anche se l'incidenza dell'obesità, del diabete o dei disturbi cardiovascolari non è conosciuta negli individui nati prematuramente (anche perché solo negli ultimi tempi questi individui sopravvivono in numero consistente), bambini ed adolescenti che riprendono a crescere in seguito alla nascita anticipata, indipendentemente se erano adeguati (AGA) o piccoli (SGA) per

l'età gestazionale, presentano una ridotta sensibilità all'insulina ed un incremento dei suoi livelli nel sangue [Singhal A et al, 2003; Hofman PL et al, 2004]. Inoltre, in uno studio longitudinale condotto su giovani uomini e donne nati molto prematuramente, la ripresa della crescita nella prima fase dell'infanzia era un predittore di accumulo di grasso nella vita adulta [Euser AM et al, 2005] così come di elevati livelli di insulina all'età di 19 anni [Finken MJ et al, 2006].

RIPRESA DELLA CRESCITA: UNO STATO DI INSULINO RESISTENZA

Considerando tutti questi studi retrospettivi e prospettivi ci si domanda perché la fase di ripresa del peso sembri, a priori, essere un periodo che rende gli individui particolarmente soggetti allo sviluppo di disturbi cardiovascolari. Ebbene il meccanismo attraverso il quale la ripresa del peso può condurre a questi disturbi cronici metabolici rimane oscuro.

Le ipotesi più recenti si incentrano sul fatto che la malnutrizione, in particolare quando avviene nei periodi critici della crescita e dello sviluppo, può portare ad alterazioni nella struttura e nella funzione di alcuni tessuti e sistemi corporei (le cellule β pancreatiche, i muscoli, gli adipociti, il fegato) [Hales CN et al, 2001; Young JB, 2002]. Si pensa che tale programmazione o imprinting indotto dalla malnutrizione sebbene utile durante un periodo di limitato apporto di nutrienti, contribuisca all'aumento dei rischi di disturbi quando l'alimentazione migliora più tardi nella vita. Inoltre recenti studi mostrano che il recupero della crescita comporta di per se uno stato di insulino resistenza. Alti livelli di insulina plasmatica, in risposta ad un carico di glucosio, sono stati evidenziati durante la fase di ripresa della crescita in neonati e bambini nati SGA [Colle E et al, 1976]. Ancora

più recentemente sono state descritte in diverse nazioni forti associazioni tra la magrezza durante l'infanzia e successivi elevati livelli di insulina plasmatica durante la ripresa della crescita nell'adolescenza [Crowther NJ et al, 1998; Ong KK et Dunger DB, 2004]. Queste scoperte, associate ai recenti studi prospettivi provenienti dal Cile, che mostrano ancora una volta che la ridotta sensibilità all'insulina può essere correlata alla ripresa della crescita [Soto N et al, 2003], sottolineano che lo sviluppo dell'insulino resistenza è una precoce caratteristica del meccanismo attraverso il quale la ripresa della crescita può portare all'aumento dei rischi per successivi disturbi. Se questo precoce stato di insulino resistenza precede o piuttosto è preceduto dal fenomeno di ripresa della crescita al momento è sconosciuto. Ci sono comunque evidenze che suggeriscono che l'insulino resistenza dovuta alla ripresa della crescita sia intimamente correlata con una altissima velocità di accumulo di grasso corporeo sproporzionata rispetto a quella di deposito della massa magra [Dulloo AG et al, 2002].

IL FENOMENO DEL RECUPERO DI GRASSO

Molti dati in letteratura riportano che durante una riabilitazione nutrizionale dopo un periodo di malnutrizione si verifica una eccessiva deposizione di grasso. I primi a evidenziare il concretizzarsi nell'uomo di questo fenomeno dell'eccessivo recupero di grasso furono Widdowson e Shaw nei loro studi condotti nel 1960 sui bambini malnutriti della Jamaica [Widdowson EM et Shaw WT, 1973]. Questi autori notarono che i quando bambini malnutriti riprendono a crescere e raggiungono il peso previsto per la loro altezza i loro corpi risultano costituiti dal 25 al 37% di grasso, con un valore medio di circa il 30%, che è superiore a quello trovato da Garrow e dai suoi

collaboratori in bambini ben nutriti appartenenti allo stesso range di età [Garrow JS et al, 1965].

Molti altri lavori hanno riportato che il guadagno di peso corporeo che si verifica nei neonati e bambini malnutriti è essenzialmente dovuto al guadagno di grasso mentre la ricostituzione della massa magra è rallentata [Graham GG et al, 1969; Castilla-Serna L et al, 1996; Benefice E et al, 2001].

RECUPERO DI GRASSO IN NEONATI E BAMBINI NATI SGA

La tendenza ad accumulare grasso e le sue associazioni con iperinsulinemia e problemi di ridotta tolleranza al glucosio è stata molto recentemente documentata nei bambini nati SGA nei paesi sviluppati. In uno studio condotto in Svizzera i bambini nell'età prepuberale nati SGA presentavano una maggiore percentuale di grasso corporeo e una minore di tessuto magro rispetto a quelli della stessa età nati con un peso adeguato all'età gestazionale [Jornayvaz FR et al, 2004]. Ancora, un recente studio longitudinale condotto in Spagna ha rivelato che, già tra i due e i quattro anni di età, i bambini nati SGA guadagnano più grasso addominale, più grasso corporeo totale e meno massa magra dei bambini AGA a dispetto del simile guadagno di peso e di BMI [Ibanez L et al, 2006] (*fig.1*). Inoltre a partire dai quattro anni di età, questi bambini nati SGA presentano una elevata adiposità e mostrano una più bassa sensibilità all'insulina rispetto ai bambini AGA. [Ibanez L et al, 2006]

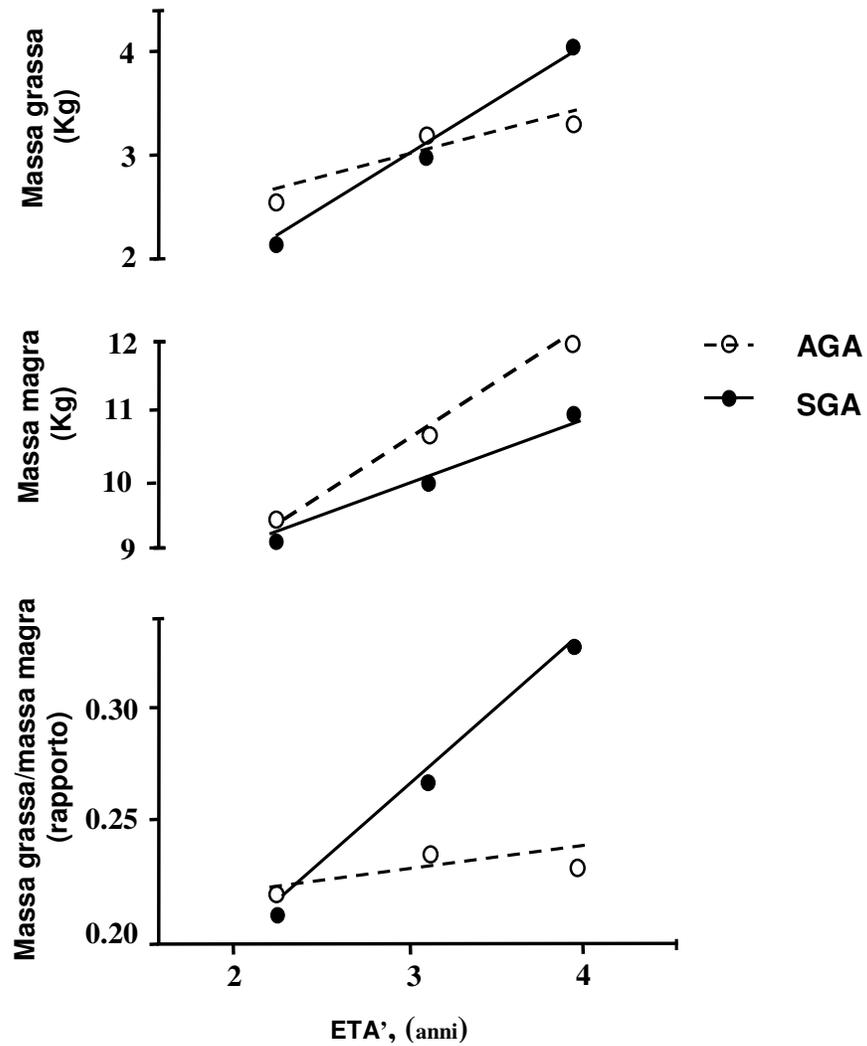
Queste differenze nella composizione corporea associate con ridotta tolleranza al glucosio possono persistere fino all'età adulta come mostrato da alcuni studi condotti in Finlandia [Eriksson J et al, 2002], e in Inghilterra [Kensara OA et al, 2005], i quali

indicano che, a parità di BMI e di età, giovani individui sani nati SGA hanno 3-5 kg in meno di massa magra, più massa grassa ed una maggiore distribuzione addominale di grasso rispetto ai coetanei AGA.

Studi simili condotti in Danimarca in gruppi di giovani uomini sani nati SGA indicano che essi presentano una massa magra leggermente minore ed una massa grassa leggermente superiore ma una chiaramente più alta massa grassa addominale dei coetanei di simile BMI, ed esse mostrano un ridotto assorbimento di glucosio e una ridotta espressione muscolare delle proteine chiave implicate nel trasporto del glucosio e nel “segnale” dell’insulina [Hermann TS et al, 2003].

Figura 1

Composizione corporea dai 2 ai 4 anni di bambini con peso corporeo alla nascita adeguato (AGA) o piccolo (SGA) per l'età gestazionale.



RECUPERO DI GRASSO IN NEONATI NATI PREMATURI

Ci sono delle evidenze che il fenomeno del preferenziale accumulo di grasso si verifica anche nei neonati nati prematuramente, una popolazione questa nella quale si riscontra una ridotta sensibilità all'insulina ed una iperinsulinemia compensatoria nei bambini, negli adolescenti e negli adulti [Hofman PL et al, 2004; Euser AM et al, 2005]. Inoltre, l'applicazione della risonanza magnetica su tutto il corpo, la quale consente la visione e la quantificazione del tessuto adiposo, ha indicato che nei neonati nati estremamente prematuri (sotto la 32 esima settimana gestazionale) e particolarmente poveri di grasso, la successiva ripresa della crescita è accompagnata da un accelerato accumulo di grasso tale che qualche settimana dopo questi neonati raggiungono la stessa adiposità totale dei nati "in tempo" a dispetto del fatto che pesano meno e sono meno lunghi [Uthaya S et al, 2005].

RECUPERO DI GRASSO NEGLI ADULTI

Il fenomeno del preferenziale accumulo di grasso, dovuto alla sproporzionata velocità di recupero di massa grassa rispetto a quella magra, fu evidenziato già all'inizio del ventesimo secolo in adulti che avevano recuperato peso dopo periodi di carestie o malattie [Debray C et al , 1946; Keys A et al , 1950; Dulloo AG et al ,1997].

In particolare Debray ed i suoi collaboratori [Debray C et al ,1946] notarono che il precoce aumento di peso dei prigionieri trasferiti dai campi di concentramento tedeschi in ospedali a Parigi dopo una condizione di estremo digiuno, era largamente dovuto al più veloce accumulo di grasso rispetto al recupero del tessuto muscolare. Keys ed altri

ricercatori [Keys C et al, 1950] nei loro studi sperimentali sugli effetti di un digiuno prolungato e della successiva rialimentazione su obiettori di coscienza durante la guerra trovarono che, quando il grasso corporeo era recuperato al 100 %, il ripristino di massa magra si trovava al 40% del valore misurato prima del digiuno. Questi risultati portarono Keys [Keys C et al, 1950] a descrivere tale accumulo preferenziale di grasso e smisurato aumento dei depositi lipidici come “obesità post-digiuno”. 50 anni più tardi, una conclusione simile fu raggiunta da Weyer [Weyer C et al, 2000] in studi su donne ed uomini che avevano perso circa il 15% del loro peso corporeo durante l'esposizione ad una modesta restrizione calorica sostenuta per due anni, durante il loro confinamento nella biosfera 2, (un “minimondo” ecologico ed indipendente e prototipo di un habitat planetario costruito in Arizona). Sebbene i soggetti ritornassero a pesare come prima di entrare, sei mesi dopo l'uscita il peso recuperato era per la maggior parte dovuto ad un aumento di grasso. Nei tempi passati, questo fenomeno di recupero di grasso predominante sulla ricostituzione del muscolo è stato anche riportato in pazienti adulti ospedalizzati che si riprendevano da gravi perdite di peso, causate da una denutrizione dovuta alla povertà [Barac-Nieto M et al, 1979], all'anoressia nervosa [Mitchell PB et Truswell AS, 1987] e a varie condizioni patologiche ipermetaboliche come cancro [Van Eys J, 1985], shock settico [Streat SJ et al, 1987] e AIDS [Kotler DP et al, 1990]. In passato la spiegazione di questi fenomeni di elevato recupero di grasso e di minimo ripristino della massa magra era incentrata sulla possibilità di un inadeguato introito proteico o di altri nutrienti necessari per una corretta deposizione di proteine, oppure sul fatto che la quantità di cibo consumato potesse eccedere di molto le richieste energetiche per il mantenimento, la sintesi di nuovi tessuti ed il lavoro fisico, in modo tale che l'energia ingerita in eccesso fosse accumulata come grasso. Il fatto che esso

persista con diete bilanciate, spesso con un basso contenuto di grassi, e indipendentemente dal livello energetico di proteine, minerali e vitamine () sottolinea uno specifico aumento dell'efficienza metabolica diretta alla deposizione di grasso, in seguito a un ritardo della crescita o a una consistente perdita di peso. In altre parole il fenomeno del recupero di grasso sembra essere un normale processo fisiologico caratterizzato da un aumento dell'efficienza di utilizzo dell'energia cellulare. Questo preferenziale accumulo di grasso, quindi, è un comune denominatore in molte situazioni caratterizzate da ampie fluttuazioni di peso come durante la ripresa della crescita in neonati nati prematuri, AGA o SGA, o durante il recupero di peso in adolescenti ed adulti. Una questione fondamentale che sorge è se si sa circa i processi che regolano i depositi di lipidi corporei durante questo recupero di grasso, e come questi processi conferiscano un aumento di suscettibilità allo sviluppo dell'insulino resistenza.

SISTEMA DI CONTROLLO CHE REGOLA IL RECUPERO DI GRASSO

Dal punto di vista fisiologico , ci sono 3 sistemi di controllo autoregolatori che possono essere implicati nel recupero di grasso:

- 1- una iperfagia compensatoria diretta, particolarmente durante le fasi di ripresa della crescita e di recupero del peso, su cibi molto energetici ricchi di grasso e carboidrati raffinati,
- 2- uno spostamento nel processo di controllo corporeo di ripartizione dell'energia dai tessuti magri a quelli grassi, particolarmente con diete che risultano inadeguate in specifici nutrienti (proteine, minerali e vitamine) utili all'ottimale sintesi delle proteine,

3- un incremento nell'efficienza della macchina metabolica attuata conservando energia attraverso la soppressione della termogenesi, processo questo che ci conduce al concetto di "metabolismo parsimonioso".

Tutti e 3 i processi possono contribuire all'instaurarsi dell'accelerata velocità di recupero di grasso. Ci sono effettivamente molte evidenze sperimentali che suggeriscono che la ripresa della crescita post-natale possa essere dovuta a iperfagia , come indicato da diversi studi nutrizionali condotti sui bambini [Ounsted M et Sleigh G, 1975], e che questa iperfagia sia dovuta all'impeto di recuperare sia la massa grassa [Dulloo AG et al, 1997] che quella magra [Dulloo AG et al, 1997; Barac-Nieto M et al, 1979; Mitchell PB et Truswell AS, 1987; Dulloo AG et al 2004].

Comunque il fenomeno del preferenziale recupero di grasso è stato dimostrato anche in assenza di iperfagia [Dulloo AG et al , 1996] e in assenza dello shift di energia dai tessuti magri a quelli grassi [Dulloo AG et al, 1996]. Queste evidenze sperimentali, insieme al fatto che tale fenomeno persista anche con diete ben bilanciate, spesso con un basso contenuto di grassi, e indipendentemente dal livello energetico di proteine, minerali e vitamine [Dulloo AG et al, 1997], sottolinea un aumento dell'efficienza metabolica finalizzata alla deposizione di grasso come fondamentale processo fisiologico che opera per accelerare il recupero di lipidi dopo un ritardo della crescita o una perdita di peso. Di conseguenza segue che questa sostanziale riduzione nella spesa energetica risulta di per se implicata nella patogenesi dei disturbi metabolici cronici.

LA TERMOGENESI ADATTATIVA DURANTE IL RECUPERO DI GRASSO

Un'alta efficienza metabolica durante il digiuno sperimentale è stata documentata in studi condotti sull'uomo sulla base di una riduzione della velocità metabolica basale (BMR); tale decremento è maggiore di quanto ci si possa aspettare tenendo presente la perdita di peso e di massa magra [Keys A et al, 1950]. Questa deviazione dai valori predetti è generalmente considerata una conseguenza di un processo regolatorio che, in seguito allo stress del digiuno, aumenta l'efficienza metabolica diminuendo l'utilizzo dell'energia cellulare, sopprime la termogenesi e quindi riduce la velocità di turnover alla quale i tessuti corporei vengono sostituiti. È noto che tale soppressione della termogenesi, osservata in uno stadio relativamente precoce nel corso del digiuno, è principalmente sotto il controllo del sistema nervoso simpatico (SNS) e si crede che sia dettata da segnali inviati direttamente in funzione del deficit di energia nutrizionale [Landsberg L et al, 1984]. Comunque, come dirò in seguito, la comune osservazione che il grasso sia accumulato prima del tessuto magro suggerisce la possibilità che:

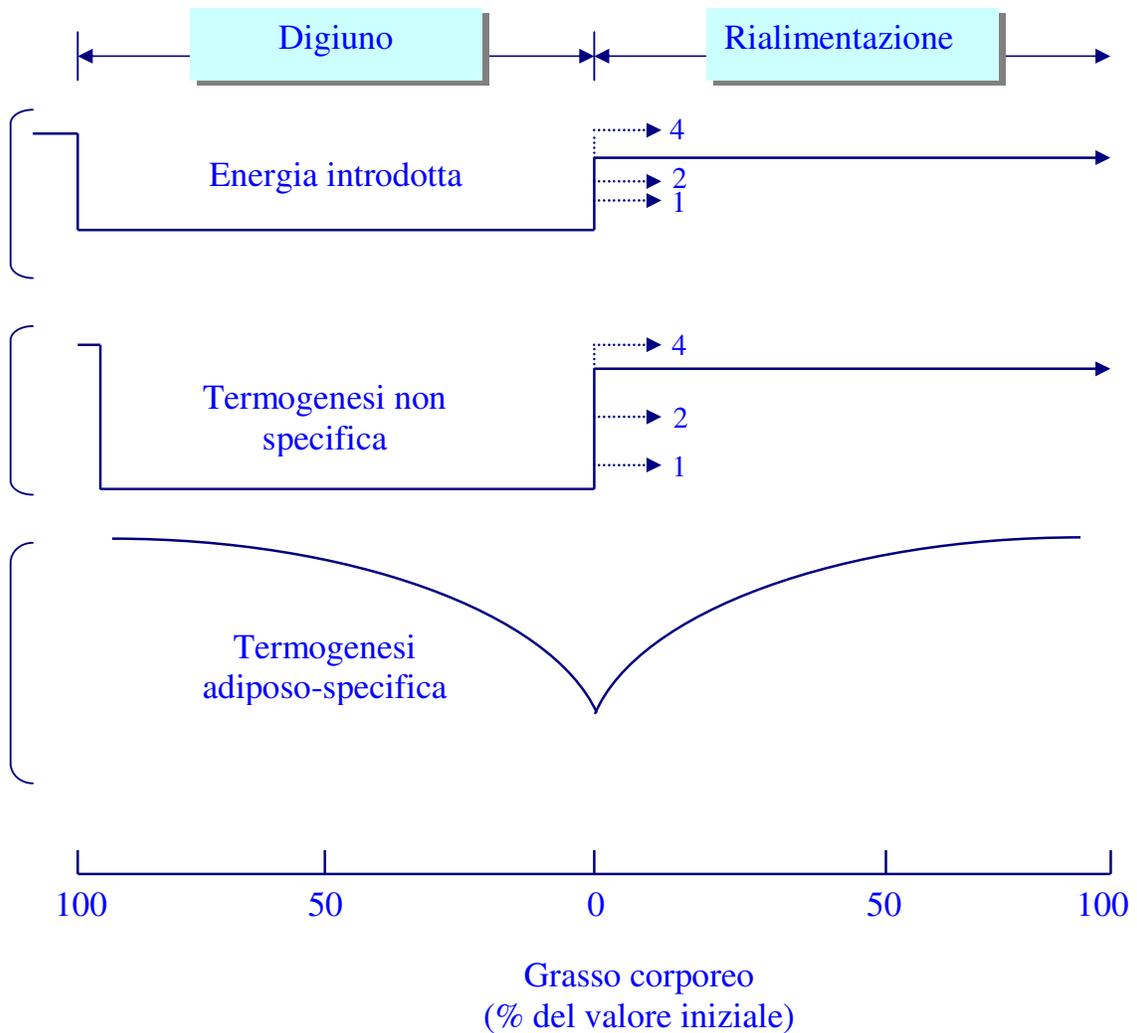
- una componente della riduzione della termogenesi durante la perdita di peso è dettata anche da segnali generati specificamente in risposta al consumo delle riserve di grasso;
- questa componente della riduzione adattativa della termogenesi, che persiste durante il recupero di peso, ha lo scopo di accelerare il ripristino delle riserve di grasso.

La soppressione adattativa della termogenesi in risposta al digiuno e alla rialimentazione può quindi pensarsi costituita da due distinti sistemi di controllo, come descritto in *figura 2* Un primo sistema di controllo, funzione diretta delle variazioni

dell' apporto di energia,risponde con relativa rapidità al deficit energetico. I suoi meccanismi effettori sono soppressi precocemente durante il corso del digiuno, e con la rialimentazione vengono ristabiliti rapidamente in funzione della nuova disponibilità di energia, e in seguito possono essere ulteriormente stimolati se si verifica iperfagia durante la rialimentazione, cosa che potrebbe contribuire ad un aumento della termogenesi indotta dalla dieta (DIT) [Ashworth A, 1969]. Dal momento che l'attività del ramo efferente di tale sistema di controllo, essenzialmente sotto il controllo del SNS, risulta essere modulato non solo dall'apporto energetico della dieta, ma anche da una varietà di altri fattori ambientali come la composizione della dieta, la mancanza di specifici nutrienti, la temperatura ambientale, stress fisiologici ecc [Landsberg L et al, 1984], tale fenomeno è denominato “*sistema di controllo non-specifico della termogenesi*”. Al contrario, l'altro sistema di controllo ha una costante di tempo maggiore, in quanto risponde solo a segnali provenienti dalle riserve di grasso; è quindi denominato “controllo adiposo-specifico della termogenesi” [Dulloo AG, Jacquet J, 2001 a].

Figura 2

La riduzione adattativa della termogenesi in risposta al digiuno e alla rialimentazione: i due sistemi di controllo



I livelli 1-4 durante la rialimentazione corrispondono a differenti introiti calorici: l'energia introdotta ai livelli 1 e 2 risulta inferiore a quella precedente al digiuno, mentre quella a livello 4 è superiore

STUDI UMANI

Un supporto all'esistenza di un controllo adiposo-specifico della termogenesi nell'uomo deriva dalla rianalisi di dati sulle variazioni del BMR e della composizione corporea del "Minnesota Experiment" di restrizione e rialimentazione [Keys et al, 1950]. In questi studi, 32 uomini sani di peso corporeo normale vengono sottoposti a 24 settimane di semidigiuno, durante le quali ogni uomo perde circa il 25% del suo peso corporeo iniziale, seguite da 12 settimane di rialimentazione ristretta con diete relativamente povere di grassi (20% in energia di grassi). Un esame delle variazioni temporali del BMR durante il periodo di semidigiuno (*figura 3*) suggerisce che una volta corretta per le riduzioni della massa magra e grassa, una grande componente di questa apparente riduzione della termogenesi è evidente dalla 4^a settimana (il primo punto sperimentale di dati disponibili sul BMR dall'inizio del digiuno). Tuttavia, un più preciso esame della cinetica della riduzione del BMR "corretto" rivela anche una successiva diminuzione sebbene ad una più bassa velocità durante le venti settimane seguenti. Infatti, il BMR corretto, che alla 4^a settimana si riduceva del 10% rispetto al BMR prima del digiuno, subiva una ulteriore riduzione alla 12^a e 24^a settimana.

Tale legame fra questa componente lenta della riduzione della termogenesi adattativa e i depositi di grasso corporeo è stato in seguito verificato esaminando fino a che punto la variabilità individuale delle variazioni del BMR corretto (termogenesi soppressa) può essere spiegata dal livello di impoverimento delle riserve di grasso corporeo. Come mostrato in *figura 4*, il grafico della variazione del BMR corretto in funzione della variazione del grasso corporeo rivela una relazione positiva durante il digiuno; in altre parole più alto è il livello della diminuzione di grasso durante il digiuno, più alto è il

livello di soppressione della termogenesi [Dulloo AG et al, 1998]. Una relazione simile è stata anche trovata dopo 12 settimane di rialimentazione ristretta: più basso è il livello di accumulo di grasso, più alta è la riduzione del BMR e quindi più alto il livello della riduzione della termogenesi. Queste correlazioni significative fra la ridotta termogenesi e le variazioni dei depositi di grasso contrasta con l'assenza di correlazione con la variazione della massa magra sia durante il digiuno che durante la rialimentazione. Una relazione simile fra l'entità della soppressione della termogenesi ed il recupero del grasso corporeo (e non della massa magra), è stata più recentemente riportata in pazienti che riacquistano peso [Carbonnel F et al, 1997]. Questi risultati, quindi, supportano l'idea che, in risposta ad una riduzione dell'introito energetico, la natura della riduzione della termogenesi adattativa sia bifasica, con una componente rapida seguita da una componente più lenta, la cui cinetica sembra correlarsi con la perdita di peso, grasso e massa magra.

Riassumendo, la cinetica della riduzione adattativa della termogenesi durante il corso di una perdita di peso insieme all'esistenza di una relazione tra tale termogenesi soppressa e la riduzione di grasso durante entrambe le fasi di perdita e recupero di peso, riflette l'attivazione di un sistema di controllo con un feedback negativo tra la termogenesi adattativa e lo stato di deplezione delle riserve di grasso; in altre parole un sistema di feedback autoregolatorio, nel quale i segnali della riduzione delle riserve di grasso esercitano un effetto soppressivo sulla termogenesi.

Figura 3

Riduzione del BMR in 32 soggetti sottoposti a restrizione calorica sperimentale per 24 settimane (Minnesota Experiment)

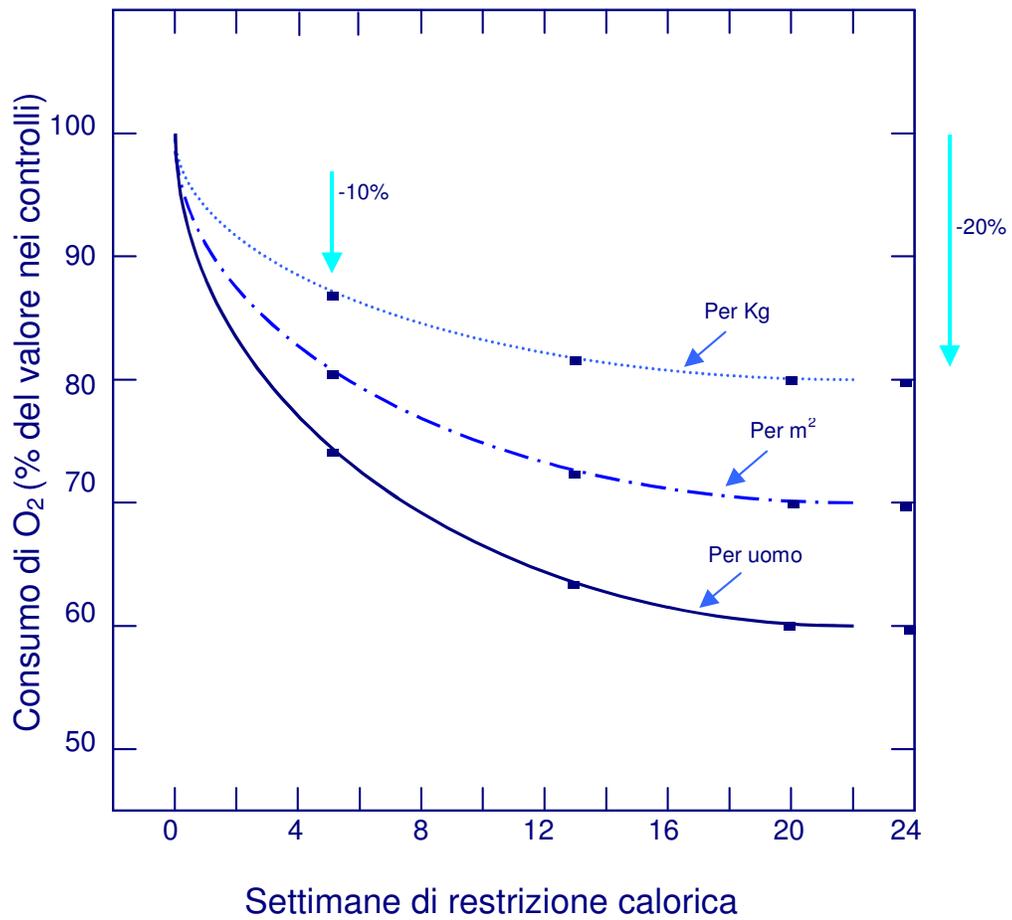
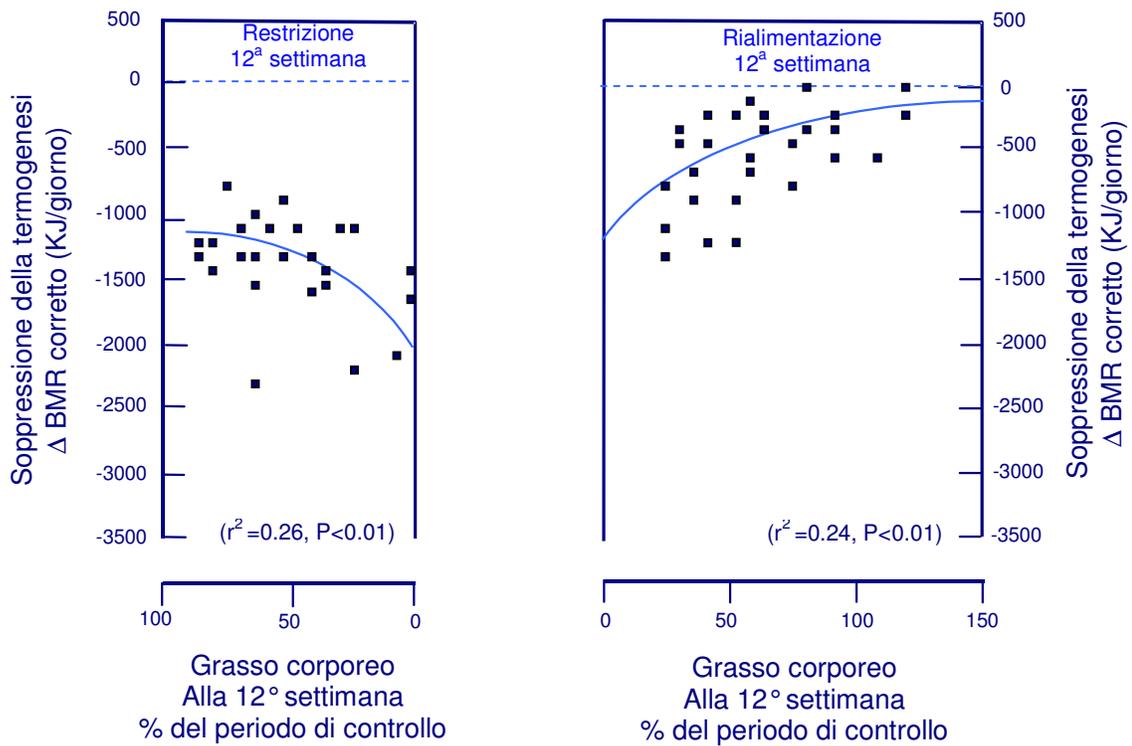


Figura 4

Relazione tra la soppressione della termogenesi e lo stato delle riserve di grasso corporeo durante una perdita ed un successivo recupero di peso



STUDI ANIMALI

Più dirette evidenze dell'esistenza di una soppressione adiposo specifica della termogenesi, il cui ruolo è quello di accelerare specificamente il recupero di grasso corporeo, può derivare da studi del bilancio energetico in animali da laboratorio che recuperano peso dopo il semidigiuno. Se i ratti sottoposti a restrizione calorica vengono rialimentati con la stessa quantità di cibo dei controlli dello stesso peso, la velocità della deposizione delle proteine risulta essere la stessa dei controlli, mentre la velocità di deposizione dei grassi aumenta di circa 2 volte come risultato di una spesa energetica più bassa del 10-15%, durante le prime due/tre settimane di rialimentazione isoenergetica [Dulloo AG et al, 2001 a]. Molti fattori che possono teoricamente contribuire a questa differenza nell'energetica tra i ratti rialimentati ed i controlli (differenza di età, attività fisica, e tipo di dieta) hanno in realtà un minimo impatto sulla differenza della spesa energetica fra i due gruppi [Dulloo AG et al, 1990]. Di conseguenza, nelle condizioni di rialimentazione, la spesa energetica più bassa nei ratti rialimentati rispetto a quella dei controlli è essenzialmente un'energia risparmiata come risultato di una sostenuta soppressione della termogenesi allo scopo di riacquistare grasso.

Il fatto che quando sia i ratti rialimentati sia i controlli vengono iso-alimentati durante l'esposizione a freddo (uno stato di elevata attivazione simpatica della termogenesi), gli animali rialimentati mostrano ancora la capacità di conservare energia per accumulare grasso [Dulloo AG et al, 1995], suggerisce che i meccanismi che controllano la soppressione adiposo-specifica della termogenesi sono chiaramente distinti dal controllo simpatico della termogenesi. In altre parole, il fatto che durante il recupero di peso la

soppressa termogenesi adiposo-specifica (conservazione di energia) può coesistere con una stimolata termogenesi mediata dal simpatico (dissipazione di energia), in risposta a stimoli di freddo [Dulloo AG et al, 1995], iperfagia [Dulloo AG et al, 1993 a], diete povere di proteine [Dulloo AG et al, 1992], o infezioni [Arsenijevic D et al, 1997], suggerisce che questi due sistemi di controllo hanno siti effettori distinti e il controllo della termogenesi adiposo-specifico avviene in siti diversi da quelli reclutati dal SNS in risposta alla dieta e al freddo.

Sulla base di studi della cinetica della velocità di turnover della norepinefrina in diversi organi e tessuti [Landsberg L et al 1978] (*tabella 1*) si può postulare che il meccanismo alla base del controllo non specifico (SNS) della termogenesi opera in tessuti ed organi metabolicamente molto attivi (come il fegato, i reni, il cuore e il tessuto adiposo bruno) ed è rapidamente ristabilito in seguito a una nuova disponibilità di cibo. Al contrario, il meccanismo alla base del controllo adiposo specifico della termogenesi opera soprattutto nel muscolo scheletrico, un tessuto già conosciuto come importante sito della soppressione della termogenesi indotta dal digiuno, come osservato da studi di circolazione regionale di sangue mediante microsfere, accoppiato con misure di consumo di ossigeno artero-venoso [Ma SWY et al, 1986].

Tabella 1

Eterogeneità dell'attività del sistema nervoso simpatico in risposta alla dieta e alla temperatura ambientale nel ratto

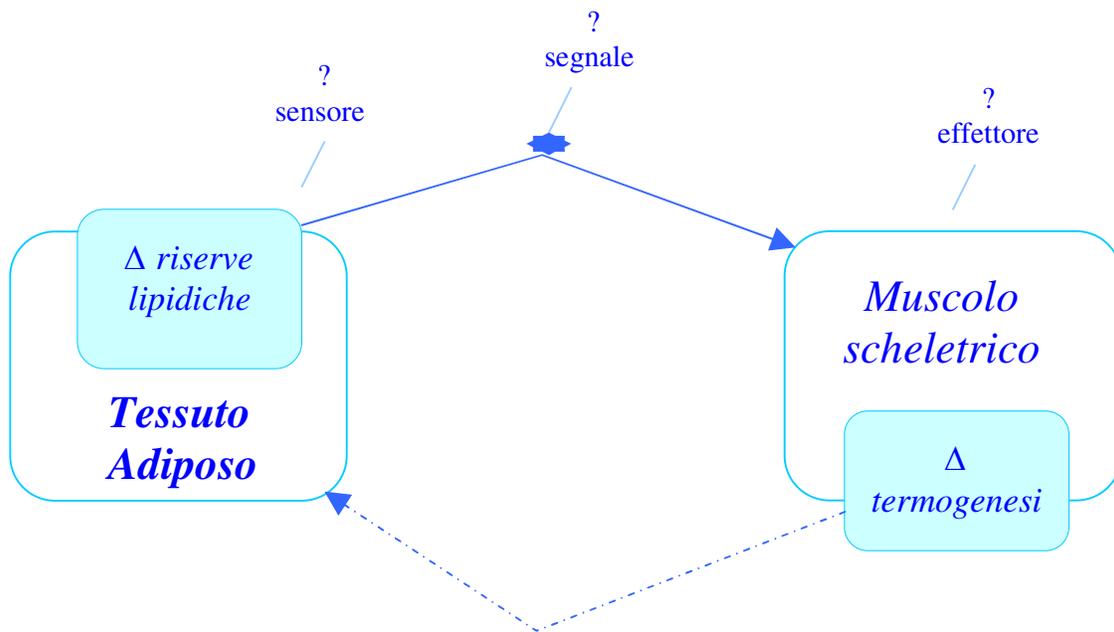
Stimolo	Freddo (6 °C vs 22 °C)	Cibo (normali vs digiuno)
<i>Cuore</i>	↑	↑
Pancreas	↑	↑
Fegato	0	↑
Rene	0	↑
BAT	↑	↑
WAT	↓	↑
Muscolo scheletrico	0	0

Come descritto in *figura 5*, tale sistema potrebbe comprendere uno o più *sensori* dello stato di riduzione dei depositi di grasso, uno o più *segnali* che dettano la soppressione della termogenesi in funzione dello stato di riduzione dei depositi di grasso e un *sistema effettore* che media la termogenesi adattativa nel muscolo scheletrico.

Fino ad oggi, comunque, gli studi di digiuno prolungato e di rialimentazione hanno indicato che né i livelli circolanti di acidi grassi liberi (FFA) né la leptina mostrano variazioni temporali correlate con la cinetica della soppressione della termogenesi adiposo-specifica [Samec et al, 1997]. Non c'è inoltre una convincente evidenza che gli omologhi della proteina disaccoppiante UCP2 e UCP3 abbiano un ruolo fisiologico nella regolazione della termogenesi del muscolo scheletrico [Dulloo AG et al, 2001 b]. Attenendoci alle conoscenze attuali, i sensori, i segnali e il sistema effettore del controllo della termogenesi adiposo-specifica rimangono sconosciuti.

Figura 5

Controllo adiposo-specifico della termogenesi: segnali tra organi



SINIFICATO BIOLOGICO DEL DUPLICE SISTEMA DI CONTROLLO DELLA TERMOGENESI ADATTATIVA

Un tale fenomeno adattativo che accelera il ripristino dei depositi di grasso piuttosto che convogliare l'energia risparmiata verso un incremento compensatorio della sintesi corporea di proteine (un processo energeticamente costoso), potrebbe avere un significato di sopravvivenza nello stile di vita primitiva caratterizzato da un'alternanza tra carestie e periodi di elevata disponibilità di cibo. In virtù del fatto che il grasso corporeo ha una maggiore densità energetica e un più basso costo di sintesi e di mantenimento rispetto alle proteine, esso potrebbe consentire all'organismo una più alta capacità di ricostituire rapidamente una riserva energetica efficiente e quindi di ottimizzare la sua capacità di sopravvivenza di fronte ad un'eventuale carenza di cibo. Ugualmente importante per la sopravvivenza dei mammiferi durante il recupero del peso è la necessità di mantenere la capacità di aumentare la produzione di calore (la termogenesi) in risposta a diversi stress ambientali quali:

- aumentati bisogni termoregolatori durante il recupero di peso in ambienti freddi;
- generazione di febbre durante l'esposizione a infezioni;
- aumentata produzione di calore come adattamento a diete carenti.

Nella sua ragguardevole rianalisi della "Golosità e termogenesi", Stock [Stock MJ, 1999] propose che la necessità di aumentare la termogenesi nel caso di diete carenti probabilmente ha avuto vantaggi evolutivi, in quanto avrebbe permesso un'iperalimentazione (su base energetica) di tali diete carenti, nel tentativo di raggiungere un adeguato introito di uno specifico nutriente senza aumentare eccessivamente il peso, fattore che potrebbe rappresentare un ostacolo per una

locomozione ottimale e per le capacità di correre o volare. Secondo Stock la termogenesi indotta dalla dieta può essersi evoluta come meccanismo per regolare le riserve di nutrienti

essenziali (proteine, minerali e vitamine) e solo con un secondario ruolo di regolazione del bilancio energetico e del peso corporeo.

I due sistemi di controllo della termogenesi differentemente regolati potrebbero essersi affermati durante il corso dell'evoluzione dei mammiferi come un duplice processo adattativo in grado di soddisfare le necessità della conservazione di energia diretta specificamente al recupero dei grassi persino in presenza di stress ambientali, quando l'attivazione della produzione di calore mediata dal simpatico è ugualmente importante per la sopravvivenza. Tuttavia, nella società moderna in cui pasti regolari e altamente palatabili sono disponibili durante tutto l'anno e la rialimentazione con diete ricche di grassi è una pratica comune durante una riabilitazione nutrizionale, il vantaggio evolutivo sia della soppressione adiposo-specifica della termogenesi che dell'iperattività del SNS, che tenta di attivare un controllo non specifico della termogenesi, diventano deleteri in quanto conferiscono una maggiore suscettibilità a disturbi cardiovascolari.

SVANTAGGI DEL SISTEMA A DUPLICE TERMOGENESI

Diete palatabili, generalmente ricche di grassi, carboidrati e sali inducono anche ad assumere quantità di calorie difficilmente raggiungibili con una dieta a bassa densità energetica e alto potere saziante. L'iperfagia durante il recupero di peso, che tenta di stimolare la termogenesi mediata dal SNS (non specifica) allo scopo di limitare un eccessivo guadagno di peso, potrebbe esasperare un già sensibilizzato stato di iperattività del simpatico e una resistenza all'insulina del muscolo scheletrico indotta da una eccessiva soppressione della termogenesi adiposo-specifica. L'attuazione combinata di tali meccanismi potrebbe fornire una più completa spiegazione per il rapido instaurarsi dell'ipertensione da rialimentazione osservata negli uomini [Brozek J et al, 1948], maiali [Smith GS et al, 1964], cani [Wilhelmj CM et al, 1957], conigli [Antic V et al, 1999], ratti [Ernsberger P et al, 1998], topi [Smith-Vaniz GT, 1970] quando questi hanno libero accesso a cibi grassi, dopo un prolungato periodo di limitata disponibilità di cibo.

Così, durante il recupero della crescita o del peso con gli attuali pasti raffinati e palatabili, i meccanismi che regolano il recupero di grasso e di peso sono portati oltre il limite per il quale dovevano operare in una vita primitiva, diventando quindi svantaggiosi. Le conseguenze sono un'aumentata suscettibilità alla resistenza all'insulina del muscolo scheletrico e una iperattività del simpatico, fattori entrambi importanti nella patogenesi dei disturbi metabolici cronici. Nella sua teoria che unisce obesità e ipertensione Landsberg [Lansberg L, 2001] propose che nello stato di obesità, conseguente sia ad un eccesso dietetico sia ad una diminuita capacità di termogenesi (una più bassa velocità metabolica), la conseguente resistenza all'insulina, l'iperinsulinemia, l'iperleptinemia e l'iperattività del SNS sono parte di un meccanismo

adattativo che tenta di attivare la termogenesi per limitare un ulteriore guadagno di peso che svilupperebbe ipertensione e spiacevoli effetti collaterali. Comunque, dal momento che fluttuazioni di peso precoci nel corso della vita (indipendentemente dall'eccesso di peso nelle fasi successive) rappresentano un fattore di rischio indipendente per disturbi metabolici, il meccanismo attraverso il quale il grasso corporeo è depositato potrebbe essere almeno tanto importante quanto le conseguenze di un eccesso di grasso in sé nella patogenesi di diabete, ipertensione e disturbi cardiovascolari.

RESPIRAZIONE ED EFFICIENZA MITOCONDRIALE

Un organismo particolarmente efficiente da un punto di vista metabolico è in grado certamente di sopravvivere più a lungo nei periodi di carestia, ma è anche quello che accumula facilmente tessuto adiposo in un periodo di grande abbondanza di cibo. L'efficienza metabolica può essere definita come una misura dell'entità con cui l'organismo ottiene energia, sotto forma di composti ad elevato contenuto energetico (ATP, adenosina trifosfato), dai nutrienti che introduce con l'alimentazione. Il grado di efficienza metabolica potrebbe, quindi, giustificare la naturale tendenza di alcuni organismi ad accumulare grasso più facilmente di altri. Questi organismi sono anche quelli che più facilmente sopravvivono in condizioni di prolungato digiuno.

I meccanismi che concorrono alla regolazione dell'efficienza metabolica, in genere, sono poco conosciuti. I cambiamenti della spesa energetica a livello dell'organismo in "toto" riflettono paralleli cambiamenti a livello di quegli organi e tessuti, che maggiormente contribuiscono alla velocità metabolica corporea. A livello cellulare, variazioni dell'efficienza energetica mitocondriale nei vari tessuti possono, senz'altro, contribuire alle variazioni dell'efficienza metabolica corporea. Quindi, in condizioni particolari in cui è diminuita la spesa energetica, quali il digiuno, la restrizione calorica e la rialimentazione dopo un periodo di restrizione calorica, la comprensione dei meccanismi di regolazione dell'efficienza mitocondriale può essere di primaria importanza per capire sia la modulazione dell'efficienza metabolica dell'intero organismo, sia i fenomeni indotti da tali stimoli fisiologici nei vari organi.

I mitocondri, presenti in tutte le cellule eucariotiche, sono organelli circondati da membrane che convertono l'energia in forme utili a promuovere le reazioni cellulari.

Con la respirazione mitocondriale, la cellula opera l'ossidazione completa dei substrati organici a spese dell'ossigeno fino ad anidride carbonica ed acqua, ricavandone energia. Nel processo respiratorio mitocondriale viene utilizzato principalmente piruvato che si forma nella glicolisi, ma possono essere utilizzati molti altri acidi organici e in particolare il malato, chetoacidi derivanti dalla deaminazione degli amminoacidi, gli amminoacidi derivanti dalla idrolisi delle proteine o gli acidi grassi derivanti dall'idrolisi dei lipidi. I prodotti finali principali di questa ossidazione sono CO_2 , che è rilasciata dalla cellula come prodotto di rifiuto, nicotinamide adenin dinucleotide ridotto o NADH, che è la fonte principale di elettroni per il trasporto lungo la catena respiratoria. Poiché tale trasporto di elettroni avviene secondo la scala di potenziale redox e, dunque, secondo un gradiente energetico favorevole, ad esso possono essere accoppiate le reazioni di sintesi di adenosinatrifosfato o ATP (*fosforilazione ossidativa*). Gli enzimi della catena respiratoria sono immersi nella membrana mitocondriale interna, che è in genere molto convoluta, e forma una serie di ripiegamenti, noti come creste, nello spazio della matrice.

Il significato metabolico del ciclo dell'acido citrico è l'estrazione di elettroni ad alta energia tramite l'ossidazione del gruppo acetile a CO_2 . Questi elettroni sono trasferiti a due coenzimi NAD e FAD (flavin adenin dinucleotide) o accettori redox che sono ridotti a NADH e FADH_2 prodotto dalla succinico deidrogenasi. Ciò consente alla cellula di recuperare sotto forma di potenziale redox buona parte dell'energia già contenuta nelle molecole dei substrati organici. Attraverso la catena di trasporto degli elettroni viene rimossa una coppia di elettroni dal NADH o dal FADH_2 riducenti ad alta energia, per essere avviata lungo una sequenza di componenti-trasportatori, i cui valori

di potenziale redox diventano progressivamente più positivi fino all'ossigeno che, accettando gli elettroni, si riduce ad acqua.

Secondo l'ipotesi chemiosmotica, durante il trasporto degli elettroni ad alta energia dagli idrogeni del NADH e del FADH₂ lungo la catena respiratoria fino alla membrana mitocondriale interna, l'energia rilasciata nel passaggio da un trasportatore al successivo è usata per pompare protoni (H⁺) attraverso la membrana interna dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana (*figura 6*). Ciò crea un gradiente elettrochimico protonico attraverso la membrana mitocondriale interna e il flusso di ritorno di H⁺ lungo questo gradiente viene a sua volta usato per attivare l'enzima legato alla membrana, ATP sintetasi, che catalizza la conversione di ADP+P_i (adenosina difosfato e fosfato inorganico) ad ATP, completando il processo della fosforilazione ossidativa.

L'ATP sintetasi si comporterebbe, dunque, come una permeasi protonica che tende a riequilibrare il gradiente elettrochimico dei protoni fra i due lati della membrana, trasducendo così l'energia del gradiente in energia conformazionale e, quindi, in energia di legame chimico dell'ATP. L'ATP prodotto dalla fosforilazione all'interno dei mitocondri esce dal mitocondrio grazie all'enzima traslocasi dei nucleotidi adeninici (ANT) inserito nella membrana mitocondriale interna, che catalizza lo scambio con un ADP citosolico entrante nel mitocondrio [Kim JM et al, 1988]. Il trasferimento degli H⁺, attraverso la membrana interna, dallo spazio della matrice allo spazio intermembrana ha come conseguenza la formazione di due tipi di gradienti:

1. un gradiente di pH (ΔpH) attraverso la membrana mitocondriale interna, con il pH della matrice più alto (basico) di quello dello spazio intermembrana;

2. un gradiente di voltaggio (ΔV) (o potenziale di membrana, $\Delta\psi$) derivante dal flusso netto di ioni positivi verso l'esterno, per cui la membrana interna risulterà carica positivamente all'esterno e negativamente all'interno.

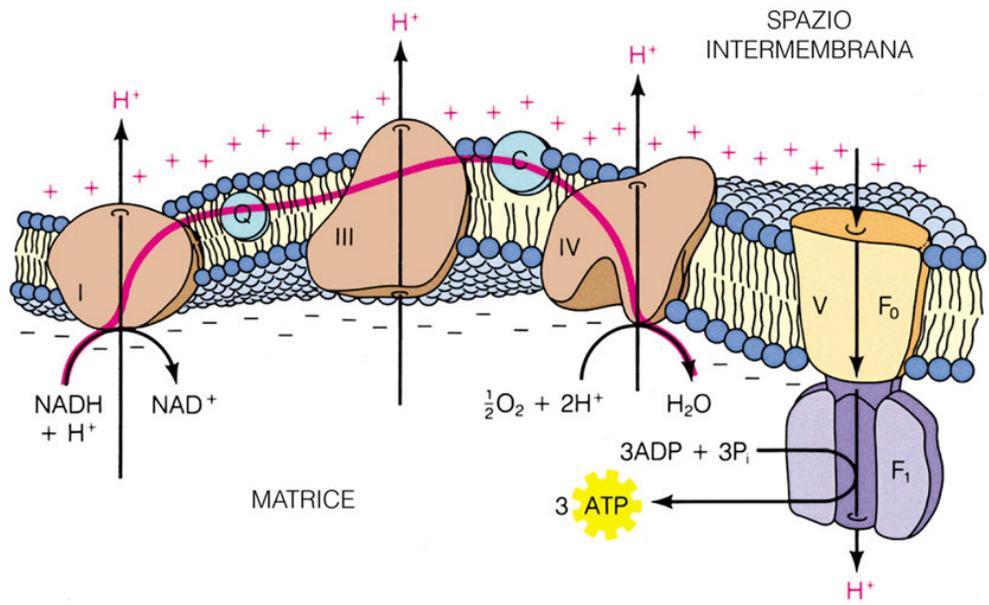
Queste due grandezze (ΔpH e $\Delta\psi$) determinano la forza motrice dei protoni, il cosiddetto *gradiente protonico elettrochimico* ($\Delta\mu$). Tale gradiente elettrochimico di H^+ è quindi la forza spingente per la sintesi di ATP.

Nel processo di fosforilazione della catena respiratoria, l'ADP e il fosfato sono dei reagenti necessari per il trasporto degli elettroni dal NADH all'ossigeno. Infatti, il trasporto degli elettroni procede alla massima velocità nei mitocondri isolati soltanto quando fosfato e ADP sono presenti nel mezzo in cui sono sospesi in quantità saturanti. In assenza di ADP, la velocità della respirazione è molto bassa e non avviene alcuna fosforilazione poiché non vi è accettore per il fosfato, e naturalmente, non vi è sintesi di ATP. Questa condizione nota come *Stato 4* della respirazione, è lo stato di riposo della respirazione. Se ad un sistema isolato di mitocondri allo Stato 4 si aggiunge una quantità saturante di ADP, il consumo di ossigeno aumenta bruscamente fino ad un massimo e contemporaneamente l'ADP aggiunto viene fosforilato ad ATP. Questo è chiamato *Stato 3* o respirazione attiva. Quando tutto l'ADP aggiunto è stato fosforilato, la velocità di consumo dell'ossigeno ritorna allo Stato 4. Questo fenomeno, in cui la velocità di trasporto degli elettroni è controllata dalla concentrazione di ADP, è chiamato controllo da parte dell'accettore o controllo respiratorio. I mitocondri, infatti, hanno un'affinità molto elevata per l'ADP e continuano a fosforilarlo, purchè siano presenti tutti gli altri componenti necessari, finchè la concentrazione di ADP non diventa molto bassa. Il rapporto o *indice di controllo da parte dell'accettore (RCR)* è il

rapporto tra la velocità di respirazione dei mitocondri in presenza di notevoli quantità di ADP e la velocità di respirazione in assenza di ADP.

Figura 6

Catena respiratoria mitocondriale



LA CONDUTTANZA PROTONICA MITOCONDRIALE

L'efficienza del sistema mitocondriale è influenzata dalle caratteristiche di impermeabilità agli H^+ della membrana mitocondriale interna. Tuttavia, nei mitocondri di tutti i tessuti finora studiati, l'accoppiamento tra l'ossidazione dei substrati e la sintesi dell'ATP non è efficiente al 100% poiché la membrana interna dei mitocondri presenta una perdita protonica passiva chiamata *conduttanza protonica basale* [Nicholls DG, 1974]

La conduttanza protonica basale non è un artefatto dell'isolamento dei mitocondri, poiché è stato dimostrato che essa è presente anche nei mitocondri di cellule e di organi intatti, come il fegato, i timociti, i linfociti, il muscolo scheletrico ed il cuore [Rolfe DFS et Brand MD, 1996; Challoner DR, 1968].

Diversi studi hanno dimostrato che il contributo della conduttanza protonica basale al consumo di ossigeno può essere molto elevato, con percentuali che oscillano dal 20% al 50%, in tessuti quali il fegato ed il muscolo. In particolare tale contributo è del 20% negli epatociti attivi e del 25% negli epatociti a riposo [Rolfe DFS et Brand MD, 1996; Brand MD et al, 1994]. Nel muscolo di ratto le percentuali sono più elevate: il 35% nel muscolo in contrazione e il 50% nel muscolo a riposo. Nel cuore intatto, in contrazione, è di circa il 12% [Brand MD et al, 1994]. E' stato calcolato, inoltre, che la conduttanza protonica basale utilizza il 20-25% dell'ossigeno totale, necessario per il mantenimento della velocità metabolica basale del ratto [Rolfe DFS e Brand MD, 1996].

La conduttanza protonica basale mitocondriale è presente non solo negli animali omeotermi, ma anche negli eterotermi e nelle piante indicando che tale proprietà è conservata non solo nei differenti tessuti di uno stesso animale o pianta, ma anche tra specie differenti [Laloi M et al, 1997; Stuart JA et al, 1999].

Gli acidi grassi sono dei disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa nei mitocondri. Nelle cellule intatte e nei tessuti, essi rappresentano un eccellente substrato respiratorio poiché forniscono elettroni alla catena respiratoria. Questa funzione maschera il loro potenziale effetto disaccoppiante che diventa evidente solo in speciali condizioni fisiologiche (digiuno, diete ad alto contenuto di grassi, esercizio eccessivo) o patologiche (diabete) caratterizzate da un inusuale accumulo di acidi grassi [Soboll S et al, 1984]. Il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stato denominato *conduttanza protonica indotta*.

Il coinvolgimento degli acidi grassi nell'indurre una variazione dell'accoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale è nota sin dall'inizio del 1950. Infatti alcuni ricercatori avevano notato che tali effetti erano attenuati dalla presenza di albumina di siero bovina (BSA), una molecola che mostra un'alta capacità di legame per gli acidi grassi [Pressman BC et Lardy HA, 1956; Hulsmann WC et al, 1960].

Successivamente si identificò che gli acidi grassi non esterificati a lunga catena (FFA) erano i reali agenti disaccoppianti "naturali" [Wojtczak L, 1976; Wojtczak L et Schönfeld P, 1993] ed in particolare la loro potenzialità dipendeva dalla lunghezza della catena e dal loro grado di insaturazione [Wojtczak L, 1976; Zborowski J et Wojtczak L, 1963].

Gli studi successivi, portarono a concludere che gli FFA hanno apparentemente tre effetti separati:

1. disaccoppiamento della respirazione mitocondriale dalla sintesi di ATP;
2. permeabilizzazione della membrana mitocondriale interna ai soluti;
3. inibizione dell'adenina nucleotide traslocasi (responsabile di una riduzione delle molecole di ADP consumato per ogni ossigeno consumato o rapporto ADP/O).

In definitiva l'effetto disaccoppiante causato dagli acidi grassi sarebbe la conseguenza di un afflusso di H^+ nella matrice mitocondriale con conseguente diminuzione del potenziale di membrana; in questo modo una parte dell'energia derivata dall'incrementato flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria sembra essere dissipata con un meccanismo simile al disaccoppiamento.

Studi successivi suggerirono che gli acidi grassi sono in grado di incrementare la conduttanza protonica nei mitocondri, interagendo con alcuni componenti della membrana mitocondriale interna. Infatti il gruppo di Skulachev osservò che l'ADP ed alcuni inibitori dell'adenina nucleotide traslocasi (ANT) erano in grado di abolire parte dell'effetto disaccoppiante del palmitato [Dedukhova VI et al, 1991]. Tali evidenze portarono gli autori ad ipotizzare che l'ANT potesse essere coinvolta nel disaccoppiamento mediato dagli acidi grassi. La teoria proposta per questo meccanismo descrive che gli anioni degli acidi grassi (che essendo carichi, non riescono a permeare la membrana mitocondriale interna) sono trasportati dall'ANT o dal trasportatore glutammato/aspartato fuori dalla matrice. Una volta giunti nello spazio intermembrana gli acidi grassi legano i protoni e rientrano nella matrice attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana. Qui per effetto della differenza di pH vengono deprotonati (in questo modo si ha il trasferimento netto di protoni dallo spazio intermembrana alla matrice) e nuovamente traslocati verso lo spazio intermembrana grazie all'intervento dei suddetti sistemi proteici consentendo al ciclo di ricominciare [Garlid KD et al, 1996].

Il risultato finale è una diminuzione del gradiente protonico attraverso la membrana mitocondriale interna.

SCOPO DELLA TESI

In risposta ad un limitato apporto di nutrienti, negli uomini e negli altri mammiferi può verificarsi una riduzione della spesa energetica dell'intero organismo, che è in parte attribuita ad un aumento della efficienza metabolica derivante da una diminuita produzione di calore [Keys A et al, 1950; Dulloo AG et al, 1993 b].

Questo adattamento permette all'organismo un risparmio energetico, in quanto riduce la velocità alla quale le riserve lipidiche vengono consumate. Tale riduzione è di particolare importanza perché fa parte di un meccanismo regolatorio, che per bilanciare un deficit di energia, aumenta l'efficienza metabolica sopprimendo la termogenesi. In questo modo si riduce la velocità con cui è utilizzata l'energia corporea, consentendo così una sopravvivenza più lunga. Inoltre è stato mostrato che questo stato di termogenesi soppressa persiste per un certo tempo dopo la rialimentazione sia negli uomini [Keys A et al, 1950; Dulloo AG et al, 1998] che negli animali da laboratorio [Miller DS et al, 1976; Evans SA et al, 2005], permettendo così un rapido ripristino delle riserve di grasso corporeo allorché il cibo ritorna disponibile.

È facile intuire che tale meccanismo di risparmio energetico si sia evoluto al fine di ottimizzare le capacità di sopravvivenza in una vita primitiva caratterizzata dalla periodica carenza di cibo. Questo meccanismo fisiologico adattativo risulta quindi svantaggioso in una società come quella moderna nella quale il cibo è sempre abbondante e perennemente disponibile. Per di più nella fase di recupero del peso, a causa degli attuali pasti ad alto contenuto energetico e molto palatabili, la termogenesi subisce una esasperata riduzione accrescendo così il suo effetto negativo.

È ben noto che variazioni nella spesa energetica a livello dell'intero organismo riflettono paralleli cambiamenti soprattutto a livello di quegli organi e tessuti che maggiormente contribuiscono alla spesa energetica totale.

Tra i tessuti che meritano maggiore attenzione vi è sicuramente il muscolo scheletrico, che è il tessuto più abbondante del corpo e il suo metabolismo contribuisce per circa il 30% alla spesa energetica a riposo nel ratto [Dulloo AG et Jacquet J, 1998]. A tal proposito, l'analisi del flusso sanguigno con la tecnica delle microsferi accoppiato a misure del consumo di ossigeno artero-venoso ha mostrato che il muscolo scheletrico è un importante sito di risparmio energetico nei ratti a digiuno [Ma SWY et Foster DO, 1986]. Analogamente, nel caso della restrizione calorica e della successiva rialimentazione, l'ipotesi più accreditata identifica il muscolo scheletrico quale principale sito di riduzione della termogenesi in tale condizioni [Dulloo AG et al, 1995].

A livello cellulare, i più importanti siti della termogenesi sono i mitocondri, che si possono considerare la centrale energetica della cellula in quanto sono deputati alla conversione dell'energia in forme utili a promuovere le reazioni cellulari. Con il processo di conversione, denominato fosforilazione ossidativa, la cellula opera infatti l'ossidazione completa dei substrati organici a spese dell'ossigeno, ricavando energia.

La produzione dell'energia metabolica cellulare è, quindi, essenzialmente regolata dall'attività e dall'efficienza della fosforilazione ossidativa, che è principalmente determinata dal grado di accoppiamento tra l'ossidazione mitocondriale dei substrati energetici e la produzione di ATP.

È importante tenere presente, inoltre, che le cellule muscolari sono caratterizzate dalla presenza di due distinte popolazioni mitocondriali, una localizzata al di sotto del

sarcolemma, da cui il nome di *mitocondri subsarcolemmatici (SS)* e l'altra associata alle miofibrille, da cui il nome di *mitocondri intermiofibrillari (IMF)*. È noto in letteratura che queste due popolazioni mitocondriali presentano caratteristiche biochimiche e funzionali differenti [Iossa S et al, 2001; Bizeau ME et al, 1998; Cogswell AM et al, 1993; Krieger DA et al, 1980; Yajid F et al, 1998]. Tali differenze tra i mitocondri IMF e SS suggeriscono che queste due popolazioni possano giocare un differente ruolo metabolico nell'economia della cellula.

Partendo da tali premesse, lo scopo della mia tesi di dottorato è stato quello di individuare i meccanismi ancora sconosciuti alla base di questa caratteristica soppressione della termogenesi nel muscolo scheletrico.

In particolare ho utilizzato due distinti disegni sperimentali. Nel primo ho valutato gli effetti di una restrizione calorica a cui fa seguito una rialimentazione con cibo standard di laboratorio. Nel secondo, invece, mediante un simile ciclo di restrizione-rialimentazione, ho tentato di individuare gli effetti di una rialimentazione ad alto contenuto lipidico per simulare gli effetti degli odierni pasti ad alto contenuto energetico.

In entrambi i disegni sperimentali, ho effettuato misure del bilancio energetico e della composizione corporea negli animali sottoposti ai suddetti trattamenti. Ho, quindi, condotto una caratterizzazione metabolica dei ratti misurando i livelli plasmatici di insulina e glucosio grazie ai quali ho potuto calcolare anche l'indice HOMA..

Appare inoltre evidente che la determinazione sia dell'efficienza metabolica delle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico, sia della massa proteica mitocondriale consentirebbe di acquisire nuove conoscenze sul ruolo svolto da tale tessuto nella regolazione della spesa energetica e potrebbe fornire il meccanismo

molecolare alla base del rapido ripristino delle riserve di grasso corporeo allorquando il cibo ritorna disponibile, dopo un periodo di restrizione calorica.

Alla luce di tali considerazioni, ho determinato anche la massa proteica mitocondriale, la conduttanza protonica basale e quella mediata dagli acidi grassi nei mitocondri IMF e SS isolati dal muscolo scheletrico nei ratti rialimentati e ristretti.

Ho determinato quindi la capacità ossidativa mitocondriale in presenza di substrati lipidici, FAD e NAD dipendenti in modo tale da coinvolgere i differenti siti di ingresso degli equivalenti riducenti nella catena respiratoria mitocondriale.

È, inoltre, noto che l'entità della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) dipende dal grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa, e perciò dall'efficienza. Pertanto un leggero disaccoppiamento, mantenendo il potenziale protonico mitocondriale sotto il livello soglia richiesto per produrre i radicali dell'ossigeno, è funzionale nell'ostacolare l'eccesso di produzione dei ROS. Quindi, per capire se i trattamenti effettuati, agendo sull'efficienza mitocondriale, comportassero anche variazioni della formazione di radicali liberi e quindi un aumento del danno ossidativo cellulare e o delle difese antiossidanti, ho determinato l'attività dell'aconitasi mitocondriale, un enzima del ciclo di Krebs sensibile all'esposizione ai radicali liberi, e l'attività della superossido dismutasi, uno dei sistemi utilizzati dal mitocondrio per metabolizzare i ROS.

MATERIALI E METODI

ANIMALI E DISEGNO SPERIMENTALE 1: RESTRIZIONE - RIALIMENTAZIONE

Per il disegno sperimentale 1 sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley, di sei settimane di età. Un gruppo di ratti del peso medio di circa 220g è stato sottoposto a restrizione calorica per due settimane dopo le quali è stato sottoposto ad una settimana di rialimentazione; un altro gruppo di ratti, di circa 100 g di peso medio, è stato alimentato ad libitum durante tutto il trattamento e rappresenta il gruppo di controllo avente lo stesso peso dei trattati.

La restrizione calorica è stata realizzata somministrando un pasto giornaliero pari al 50% di quello che i ratti avrebbero spontaneamente introdotto nel corso del trattamento; nella rialimentazione è stata, invece, fornita la stessa quantità di cibo mediamente introdotta dai ratti di controllo al fine di evitare che i ratti, finora sottoposti a restrizione calorica, tendessero ad iperalimentarsi. In entrambi i casi il cibo utilizzato è stato il mangime standard di laboratorio.

Alla fine della restrizione e al termine della rialimentazione alcuni ratti sono stati sacrificati per la determinazione del contenuto energetico e della composizione corporea. In particolare le carcasse dei ratti sono state autoclavate, pesate, sminuzzate e infine omogeneizzate (con una diluizione 1:2 p/v) con un omogenizzatore Polytron (circa 15000 rpm per 5 minuti/ 100 g di carcassa). Aliquote dell'omogenato così ottenute sono state congelate e in seguito utilizzate per le misure del contenuto energetico e della composizione corporea.

Al termine del periodo sperimentale sia di restrizione che di rialimentazione, i restanti animali sono stati anestetizzati con ghiaccio secco e sono stati sacrificati mediante

decapitazione avendo cura di prelevare un'aliquota di sangue.. Infine è stato prelevato il muscolo scheletrico degli arti posteriori al fine di poterne estrarre le due subpopolazioni mitocondriali mediante l'utilizzo di opportune centrifugazioni differenziali

ANIMALI E DISEGNO SPERIMENTALE 2: RESTRIZIONE - RIALIMENTAZIONE IPOLIPIDICA E IPERLIPIDICA

Per il disegno sperimentale 2 sono stati utilizzati ratti maschi appartenenti allo stesso ceppo e dello stesso peso medio del disegno sperimentale 1.

In questo disegno sperimentale, due gruppi di ratti (Dieta ipolipidica e Dieta iperlipidica) sono stati prima sottoposti ad una restrizione calorica della durata di due settimane, come descritto nel precedente disegno sperimentale, e poi sono stati sottoposti ad una rialimentazione della durata di una settimana con quantità isocaloriche di due distinte diete, una ad alto contenuto glucidico (dieta ipolipidica) ed una ad alto contenuto lipidico (dieta iperlipidica).

In particolare le dosi giornaliere dei pasti forniti ai ratti sono state calcolate in modo tale che le due diete risultassero isoenergetiche e che quindi differissero solo per il contenuto di grassi e carboidrati mantenendo invariate la percentuale di proteine, vitamine, minerali e fibre. La composizione delle diete è riportata nella tabella 2

Alla fine della restrizione e al termine della rialimentazione alcuni ratti sono stati sacrificati per la determinazione del contenuto energetico e della composizione corporea. Alla fine della rialimentazione i restanti animali sono stati sacrificati per realizzare le misure sui mitocondri SS e IMF isolati dal muscolo scheletrico.

Anche in questo disegno sperimentale, come per il precedente, è stata eseguita la stessa procedura sia per l'isolamento dei mitocondri che per la preparazione delle carcasse

utilizzate per le misure del bilancio energetico e della composizione corporea.

In tutti e due i disegni sperimentali, i ratti sono stati stabulati singolarmente ad una temperatura di $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, e sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Il trattamento, la stabulazione ed il sacrificio dei ratti sono stati condotti nel rispetto delle direttive del Ministero della Sanità Italiano.

Tabella 2

Composizione delle diete ipolipidica e iperlipidica, relative dosi giornaliere e contenuto energetico.

COMPONENTI DELLA DIETA	dieta ipolipidica (g/100 g)	dieta iperlipidica (g/100 g)
Mangime standard di laboratorio in polvere ¹	12.3	12.3
Caseina	22.3	22.3
Colina	0.2	0.2
Minerali ²	3.5	3.5
Vitamine ³	1	1
Olio di girasole	0.3	0.3
Zucchero	4.5	-
Glucosio	5	-
Acqua	5	3.2
strutto	-	4.8
Dose giornaliera in g	28.5	22
Contenuto energetico KJ/g	14	18.1

¹ Mucedola 4 RF21, Settimo Milanese, Milano

² AIN= American Institute of Nutrition (1977)

³ AIN= American Institute of Nutrition (1980)

BILANCIO ENERGETICO

Durante il periodo di trattamento sono stati controllati sia il peso corporeo sia la quantità di cibo introdotta, sottraendo anche quella quantità eventualmente caduta durante l'introduzione del pasto. Si può in questo modo calcolare l'introito calorico lordo, ottenuto considerando il valore energetico della dieta standard di laboratorio, misurato con una bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico Parr). L'utilizzo di tale strumento ha reso possibile la determinazione del contenuto energetico anche delle feci, prodotte durante tutto il periodo di trattamento: l'energia metabolizzabile introdotta si può quindi calcolare sottraendo all'introito calorico lordo il contenuto energetico delle feci e sottraendo infine un 4% di energia che si assume essere perso con le urine [Iossa S et al, 2002].

Per effettuare le misure con la bomba calorimetrica, i campioni sono stati essiccati, ridotti in polvere e pressati al fine di ottenere pasticche di peso non superiore ai 200 mg. Per la misura ogni pasticca è stata posizionata su un piattello di platino e messa in contatto con un filo di nichel agganciato a due uncini di platino attraverso cui passa la corrente elettrica. Questo sistema viene chiuso in un recipiente d'acciaio in cui viene compresso ossigeno alla pressione di 35 atm, per rendere possibile la combustione del campione. Il calore fornito dall'ossidazione dei substrati presenti nel campione fa innalzare la temperatura di un volume noto d'acqua distillata, che circonda il recipiente d'acciaio ed è isolata dall'esterno da un intercapedine di materiale isolante. Ogni misura può essere suddivisa in tre fasi:

- Una prima fase in cui viene dato alle varie parti del calorimetro il tempo di raggiungere l'equilibrio termico (T_i);

- Una seconda fase in cui il campione è ossidato e nel sistema si ha una variazione di temperatura (T_f);
- Una terza fase in cui il calorimetro raggiunge nuovamente l'equilibrio termico.

Attraverso il registratore della temperatura collegato al termometro immerso nell'acqua, è stato misurato l'innalzamento termico (ΔT), come differenza tra la temperatura massima alla combustione (T_f) e quella prima della combustione (T_i). Effettuando delle misure ripetute con pastiglie di acido benzoico secco, di cui è noto il calore specifico di combustione (26.4 KJ/g) è stata inizialmente determinata la capacità termica dell'apparecchio, dopodiché, conoscendo il peso delle pastiglie di campione e il ΔT prodotto dalla loro combustione, è stato calcolato il loro contenuto energetico, espresso come KJ prodotti per grammo di campione secco.

Dalle aliquote dell'omogenato di ratto che erano state preparate al momento del sacrificio dopo essiccamento, si è determinato il contenuto energetico della carcassa, sempre mediante l'utilizzo della bomba calorimetrica.

A questo punto è stato possibile calcolare il guadagno energetico corporeo come differenza tra il contenuto energetico dei ratti alla fine del trattamento e quello calcolato sul gruppo di ratti sacrificati all'inizio del periodo sperimentale; la spesa energetica, in base all'equazione del bilancio energetico, è stata calcolata come differenza tra l'energia introdotta e quella guadagnata. L'efficienza metabolica lorda si è ottenuta dal rapporto percentuale tra il guadagno energetico e l'energia metabolizzabile assunta.

MISURA DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA

Dall'omogenato di carcassa sono state prelevate delle aliquote per la determinazione del contenuto di acqua e lipidi. Il contenuto di acqua è stato ottenuto per differenza tra il peso delle aliquote di omogenato prima e dopo dell'essiccamento a 60°C per 48 ore. Il contenuto lipidico è stato calcolato mediante il metodo di Folch [Folch et al 1957], che consiste in una estrazione iniziale dei lipidi dall'omogenato di carcassa, diluito 20 volte in una miscela cloroformio/metanolo (2:1), seguita da filtrazione; al filtrato ottenuto vengono aggiunti 0.2 volumi di NaCl 0.29% e dopo un'agitazione vigorosa di 30 minuti e una centrifugazione a 1000 g per 20 minuti (21°C), si osserva la separazione di una fase acquosa superiore ed una fase lipidica inferiore. A questo punto la fase acquosa viene aspirata con una pompa e l'interfaccia viene lavata con una soluzione contenente cloroformio/metanolo/NaCl (3:48:47), con lo scopo di eliminare i contaminanti non lipidici dall'estratto; nel passaggio successivo la fase lipidica viene versata in palloni di vetro di cui è noto il peso, per ottenere l'evaporazione dei solventi organici, mediante l'utilizzo dell'evaporatore rotante Heidolph. Si risale così al peso dei lipidi per grammo di carcassa e, attraverso il coefficiente 39.2 KJ/g viene convertito il contenuto lipidico in KJ di energia corporea depositata sotto forma di lipidi.

Il contenuto proteico della carcassa è stato calcolato per differenza tra il contenuto energetico totale e quello dovuto ai lipidi.

Il guadagno lipidico (o quello proteico), espresso in KJ, è stato calcolato come differenza tra l'energia depositata sotto forma di lipidi (o proteine) che è stata misurata nei ratti alla fine del trattamento e quella determinata nei ratti all'inizio del periodo sperimentale.

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI GLUCOSIO, INSULINA E DELL'INDICE HOMA

Trascorsi 30 minuti dal prelievo, il sangue è stato posto in apposite provette addizionate con EDTA e centrifugato alla velocità di 5000 rpm per 10 minuti, alla temperatura di 20°C.

Applicando questa procedura è stato possibile separare il plasma, rappresentato dal surnatante, dalla parte corpuscolata del sangue, cioè il pellet. I campioni di plasma sono stati conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento in cui sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse. In particolare si è provveduto alla misura dei livelli plasmatici di glucosio, di insulina ed al calcolo dell'indice Homa.

I livelli plasmatici di glucosio sono stati valutati mediante un metodo enzimatico colorimetrico usando un kit commerciale (Poker, Italia).

I livelli di insulina sono stati, invece, determinati mediante il dosaggio ELISA che sfrutta il metodo del doppio anticorpo (sandwich) ed utilizza come enzima coniugato la perossidasi di rafano. In seguito all'aggiunta del substrato della perossidasi, si sviluppa un composto colorato la cui intensità è proporzionale alla quantità di enzima presente.

L'indice Homa (Homeostasis Model Assessment), che è un indice derivato di insulino resistenza, è una particolare trattazione matematica che ci permette di valutare eventuali cambiamenti della sensibilità all'insulina in funzione dei livelli circolanti di glucosio e dell'ormone. Nello specifico rappresenta il rapporto fra il prodotto delle concentrazioni di glucosio e di insulina nel sangue ed una costante, il numero 405, quindi:

$$\text{HOMA} = [\text{insulinemia (mU/L)} \times \text{glicemia (mg/dL)}] / 405$$

PREPARAZIONE DEI MITOCONDRI SUBSARCOLEMMATICI ED INTERMIOFIBRILLARI DAL MUSCOLO SCHELETRICO

Il muscolo prelevato è stato pesato, dopo aver eliminato l'eccesso di grasso e connettivo, e viene sminuzzato in una soluzione contenente KCl 100 mM, Tris 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, 0.1% (p/v) di albumina serica libera da acidi grassi (BSA), a pH 7.5. I frammenti tissutali così ottenuti sono stati omogeneizzati con la stessa soluzione (1:8 p/v) in un omogenizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) regolato a 500 rpm (4 colpi per un minuto), allo scopo di rompere le membrane per favorire l'uscita dei mitocondri. L'omogenato è stato poi sottoposto a centrifugazione a 500 g per 10 minuti a 4°C: i mitocondri intermiofibrillari, insieme alle componenti più pesanti della cellula (nuclei, frammenti di membrana e cellule rimaste intatte) precipiteranno, mentre nel surnatante rimarranno sospesi i mitocondri subsarcolemmatici.

A questo punto le preparazioni si separano :

- Per i mitocondri subsarcolemmatici, il surnatante è stato sottoposto ad una centrifugazione a 3000 g per 10 minuti, ed il pellet è stato poi sottoposto ad un lavaggio per due volte ed infine risospeso in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, Tris 50 mM, 0.1% di BSA (pH 7.5).
- Per i mitocondri intermiofibrillari, il pellet derivato dalla prima centrifugazione è stato trattato con proteasi nagarse (circa 3.3 U/g di tessuto) per cinque minuti, la sospensione è stata poi omogenizzata, filtrata attraverso una garza sterile e centrifugata a 3000 g per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso e centrifugato a 500 g per 10 minuti a 4°C, ed il surnatante risultante è stato ricentrifugato a 3000 g per 10 minuti. Il pellet ottenuto è stato lavato una sola volta e risospeso

in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, Tris 50 mM, 0.1% di BSA (pH 7.5).

DOSAGGIO PROTEICO

Aliquote delle due frazioni mitocondriali, diluite 1:25, è stato sottoposte ad un dosaggio proteico, condotto secondo il metodo di Hartree, una modifica del metodo di Lowry [Hartree EF, 1967], per determinare la concentrazione proteica dei mitocondri isolati. Tale dosaggio è di tipo colorimetrico, per cui determina la formazione di un colore la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica nel campione.

Tale metodo combina la reazione del biureto con quella del Folin-Ciocalteu, ed il colore che si sviluppa proviene dalla riduzione degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico a blu di tungsteno e di molibdeno, operata dal complesso Cu-proteina e dal triptofano e dalla tirosina delle proteine in ambiente alcalino. La modifica rispetto al metodo di Lowry sta in un aumento della concentrazione di tartrato di sodio-potassio e nell'impiego di temperature più elevate (50°C). Tali variazioni rendono la metodica più sensibile e consentono una correlazione lineare tra assorbanza e concentrazione proteica per un più ampio intervallo di valori di concentrazione. Lo standard utilizzato è la BSA.

DETERMINAZIONE DELLA MASSA PROTEICA MITOCONDRIALE

La misura della massa proteica mitocondriale si può ottenere seguendo due vie: 1) dalla misura dell'attività di un enzima marker mitocondriale, la citrato sintasi, determinata sia negli omogenati sia nei mitocondri isolati dal muscolo scheletrico in accordo con il metodo descritto da Srere [Srere PA, 1969], 2) dalla valutazione della resa mitocondriale.

Seguendo il primo approccio sperimentale, l'attività della citrato sintasi misurata nell'omogenato ed espressa per g di muscolo riflette il prodotto della massa proteica mitocondriale e dell'attività specifica dell'enzima citrato sintasi, ottenuta attraverso la misura dell'attività di tale enzima nei mitocondri SS ed IMF ed espressa per mg di proteine mitocondriali. Inoltre, per determinare la massa proteica in ciascuna popolazione mitocondriale, l'attività della citrato sintasi misurata nei mitocondri SS e IMF è espressa per g di tessuto iniziale. In esperimenti preliminari è stato valutato il grado di purezza dei mitocondri IMF ed SS, misurando la possibile contaminazione da parte di altre ATPasi contenute nei residui di membrane. I risultati di tali esperimenti hanno mostrato un buon grado di purezza dei suddetti mitocondri.

Nel secondo metodo è stata valutata la resa proteica mitocondriale andando ad esprimere in g di tessuto iniziale, i mg di proteina mitocondriale ottenuta dall'isolamento delle popolazioni mitocondriali SS e IMF. I cambiamenti nella resa mitocondriale possono dipendere da due condizioni: a) cambiamenti nella quantità dei mitocondri nel tessuto iniziale; b) cambiamenti nelle caratteristiche di sedimentazione degli organelli. Per escludere la possibilità che i cambiamenti nella resa mitocondriale possano essere dovuti alla perdita dei mitocondri durante la procedura d'isolamento, è

stata stimata la resa dell'attività della citrato sintasi nelle varie aliquote prelevate durante la procedura di isolamento dei mitocondri SS o IMF.

MISURA DELL'ATTIVITÀ RESPIRATORIA NEI MITOCONDRI ISOLATI

L'attività respiratoria nei mitocondri isolati è stata misurata con un metodo polarografico, realizzato attraverso l'uso dell'elettrodo ad ossigeno di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino ed un anodo di argento, immersi in una soluzione di KCl (ponte salino) e separati dalla soluzione in esame da una membrana. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. Quando si applica agli elettrodi un voltaggio di 0.5- 0.8 volts, l'ossigeno al catodo viene ridotto da 4 elettroni prodotti all'anodo, originando così una corrente proporzionale alla sua quantità nella soluzione in esame. La tensione d'ossigeno al catodo, quindi, tende ad azzerarsi, promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. L'elettrodo di Clark, perciò, consente di misurare i rapidi cambiamenti che si riscontrano nell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari.

Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando un mezzo di incubazione contenente KCl 30 mM, MgCl₂ 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, KH₂PO₄ 20 mM, pH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA libera da acidi grassi.

I mitocondri sono stati indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono stati aggiunti i substrati respiratori.

La velocità del consumo di ossigeno è stata misurata in condizioni di inattività dell'ATP-sintetasi (*STATO 4*), utilizzando il rotenone (3.75 μM) come inibitore del primo complesso della catena di trasporto della membrana mitocondriale interna, la NADH-deidrogenasi, e il succinato (10 mM) come substrato FAD dipendente. Si misura in questo modo solo il passaggio di elettroni dal secondo al quarto complesso della catena di trasporto mitocondriale, elettroni ceduti alla catena di trasporto dal FAD.

Aggiungendo poi l'ADP (0.6 mM) in quantità saturanti, il flusso di ioni H^+ accoppiato al trasferimento di elettroni passerà attraverso l'ATP-sintetasi, determinando la sintesi di ATP. Si misura quindi lo *STATO 3* della respirazione, che rappresenta la velocità di consumo di ossigeno in condizioni attive.

Il rapporto di controllo respiratorio (*RCR*) è calcolato come rapporto tra stato 3 e stato 4 e rappresenta un indice dell'integrità dei mitocondri.

La velocità di consumo di ossigeno è stata misurata anche utilizzando il glutammato (10 mM) come substrato NAD dipendente, in presenza di malato (2.5 mM), ed utilizzando il palmitoilCoA (40 μM) come substrato lipidico, in presenza di malato (2.5mM) e di carnitina (2mM).

Il consumo di ossigeno è stato espresso in ngatomi al minuto per mg di proteine mitocondriali.

MISURA DEL POTENZIALE DI MEMBRANA SUI MITOCONDRI ISOLATI

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato utilizzando la lettura spettrofotometrica, ottenuta mediante uno spettrofotometro (JASCO) a doppia lunghezza d'onda, della safranina, un colorante che in virtù della sua carica elettrica si

lega alla membrana mitocondriale in maniera proporzionale al potenziale [Nedergaard J, 1983]. Lo spettrofotometro adoperato è programmato in modo tale che la lunghezza d'onda di riferimento (533 nm) coincida con il punto isosbestico della safranina, quel punto, cioè, dello spettro di assorbimento in cui la molecola di colorante mostra la stessa assorbanza sia nello stato legato che in quello non legato alla membrana mitocondriale. La lunghezza d'onda di lettura è invece 511 nm. Per risalire al potenziale di membrana dai valori dell'assorbanza si effettuano misure dell'assorbanza della safranina in presenza di valinomicina 3 μM , un trasportatore specifico del potassio, e di quantità crescenti di KCl necessarie ad alterare la concentrazione esterna di potassio nel range 0.1 - 20 mM. A questo punto si costruisce una retta di taratura che mette in relazione le variazioni di assorbanza al logaritmo della concentrazione esterna di potassio, e che, quindi, consente di risalire alla concentrazione extra ed intramitocondriale di tale ione. Per estrapolazione da tale retta, infatti, si ricava la concentrazione interna di potassio, considerando che quando la variazione di assorbanza della safranina è nulla, anche il potenziale di membrana è pari a zero e quindi, in base all'equazione di Nernst, le concentrazioni di potassio esterna ed interna si equivalgono [Nedergaard J, 1983]. Ottenute le concentrazioni di potassio esterna ed interna alla membrana mitocondriale, mediante l'equazione di Nernst ($\Delta\Psi = 61 \text{ mV} \times \log ([\text{K}^+]_{\text{in}} / [\text{K}^+]_{\text{out}})$) si può calcolare il potenziale di membrana dei mitocondri e realizzare un grafico per mettere in relazione i valori di potenziale di membrana con l'assorbanza della safranina. Per interpolazione da tale curva si potranno ottenere i valori del potenziale di membrana mitocondriale nelle varie condizioni sperimentali utilizzate.

MISURA DELLA CONDUTTANZA PROTONICA BASALE

L'applicazione del metodo di Brand [Brand MD, 1990] ha consentito la valutazione della conduttanza protonica basale dei mitocondri isolati: tale metodica consiste in una titolazione della respirazione con il succinato a partire dallo Stato 4, in presenza di oligomicina, con quantità crescenti di malonato, un inibitore competitivo del secondo complesso della catena respiratoria, la succinico deidrogenasi, e permette di determinare le variazioni del potenziale di membrana associate alle variazioni del consumo di ossigeno ottenute in queste condizioni. Per poter determinare sperimentalmente la conduttanza protonica basale si adopera l'oligomicina, un antibiotico capace di abolire il flusso di protoni attraverso l'ATP sintetasi, prevenendo il passaggio dei protoni attraverso la subunità F_o . In questo modo si fa sì che il flusso protonico valutato dipenda solo dalla conduttanza protonica basale.

Al diminuire della velocità di ossidazione del substrato causata dalle aggiunte di malonato, diminuisce la velocità di pompaggio dei protoni all'esterno e quindi anche il valore del potenziale di membrana. Le curve di titolazione così ottenute sono una misura indiretta della conduttanza protonica perché, in stato stazionario, la velocità di consumo di ossigeno (cioè il flusso di protoni in uscita) nei mitocondri in assenza di fosforilazione equivale al flusso protonico in entrata dovuto alla conduttanza protonica.

In effetti il potenziale di membrana (Δp) è costituito da due componenti:

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

Sperimentalmente è possibile abolire il ΔpH facendo in modo che il Δp risulti uguale al $\Delta\Psi$: a questo scopo si utilizza la nigericina, uno scambiatore H^+/K^+ , in grado di annullare la differenza di pH a livello della membrana mitocondriale interna, e di

conseguenza abolire la differenza di potenziale chimico, trasformandola in differenza di potenziale.

Le misure sono state effettuate a 30° C in una soluzione contenente LiCl 30 mM, MgCl₂ 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, Tris-PO₄ 20 mM, succinato 10 mM, rotenone 3.75 μM, oligomicina 2 μg/ml, safranina O (83.3 nmol/mg) e nigericina (80 ng/ml) 0.1% (p/v) di BSA e pH 7.0. La titolazione dello Stato 4 della respirazione è stata eseguita mediante sequenziali aggiunte di malonato fino a 5 mM.

MISURA DELLA CONDUTTANZA PROTONICA INDOTTA DAGLI ACIDI GRASSI

Per avere informazioni più precise sul disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stata anche effettuata la determinazione della cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi in analogia a quella effettuata per la conduttanza protonica basale. Tale determinazione è stata ottenuta titolando la respirazione ed il potenziale di membrana in presenza di oligomicina, succinato e palmitato con quantità crescenti di malonato fino a 0.6 mM per i mitocondri IMF e 1.07 mM per i SS.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELL'ACONITASI MITOCONDRIALE

L'aconitasi, il secondo enzima del ciclo di Krebs, catalizza la interconversione reversibile di acido citrico in isocitrico, che viene poi ossidato dalla isocitrico deidrogenasi ad α-chetoglutarato, con formazione di NADP ridotto. Poichè il NADPH assorbe a 340 nm, il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente,

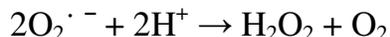
misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm dovuto proprio alla formazione di NADPH.

Il dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare i danni "in vivo" prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche [Gardner PR, 2002]. Infatti l'aconitasi è particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali ossigeno [Fridovich I, 1995; Flint DH et al, 1993; Gardner PR et al, 1997; Drapier JC et al, 1996], per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi.

Per il dosaggio si utilizzano solo campioni congelati in azoto liquido immediatamente dopo l'isolamento e conservati a -80°C, in quanto l'attività dell'aconitasi si danneggia in tempi molto brevi. I campioni sono stati incubati a 25°C in un buffer costituito da Tris-HCl 50mM (pH 7.4) e MnCl₂ 0.6mM, NADP⁺ 0.2 mM, sodio-citrato 30 mM e 2 U/ml di isocitrico deidrogenasi. La misura è stata realizzata in presenza del Triton 1%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare. La determinazione dell'attività dell'aconitasi è stata effettuata monitorando l'assorbanza a 340 nm ogni minuto per 50 minuti (SS) o 90 minuti (IMF). L'attività dell'aconitasi è stata calcolata usando il coefficiente di estinzione molare ϵ del NADPH, $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e assumendo la conversione di una molecola di citrato in una molecola di NADPH mediante l'isocitrico deidrogenasi. Assumendo inoltre che una unità di attività dell'aconitasi rappresenti la quantità che catalizza la conversione di 1 nmol di citrato in isocitrato al minuto, si è calcolata l'attività dell'enzima espressa come mU/mg di proteine mitocondriali.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA SUPEROSSIDO DISMUTASI

La superossido dismutasi è un enzima che catalizza la reazione:



che ha il compito di ripulire la cellula dai radicali liberi e mantenere bassa la concentrazione dei radicali ossigeno in diverse cellule e organelli [Imlay J A & Fridovich I, 1991].

Il dosaggio della superossido dismutasi si realizza spettrofotometricamente andando a monitorare la velocità di riduzione del citocromo c, utilizzando il sistema xantina-xantina ossidasi come produttore di $\text{O}_2^{\cdot -}$. La superossido dismutasi, competendo con i radicali $\text{O}_2^{\cdot -}$ che determinano la riduzione del citocromo c, provoca una diminuzione della velocità di riduzione del citocromo c.

Il dosaggio è stato effettuato spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 550 nm, utilizzando il metodo descritto da Flohè ed Ötting [Flohè L & Ötting F, 1984].

I mitocondri, diluiti 1:10 sono stati incubati per 10 minuti in una soluzione contenente KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0.1 mM e Triton 0.2%. Al termine dell'incubazione si è proceduto alla misura del campione, utilizzando un buffer costituito da KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0.1 mM, KCN 2 mM, xantina 0.1 mM, NaOH 0.1 mM, citocromo c 20 mM e 0.0033 U/ml di xantina ossidasi. È stata effettuata anche una misura della riduzione del citocromo c in un bianco, misura effettuata con tutti i reagenti tranne il campione.

Si è poi costruito una curva di calibrazione in cui il reciproco delle variazioni di assorbanza al minuto del citocromo c è riportato in funzione della concentrazione di proteine del campione e si è ottenuta una relazione di tipo lineare, dalla quale è possibile ricavare l'attività del campione, espressa come Unità/mg di proteine, sapendo che una

Unità di superossido dismutasi è definita come la quantità di enzima che inibisce del 50% la riduzione del citocromo c.

ANALISI STATISTICA

I dati sono le medie \pm ES di sei differenti ratti. Le analisi statistiche sono state compiute mediante l'uso del t-test.

Il confronto tra le cinetiche della conduttanza protonica basale e indotta è stato effettuato tramite l'applicazione della regressione non lineare. Valori di probabilità minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi. Tutte le analisi sono state effettuate usando il programma GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RISULTATI

DISEGNO SPERIMENTALE 1: RESTRIZIONE - RIALIMENTAZIONE

I dati sul peso, sulla quantità di proteine e lipidi corporei, nonché sulla spesa energetica netta dei ratti a restrizione calorica (ristretti) e dei controlli dello stesso peso (controlli) sono riportati nella *tabella 3* e nella *figura 7*. Al termine delle due settimane di restrizione calorica, durante le quali la crescita si arresta, nei ratti ristretti rispetto ai controlli, il peso corporeo così come le proteine, sono uguali; mentre le riserve lipidiche risultano essere significativamente ridotte.

Nella *tabella 4* sono riportati i dati sulla caratterizzazione metabolica dei ratti ottenuti dalla misura dei livelli plasmatici di glucosio e insulina. Tali risultati mostrano che i livelli plasmatici di glucosio sono significativamente più bassi nei ratti trattati rispetto ai ratti di controllo, mentre nessuna differenza è stata trovata per i livelli plasmatici di insulina. In questa stessa tabella è stato riportato anche l'indice HOMA, un indicatore del livello di resistenza all'insulina, che è significativamente più basso nei ratti ristretti rispetto ai ratti di controllo.

Nella *tabella 5* sono riportate le variazioni dell'attività della citrato sintasi, un marker enzimatico mitocondriale, valutata nell'omogenato e nelle due frazioni mitocondriali del muscolo scheletrico. L'attività della citrato sintasi espressa per g di tessuto è significativamente più bassa nei ratti ristretti rispetto ai controlli, sia nell'omogenato che nei mitocondri SS ed IMF isolati dal muscolo scheletrico. L'attività specifica della Citrato sintasi espressa per mg di proteine, invece, non risulta influenzata dal trattamento di restrizione. Questi risultati nel loro insieme indicano che la massa proteica mitocondriale, alla fine delle due settimane di restrizione calorica, risulta ridotta in entrambe le sub-popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico.

Tale risultato è confermato dai dati della resa proteica che mostrano una significativa riduzione, nei ratti ristretti rispetto ai controlli, della massa proteica sia negli SS che negli IMF.

Nella *figura 8* è riportato il recupero dell'attività della citrato sintasi. I risultati mostrano che il recupero dell'attività dell'enzima non è variato nei ratti ristretti rispetto ai ratti di controllo, dato questo che evidenzia, ancora una volta, che le differenze a carico della resa tra i due gruppi di animali sono dovute a variazioni della massa proteica e non a differenze nella sedimentazione dei mitocondri.

I risultati relativi alle misure della respirazione mitocondriale, in presenza di un substrato NAD dipendente quale il glutammato, un substrato FAD dipendente quale il succinato ed un substrato lipidico quale il palmitoil-CoA, sulle due popolazioni del muscolo scheletrico nei ratti a restrizione calorica e in quelli di controllo sono riportati in *tabella 6*. Lo Stato 3 dell'attività respiratoria dei mitocondri SS è significativamente più basso nei ratti a restrizione calorica rispetto ai controlli con il glutammato e il succinato, mentre non si osserva una variazione significativa per i mitocondri IMF.

Nessuna variazione significativa dello Stato 4 dell'attività respiratoria è stata trovata in entrambe le popolazioni mitocondriali dei ratti a restrizione calorica rispetto ai controlli.

Nella *figura 9* sono riportati i risultati della cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri di muscolo di ratti a restrizione calorica e dei controlli. I dati mostrano che, in seguito alla restrizione calorica, la cinetica della conduttanza protonica basale non subisce alcuna variazione significativa in entrambe le frazioni mitocondriali.

Nella *figura 10* è invece riportata la conduttanza protonica indotta dal palmitato come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni della respirazione. Nei ratti ristretti non si osserva alcuna variazione significativa per i

mitocondri SS rispetto ai controlli, mentre per gli IMF si osserva una conduttanza protonica indotta minore rispetto a quella dei ratti di controllo, in quanto ad ogni valore di consumo di ossigeno il potenziale di membrana rimane ad un valore più alto nei ratti trattati rispetto ai ratti di controllo.

In *figura 11* è riportata l'attività specifica dell'aconitasi e della superossido dismutasi (SOD) rispettivamente misurate come indice del danno ossidativo cellulare e delle difese antiossidanti. Per entrambe le frazioni mitocondriali non si osservano variazioni dell'attività specifica dell'aconitasi nei ratti ristretti rispetto ai ratti di controllo, mentre si osserva un incremento significativo dell'attività specifica della SOD per i mitocondri SS e IMF dei ratti ristretti rispetto ai controlli, che indica un aumento delle difese antiossidanti.

I risultati relativi alle misure del bilancio energetico e della composizione corporea nei ratti rialimentati e in quelli di controllo sono riportati nella *tabella 7* e nella *figura 12*. Dopo una settimana di rialimentazione, durante la quale i ratti rialimentati introducono la stessa quantità di cibo dei ratti di controllo, tra i due gruppi non si osservano differenze significative nel peso corporeo finale e nella componente proteica. Al contrario, il guadagno lipidico è significativamente più alto (+ 57%) nei ratti rialimentati rispetto ai controlli. Questo accumulo preferenziale di grasso corporeo nei ratti trattati, nonostante il loro introito calorico sia pari a quello dei controlli, è dovuto ad una significativa riduzione della loro spesa energetica e ad un significativo aumento della loro efficienza energetica.

Nella *tabella 8* sono riportati i dati sulla caratterizzazione metabolica dei ratti rialimentati ottenuta misurando le concentrazioni di insulina e glucosio. Le concentrazioni plasmatiche di glucosio, così come l'indice HOMA, sono

significativamente più alte nei ratti rialimentati rispetto ai controlli, mentre non si osservano variazioni nei livelli di insulina.

Nella *tabella 9* sono riportate le variazioni della attività specifica dell'enzima marker mitocondriale Citrato sintasi valutata nell'omogenato di muscolo e nelle due frazioni mitocondriali isolate dal muscolo scheletrico. L'attività dell'enzima espressa per grammo di tessuto è stata trovata significativamente più bassa sia nell'omogenato sia nei mitocondri SS isolati dal muscolo dei ratti rialimentati nei confronti dei rispettivi controlli, mentre resta invariata nel compartimento IMF. L'attività specifica della Citrato sintasi espressa per mg di proteine, invece, non risulta influenzata dalla rialimentazione. I risultati sono confermati dai dati della resa proteica che mostrano una sua significativa riduzione nei mitocondri SS dei ratti rialimentati messi a confronto con i rispettivi controlli.

Nella *figura 13* è riportato il recupero dell'attività della citrato sintasi. I risultati mostrano che, anche in questo disegno sperimentale, il recupero dell'attività dell'enzima non è influenzato dalla rialimentazione confermando i dati circa la variazione della massa proteica mitocondriale.

Nella *tabella 10* sono riportate le misure della capacità respiratoria sulle due popolazioni del muscolo scheletrico nei ratti rialimentati ed in quelli di controllo in presenza di tre substrati diversi: glutammato, succinato e palmitoilCoA. Si osserva un decremento dello stato 3 nei ratti sottoposti a rialimentazione rispetto ai controlli per quanto riguarda i mitocondri SS, con differenze significative soprattutto nelle misure fatte utilizzando come substrati il glutammato ed il palmitoilCoA. Invece, per quanto riguarda i mitocondri IMF, lo stato 3 tende ad essere più alto negli animali rialimentati

rispetto ai controlli, con significative differenze raggiunte quando si utilizza come substrato il succinato. Inoltre non si osserva nessuna variazione significativa dello stato 4, sia per i mitocondri SS che per quelli IMF, alla fine della rialimentazione.

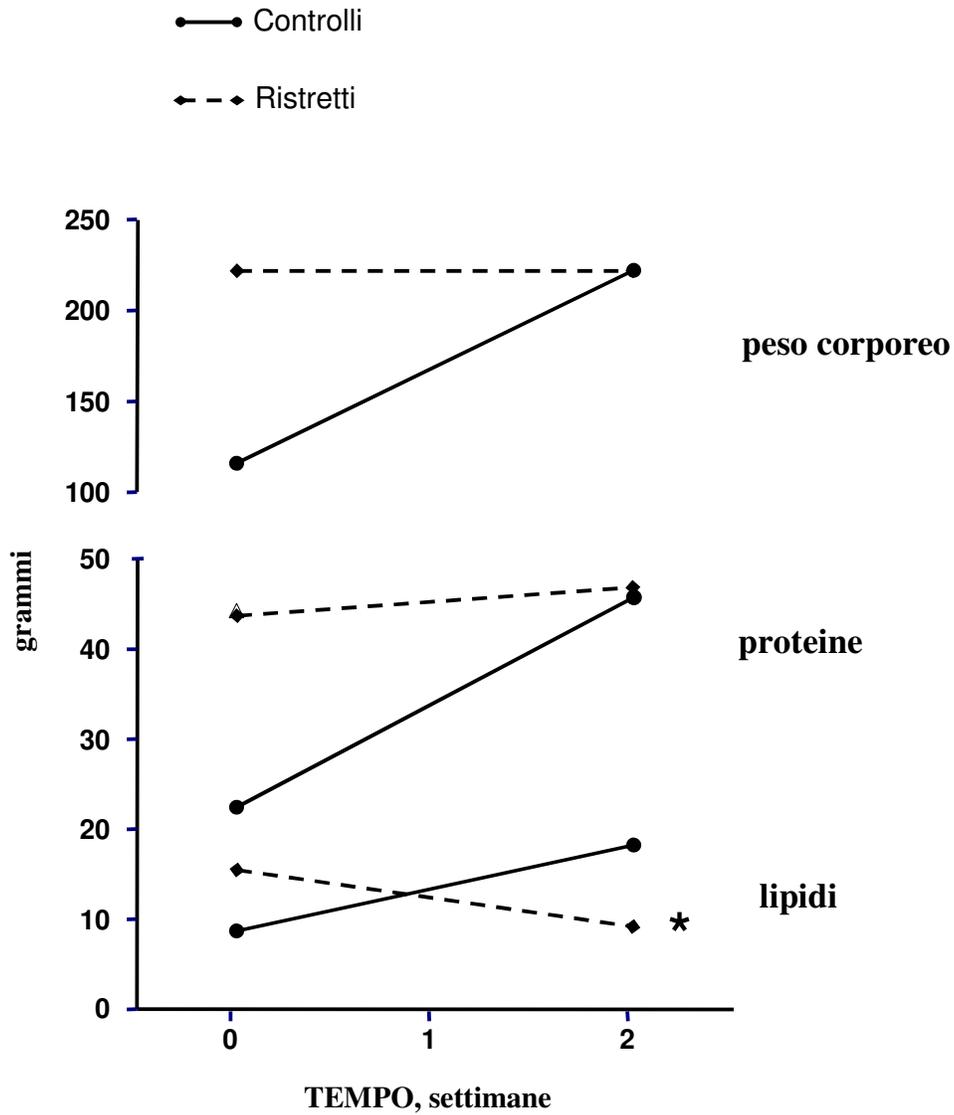
Nella *figura 14* sono riportati i risultati della cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri di muscolo di ratti rialimentati per una settimana e dei controlli. I dati mostrano che, in seguito ad una settimana di rialimentazione, non si osserva alcuna variazione significativa per i mitocondri SS rispetto ai controlli, mentre per gli IMF si osserva una conduttanza protonica basale maggiore rispetto a quella dei ratti di controllo.

Nella *figura 15* è invece riportata la conduttanza protonica indotta dal palmitato come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni della respirazione. Nei ratti rialimentati si osserva una conduttanza protonica indotta maggiore sia per i mitocondri SS che per quelli IMF, rispetto a quella dei ratti di controllo.

Infine in *figura 16* sono riportate l'attività specifica dell'aconitasi, espressa in mU/mg di proteine, e della superossido dismutasi espressa in U/mg di proteine. Dopo una settimana di rialimentazione l'attività specifica dell'aconitasi è significativamente più bassa in entrambe le frazioni mitocondriali dei ratti rialimentati rispetto ai controlli. Mentre si osserva un incremento significativo dell'attività specifica della superossido dismutasi per i mitocondri SS dei ratti rialimentati rispetto ai controlli, indicando un aumento dei danni ossidativi nonostante l'aumento delle difese antiossidanti.

Figura 7

Variazioni del peso corporeo, delle proteine e dei lipidi corporei durante una settimana di restrizione



I valori sono le medie \pm ES di sei differenti ratti. * $P < 0.05$ rispetto ai controlli

Tabella 3

Bilancio energetico e composizione corporea in ratti ristretti e di controllo.

	Controlli	Ristretti
Peso corporeo (g)	22.2±2.8	22.2±2.1
Contenuto lipidico (g)	18.2±1.3	8.7±1.1*
Contenuto proteico (g)	45.7±1.8	47.0±1.2
Spesa energetica netta (kJ)	2723±136	1817±79*

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti. *P<0.05 rispetto ai controlli.

I valori della spesa energetica netta sono riferiti all'intero periodo sperimentale.

Tabella 4

Livelli plasmatici di insulina e glucosio in ratti ristretti e di controllo

	Controlli	Ristretti
Insulina (ng/mL)	1.89±0.47	1.78±0.95
Glucosio (mg/dL)	228±12	174±15*
Indice HOMA	24.8±1.2	17.6±0.9*

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti. * P<0.05 rispetto ai controlli.

Indice HOMA = [Glucosio (mg/dL) x Insulina (mU/L)]/405

Tabella 5

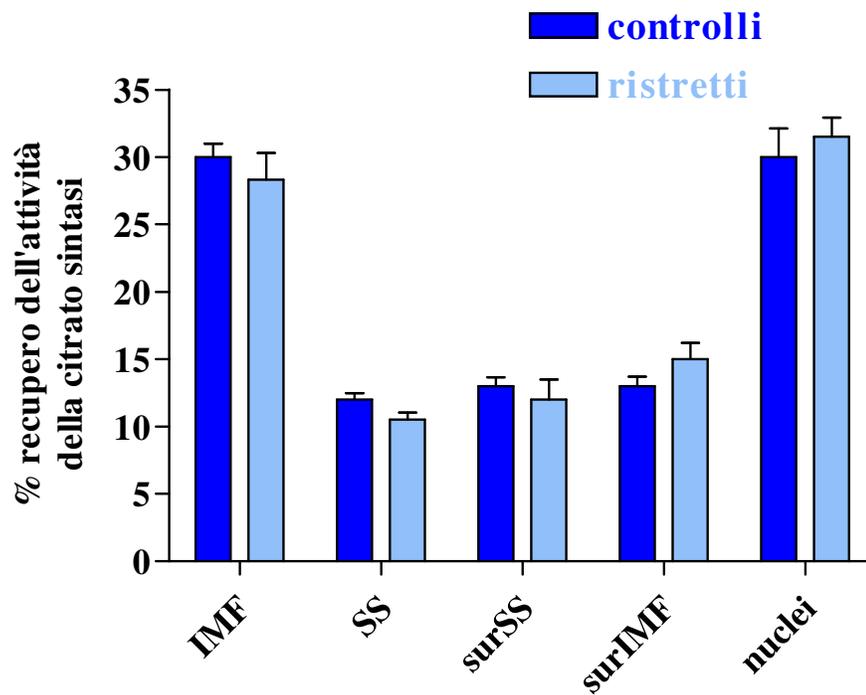
Attività della citrato sintasi e resa proteica nei mitocondri intermiofibrillari e subsarcolemmatici del muscolo scheletrico in ratti ristretti e di controllo

	Controlli	Ristretti
Attività citrato sintasi μmol/(min x g tessuto)		
Omogenato	20±0.65	16.7±0.73*
Intermiofibrillari	6.46±0.50	4.77±0.46*
Subsarcolemmatici	2.39±0.30	1.06±0.16*
Attività specifica citrato sintasi μmol/(min x mg proteine)		
Intermiofibrillari	3.20±0.10	3.50±0.10
Subsarcolemmatici	4.20±0.10	3.80±0.20
Resa proteica mg/g tessuto		
Intermiofibrillari	1.99±0.19	1.32±0.18*
Subsarcolemmatici	0.57±0.03	0.28±0.04*

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti. * P<0.05 rispetto ai controlli.

Figura 8

Percentuale di recupero dell'attività della citrato sintasi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti ristretti e dei controlli



I valori sono le medie \pm ES di sei differenti esperimenti.

* $P < 0,05$ rispetto ai controlli.

Tabella 6

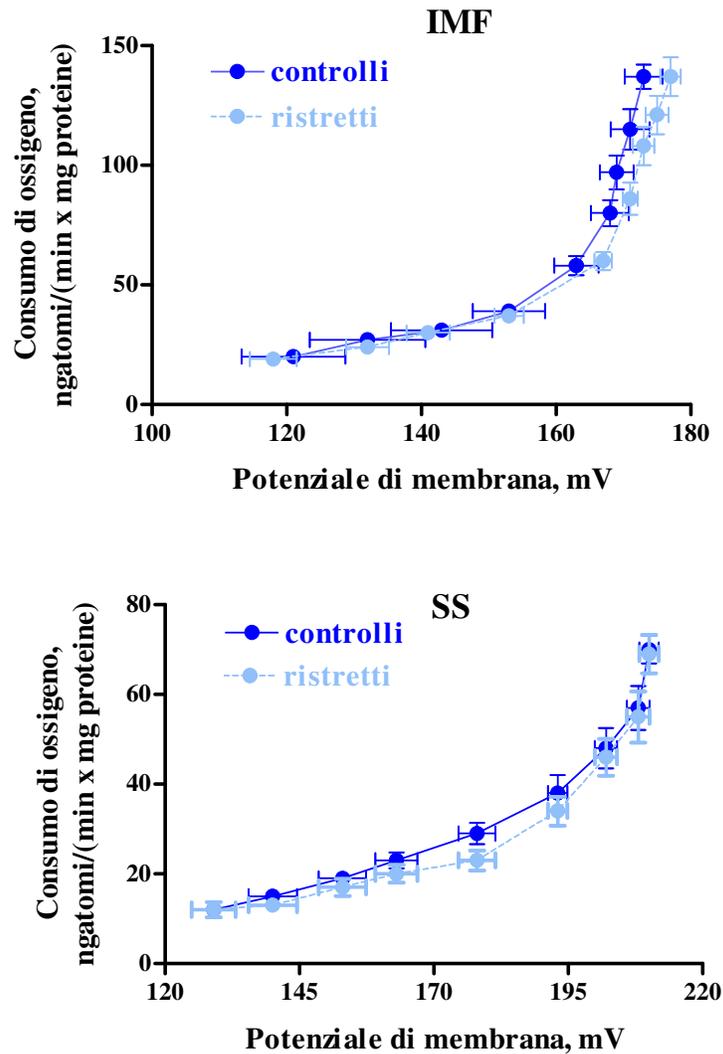
Stato 3 e 4 della respirazione dei mitocondri intermiofibrillari e subsarcolemmatici in ratti ristretti e di controllo

	<i>Intermiofibrillari (IMF)</i>		<i>Subsarcolemmatici (SS)</i>	
	<i>Controlli</i>	<i>Ristretti</i>	<i>Controlli</i>	<i>Ristretti</i>
Glutammato				
State 3	750±50	746±30	341±20	256±21*
State 4	47.4±2.6	46±1.3	33.8±3.2	36.8±2.3
RCR	16±1.1	16.2±0.6	10.3±0.7	9.6±0.1
Succinato				
State 3	791±29	757±16	388±9	338±13*
Stato 4	181±6	169±6	76.1±2.1	77.3±2.3
RCR	4.4±0.1	4.5±0.1	5.1±0.2	4.4±0.1*
PalmitoilCoA				
State 3	339±11	358±22	141±4	132±7
State 4	33.5±0.6	36.6±1.2	29.8±1.4	25.4±2.1
RCR	10.1±0.3	9.8±0.6	4.7±0.2	5.3±0.7

I valori sono le medie ± di sei differenti esperimenti e sono espressi come ngatomi di ossigeno/(min x mg di proteine). *P<0.05 rispetto ai controlli.

Figura 9

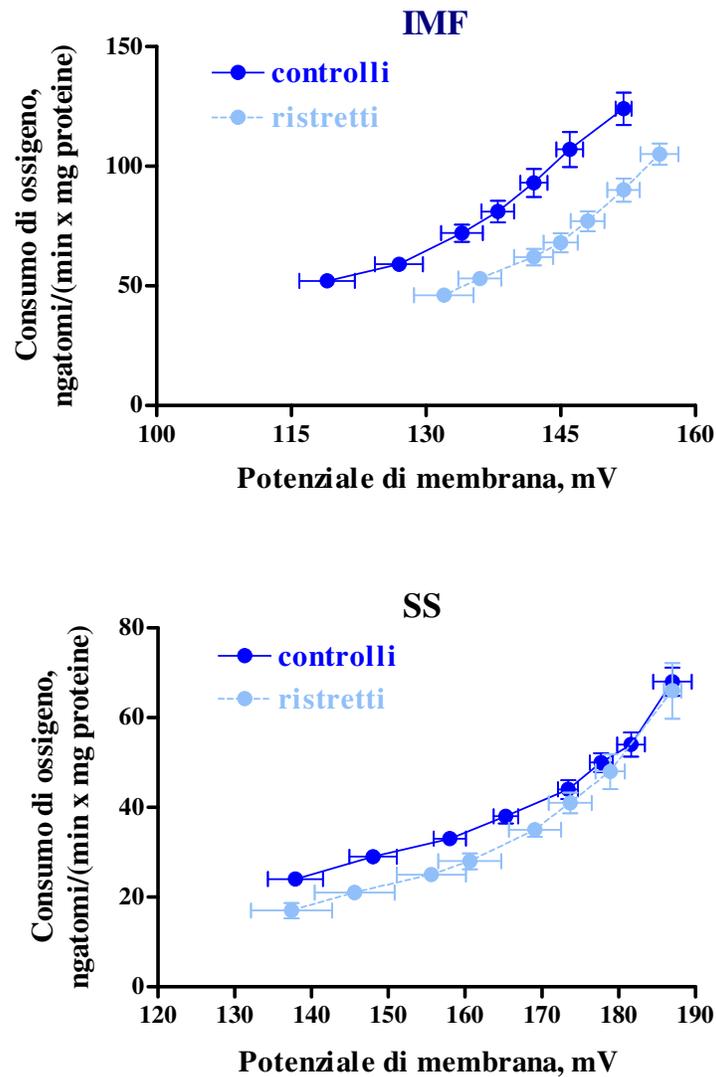
Cinetica della conduttanza protonica basale dei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti ristretti e di controllo.



Ogni punto rappresenta la media \pm ES di sei differenti esperimenti.

Figura 10

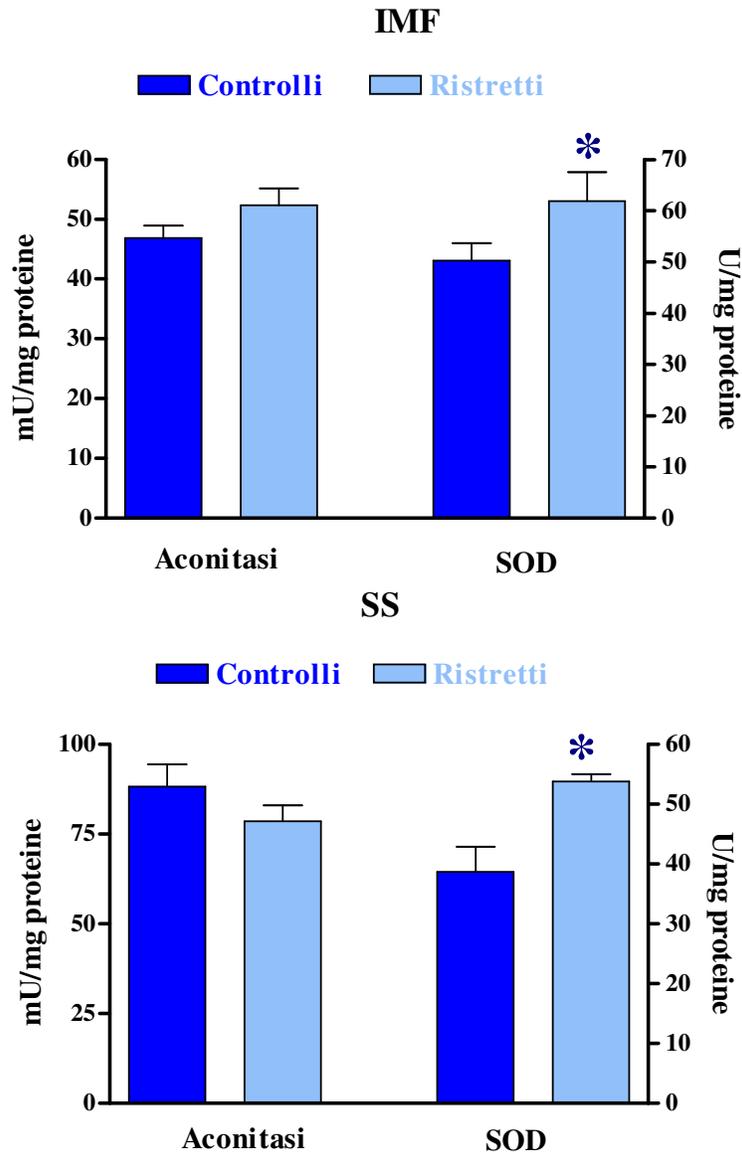
Cinetica della conduttanza protonica basale dei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti ristretti e di controllo.



Ogni punto rappresenta la media \pm ES di sei differenti esperimenti.

Figura 11

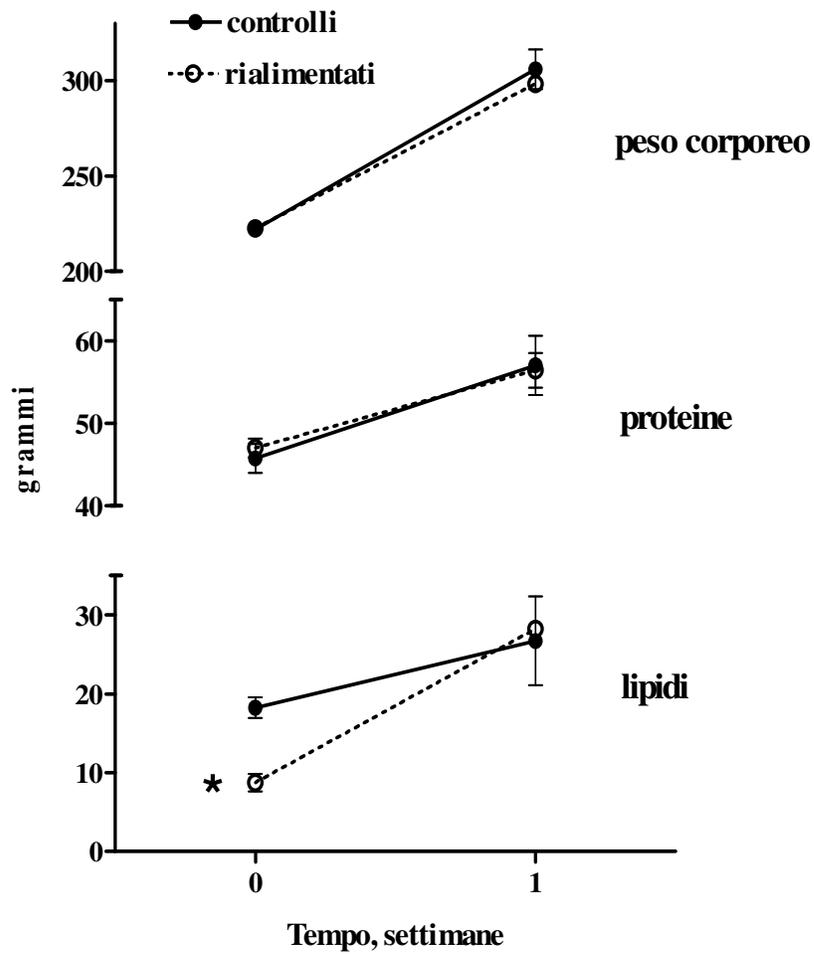
Attività specifica dell'aconitasi e della superossido dismutasi (SOD) nei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcollematici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti ristretti e di controllo



I valori sono le medie \pm ES di sei differenti esperimenti. *P<0.05 rispetto ai controlli.

Figura 12

Variazioni del peso corporeo, delle proteine e dei lipidi corporei durante una settimana di rialimentazione



I valori sono le medie \pm ES di sei differenti ratti. * $P < 0.05$ rispetto ai controlli.

Tabella 7

Bilancio energetico e composizione corporea in ratti rialimentati e di controllo.

	Controlli	Rialimentati
Energia metabolizzabile introdotta (kJ)	2404±51	2288±47
Guadagno energetico (kJ)	686±31	945±40*
Guadagno di peso (g)	64±4	68±6
Guadagno lipidico (g)	11.5±0.7	18.0±0.7*
Guadagno proteico (g)	11.2±2.8	11.0±1.2
Spesa energetica (kJ)	1718±86	1343±78*
Efficienza lorda (%)	0.29±0.03	0.41±0.03*

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti. *P<0,05 rispetto ai controlli.

I valori della spesa energetica netta sono riferiti all'intero periodo sperimentale.

Tabella 8

Livelli plasmatici di glucosio e insulina in ratti rialimentati e di controllo

	Controlli	Rialimentati
Insulina (ng/mL)	2.48±0.23	2.55±0.21
Glucosio (mg/dL)	178±6	202±6*
Indice HOMA	25.3±1.3	29.6±1.1*

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti. * P<0.05 rispetto ai controlli.

Indice HOMA = [Glucosio (mg/dL) x Insulina (mU/L)]/405

Tabella 9

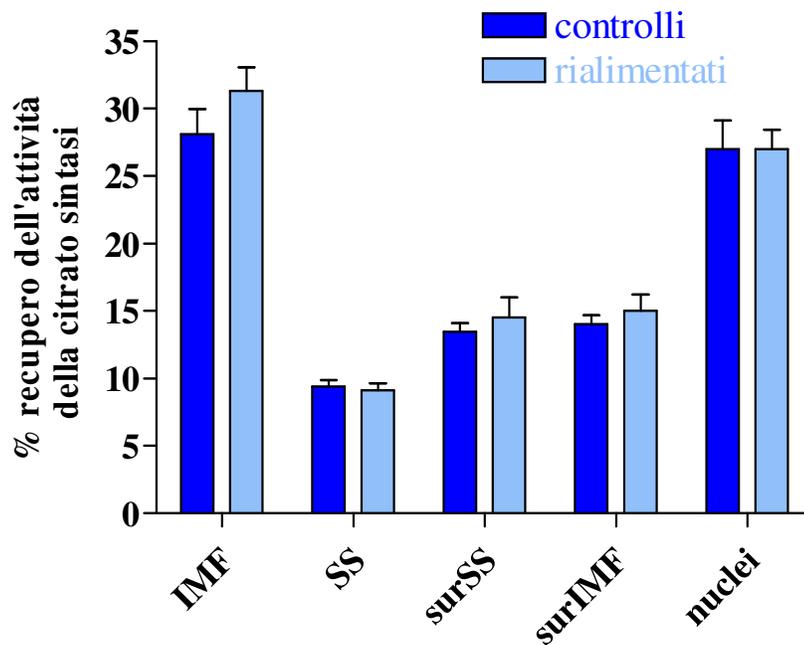
Attività della citrato sintasi e resa proteica nei mitocondri intermiofibrillari e subsarcolemmatici del muscolo scheletrico in ratti rialimentati e di controllo

	Controlli	Rialimentati
Attività citrato sintasi µmol/(min x g tessuto)		
Omogenato	16.2±0.56	13.1±0.63*
Intermiofibrillari	4.54±0.32	4.11±0.37
Subsarcolemmatici	1.52±0.12	1.20±0.08*
Attività specifica citrato sintasi µmol/(min x mg proteine)		
Intermiofibrillari	2.95±0.08	3.04±0.10
Subsarcolemmatici	3.19±0.06	3.34±0.26
Resa proteica mg/g tessuto		
Intermiofibrillari	1.56±0.12	1.35±0.11
Subsarcolemmatici	0.49±0.05	0.34±0.02*

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti. * P<0.05 rispetto ai controlli.

Figura 13

Percentuale di recupero dell'attività della citrato sintasi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati e di controllo



I valori sono le medie \pm ES di sei differenti esperimenti.

* $P < 0,05$ rispetto ai controlli.

Tabella 10

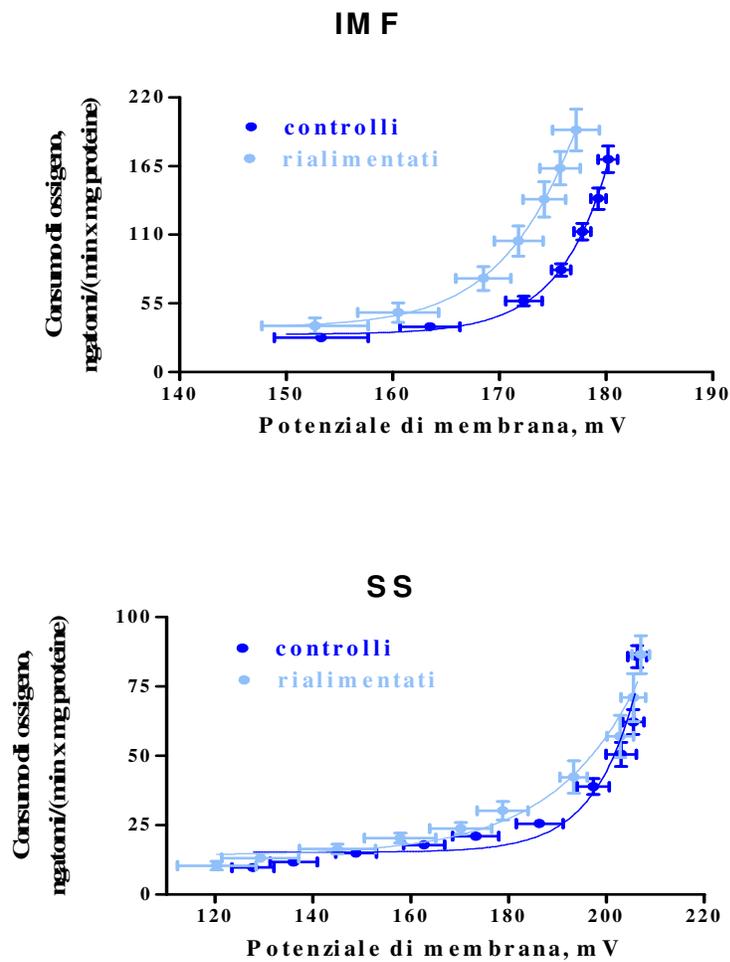
Stato 3 e 4 della respirazione dei mitocondri intermiofibrillari e subsarcolemmatici in ratti rialimentati e di controllo

	<i>Intermiofibrillari (IMF)</i>		Subsarcolemmatici (SS)	
	<i>Controlli</i>	<i>Rialimentati</i>	<i>Controlli</i>	<i>Rialimentati</i>
Glutammato				
State 3	877±19	883±45	357±21	263±21*
State 4	49.4±3.0	54.8±1.4	32.5±2.0	36.1±1.4
RCR	18.1±1.2	16.1±1.4	11.0±0.8	7.3±0.3*
Succinato				
State 3	857±22	982±22*	418±16	406±25
Stato 4	177±7	188±2	86.8±3.4	82.7±4.4
RCR	4.8±0.2	5.2±0.1	4.8±0.1	4.9±0.2
PalmitoilCoA				
State 3	359±25	380±21	154±5	125±6*
State 4	39.2±1.8	42.3±3.0	26.5±0.9	28.6±3.2
RCR	9.1±0.3	9.0±0.6	5.8±0.4	4.6±0.2

I valori sono le medie ± di sei differenti esperimenti e sono espressi come ngatomi di ossigeno/(min x mg di proteine). *P<0.05 rispetto ai controlli.

Figura 14

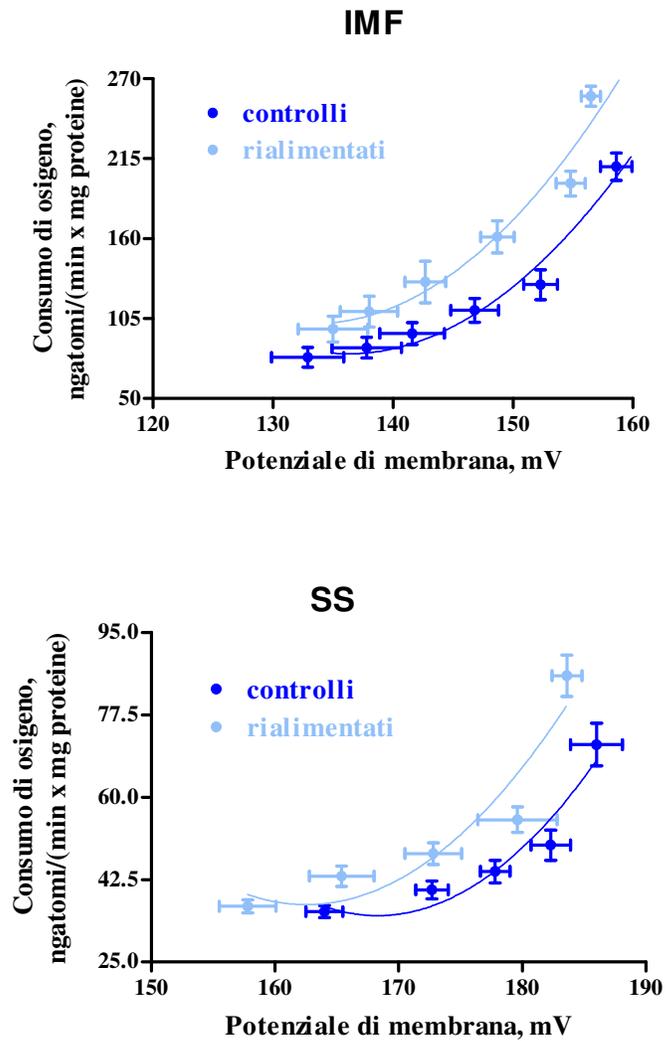
Cinetica della conduttanza protonica basale dei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati e di controllo.



Ogni punto rappresenta la media \pm ES di sei differenti esperimenti.

Figura 15

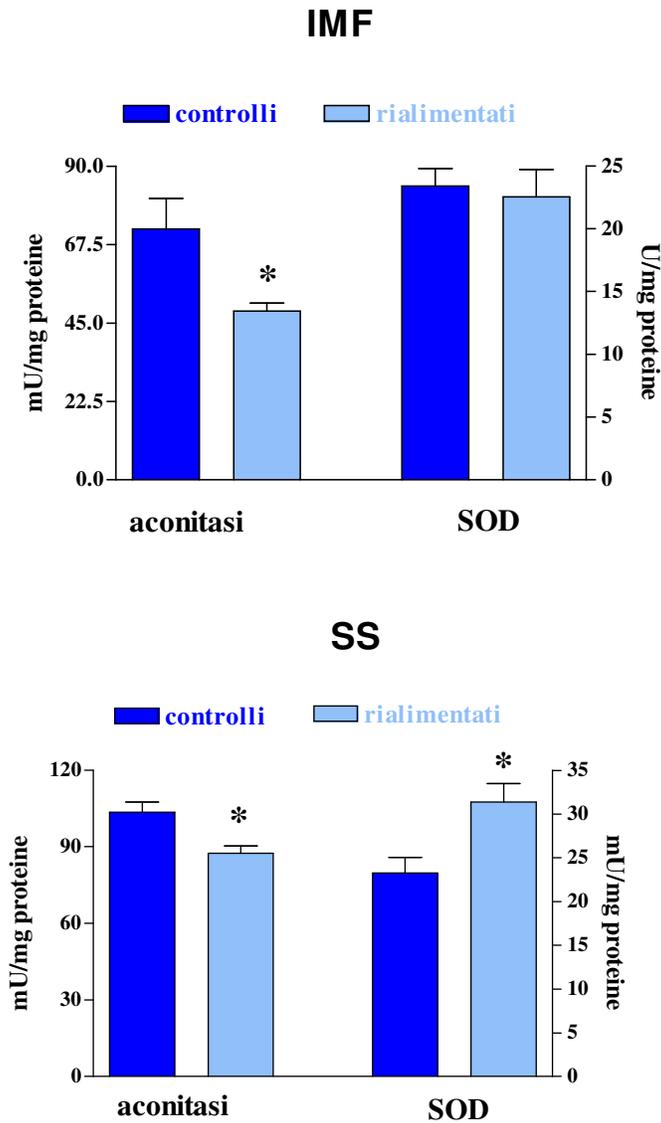
Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri intermiofibrillari e subsarcolemmatici di ratti rialimentati e di controllo



Ogni punto rappresenta la media \pm ES di sei differenti esperimenti.

Figura 16

Attività specifica dell'aconitasi e della superossido dismutasi (SOD) nei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcollematici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati e di controllo



I valori sono le medie \pm ES di sei differenti esperimenti. *P<0.05 rispetto ai controlli.

DISEGNO SPERIMENTALE 2: RESTRIZIONE - RIALIMENTAZIONE CON DIETA IPOLIPIDICA E IPERLIPIDICA

I risultati relativi alle misure del bilancio energetico e della composizione corporea nei ratti rialimentati e in quelli di controllo sono riportati nella *tabella 11*. Dopo una settimana di rialimentazione, durante la quale i ratti introducono quantità isoenergetiche di due distinte diete, tra i gruppi non si osservano differenze significative nel guadagno di peso e di proteine. Al contrario nonostante introducano la stessa quantità di energia metabolizzabile, i ratti rialimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi guadagnano sostanzialmente più grasso di quelli rialimentati con una dieta povera di grassi. Ciò è dovuto al fatto che una rialimentazione con una dieta iperlipidica dà luogo ad un esasperato aumento dell'efficienza metabolica, cioè ad una più bassa spesa energetica rispetto alla rialimentazione con la dieta isoenergetica ipolipidica.

Nella *tabella 12* sono riportati i dati sulla caratterizzazione metabolica dei ratti ottenuta misurando le concentrazioni plasmatiche di glucosio e insulina. Questi valori così come l'indice HOMA, non sembrano influenzati dalle due diverse diete fornite agli animali.

Nella *tabella 13* sono mostrate le variazioni della attività dell'enzima marker mitocondriale Citrato Sintasi valutate nell'omogenato di muscolo e nelle due frazioni mitocondriali isolate dal muscolo scheletrico. Dopo una settimana di rialimentazione l'attività dell'enzima espressa per grammo di tessuto è stata trovata invariata sia nell'omogenato che nei mitocondri SS e IMF di entrambi i gruppi di ratti. Anche l'attività specifica dell'enzima espressa per mg di proteine, non risulta influenzata dai trattamenti di rialimentazione ipolipidica e iperlipidica così come la resa.

Nelle *tabella 14* sono mostrate le misure della capacità respiratoria mitocondriale effettuate sulle due popolazioni del muscolo scheletrico nei ratti rialimentati con dieta

ipolipidica e iperlipidica in presenza di tre substrati diversi: glutammato, succinato e palmitoilCoA. Non si osserva nessuna variazione significativa della capacità respiratoria mitocondriale fra i gruppi di ratti in entrambe le popolazioni mitocondriali.

Nella *figura 17* sono riportati i risultati della cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri di muscolo di ratti rialimentati con le due differenti diete. I dati mostrano che non si osserva alcuna variazione significativa della conduttanza basale per i mitocondri delle due popolazioni del muscolo scheletrico..

Nella *figura 18* è invece riportata la conduttanza protonica indotta dal palmitato. Non si osserva, anche in questo caso, alcuna variazione significativa nell'efficienza mitocondriale tra i gruppi di ratti in entrambi i compartimenti mitocondriali.

Infine in *figura 19* sono riportate l'attività specifica dell'aconitasi e della superossido dismutasi. L'attività specifica dell'aconitasi non risulta influenzata dalle differenti diete in entrambe le frazioni mitocondriali, mentre si osserva una riduzione significativa dell'attività specifica della superossido dismutasi dei ratti rialimentati con dieta iperlipidica rispetto ai rialimentati con dieta ipolipidica sia nei mitocondri IMF che nei SS, indicando una abbassamento nelle difese antiossidanti.

Tabella 11

Bilancio energetico e composizione corporea nei ratti rialimentati con dieta ipolipidica e iperlipidica.

	Dieta ipolipidica	Dieta iperlipidica
Energia metabolizzabile introdotta (kJ)	2964±38	2883±2
Guadagno energetico (kJ)	912±34	1282±56*
Guadagno di peso (g)	56±4	66±6
Guadagno lipidico (g)	18.5±0.7	28.8±1.7*
Guadagno proteico (g)	7.7±2.0	8.5±1.8
Spesa energetica (kJ)	2052±43	1601±44*
Efficienza lorda (%)	0.31±0.01	0.44±0.02*

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti. *P<0,05 rispetto a dieta ipolipidica.

I valori della spesa energetica netta sono riferiti all'intero periodo sperimentale.

Tabella 12

I livelli plasmatici di glucosio e insulina di ratti rialimentati con dieta ipolipidica e iperlipidica

	Dieta ipolipidica	Dieta iperlipidica
Insulina (ng/mL)	2.94±0.50	2.67±0.023
Glucosio (mg/dL)	229±13	231±11
Indice HOMA	36.3±1.5	35.1±1.3

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti. * P<0.05 rispetto a dieta ipolipidica.

Indice HOMA = [Glucosio (mg/dL) x Insulina (mU/L)]/405

Tabella 13

Attività della citrato sintasi e resa proteica nei mitocondri Intermiofibrillari e Subsarcolemmatici del muscolo scheletrico di ratti rialimentati con dieta ipolipidica e iperlipidica

	Dieta ipolipidica	Dieta iperlipidica
Attività citrato sintasi		
μmol/(min x g tessuto)		
Omogenato	15.3±0.032	16.5±0.93
Intermiofibrillari	4.34±0.26	4.91±0.19
Subsarcolemmatici	1.21±0.06	1.16±0.07
Attività specifica citrato sintasi		
μmol/(min x mg proteine)		
Intermiofibrillari	3.0±0.11	3.0±0.14
Subsarcolemmatici	2.7±0.06	2.8±0.10
Resa proteica		
mg/g tessuto		
Intermiofibrillari	1.40±0.06	1.50±0.07
Subsarcolemmatici	0.35±0.02	0.38±0.04

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti.

Tabella 14

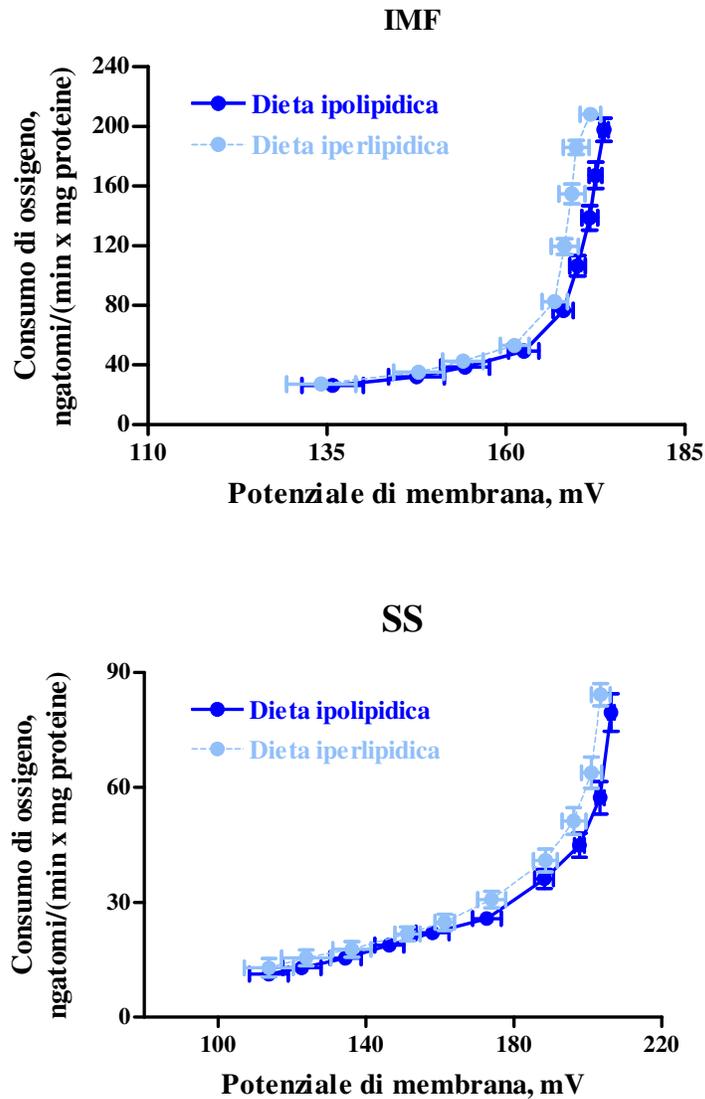
Stato 3 e 4 della respirazione dei mitocondri subsarcolemmatici di ratti rialimentati con ipolipidica e iperlipidica

	<i>Intermiofibrillari (IMF)</i>		Subsarcolemmatici (SS)	
	<i>Controlli</i>	<i>Dieta ipolipidica</i>	<i>Controlli</i>	<i>Dieta iperlipidica</i>
Glutammato				
State 3	1007±27	1006±29	379±15	411±24
State 4	64±1.3	63.2±1.8	33.3±1.3	35±2.8
RCR	15.8±0.7	16±0.8	11.4±0.4	11.7±0.4
Succinato				
State 3	1095±25	1104±3	385±11	409±10
Stato 4	223±16	228±4	82.5±2.0	88.3±1.1
RCR	4.9±0.2	4.8±0.3	4.7±0.1	4.6±0.1
PalmitoilCoA				
State 3	488±15	507±18	171±2	192±4
State 4	53.2±1.4	51.5±1.4	29.8±1.0	30.8±1.1
RCR	9.2±0.3	9.9±0.3	5.8±0.1	6.3±0.3

I valori sono le medie ± ES di sei differenti ratti. * P<0.05 rispetto a dieta ipolipidica.

Figura 15

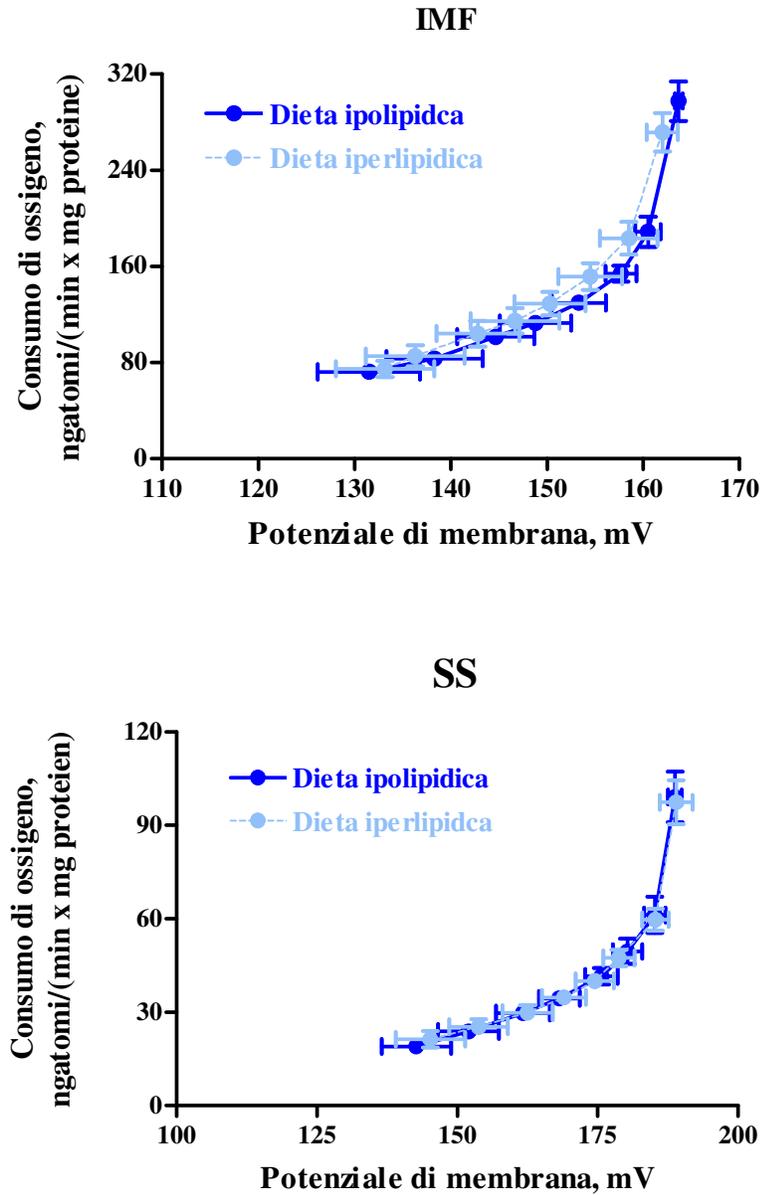
Cinetica della conduttanza protonica basale dei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati con dieta ipolipidica e iperlipidica



Ogni punto rappresenta la media \pm ES di sei differenti esperimenti

Figura 16

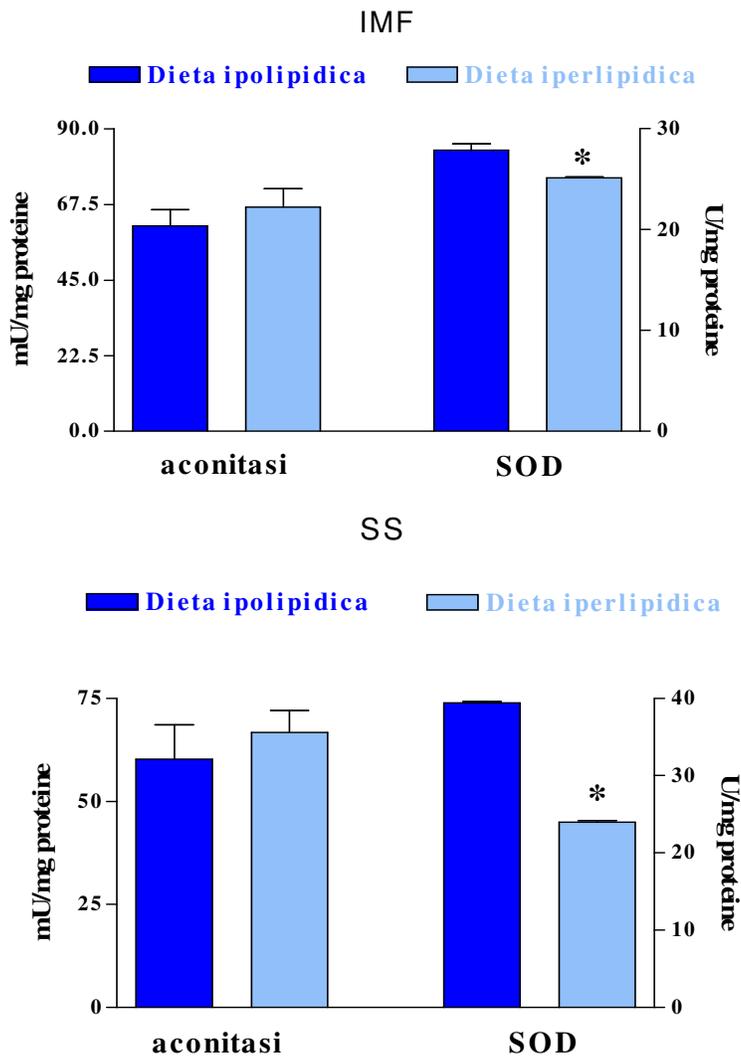
Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati con dieta ipolipidica e iperlipidica



Ogni punto rappresenta la media \pm ES di sei differenti esperimenti

Figura 17

Attività specifica dell'aconitasi e della superossido dismutasi (SOD) nei mitocondri intermiofibrillari e subsarcollematici isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati con dieta ipolipidica e iperlipidica



I valori sono le medie \pm ES di sei differenti ratti. * $P < 0.05$ rispetto ai rialimentati LF.

DISCUSSIONE

RESTRIZIONE - RIALIMENTAZIONE

Un periodo di restrizione dietetica può simulare una delle frequenti diete ipocaloriche a cui molte persone si sottopongono al giorno d'oggi in maniera saltuaria, causando quello che viene definito "effetto yo-yo" dell'andamento del peso corporeo. In queste condizioni fisiologiche, avvengono delle effettive alterazioni a carico dell'organismo, che rendono possibile la compensazione di un ridotto apporto energetico consentendo in tal modo la sopravvivenza.

Una prova diretta dell'esistenza e del ruolo funzionale di un controllo adiposo specifico della termogenesi durante la rialimentazione successiva alla restrizione può essere ottenuta dal modello sperimentale utilizzato in questa tesi, che è stato disegnato per rendere chiara l'interpretazione dei dati sulla spesa energetica. In particolare, nell'approccio sperimentale da me utilizzato, i cambiamenti della spesa energetica e dei compartimenti contenenti l'energia principale del corpo (grasso e proteine), durante il recupero di peso corporeo che fa seguito ad un periodo di restrizione calorica, sono stati esaminati nella particolare condizione in cui il gruppo di ratti rialimentato introduce la stessa quantità di cibo del gruppo di controllo avente un peso simile. Tra i due gruppi non si osservano differenze significative nel guadagno di peso corporeo e nel guadagno proteico. Al contrario il guadagno lipidico risulta significativamente aumentato nei ratti rialimentati rispetto ai controlli (tabella 7). La spiegazione più plausibile a tale risultato risiede nel fatto che, nonostante i due gruppi abbiano introdotto la stessa quantità di cibo, la spesa energetica dei ratti rialimentati viene mantenuta significativamente più bassa rispetto ai controlli. In particolare, nelle condizioni di questo disegno sperimentale, la ridotta spesa energetica osservata negli animali rialimentati rappresenta

essenzialmente l'energia risparmiata come risultato della soppressione sostenuta della termogenesi. Il fatto che questo fenomeno di conservazione dell'energia sia interamente finalizzato al ripristino delle riserve lipidiche, come mostrato dall'elevata velocità di accumulo di grasso, confermerebbe l'ipotesi dell'esistenza di un controllo della termogenesi adiposo-specifico, il cui ruolo funzionale durante la fase di recupero del peso sia proprio quello di ripristinare rapidamente le riserve lipidiche corporee.

Dato che un ruolo del muscolo scheletrico nella riduzione della termogenesi adiposo-specifica è stato già precedentemente postulato, è apparso interessante condurre un'analisi sia dell'efficienza sia di altri parametri mitocondriali in tale tessuto, considerato che essi influenzano profondamente l'omeostasi metabolica cellulare.

Infatti, visto che circa il 90 % dell'energia cellulare è prodotta durante la fosforilazione ossidativa, anche i cambiamenti nella massa proteica mitocondriale (nel numero, dimensione o entrambi) o nella capacità ossidativa possono esercitare profondi effetti sull'efficienza del metabolismo cellulare.

La massa proteica mitocondriale è stata determinata mediante un metodo indiretto attraverso due approcci: con il primo approccio viene misurata l'attività di un enzima marker mitocondriale: la citrato sintasi (CS), nell'omogenato del muscolo scheletrico e nelle sue due sub-popolazioni mitocondriali i subsarcolemmatici e gli intermiofibrillari.

Con il secondo approccio si valuta la resa proteica mitocondriale espressa come mg di proteine mitocondriale per g di tessuto. Indipendentemente dall'approccio utilizzato i dati mostrano che al termine della restrizione la massa proteica mitocondriale dei ratti trattati risulta significativamente ridotta in entrambe le sub-popolazioni mitocondriali e che questa riduzione è più pronunciata nei mitocondri SS piuttosto che in quelli IMF (-56% contro -26%). Questi differenti cambiamenti tra le due popolazioni mitocondriali

in risposta alla restrizione calorica sono ancora più marcati dopo una settimana di rialimentazione, quando la massa proteica rimane significativamente più bassa nei ratti trattati rispetto ai controlli solo nei mitocondri SS (tabella 9).

La specificità dei cambiamenti nel compartimento SS, soprattutto durante la rialimentazione, è evidenziata anche dall'analisi della capacità respiratoria la quale mostra una selettiva riduzione della capacità ossidativa mitocondriale in questa popolazione usando Glutammato e PalmitoilCoa come substrati. Analizzati insieme i miei risultati indicano, quindi, che solo nei mitocondri subsarcolemmatici vi è una continuità nella diminuzione della massa proteica e della capacità ossidativa mitocondriale tra la restrizione calorica e la successiva rialimentazione. Tali risultati mostrano quindi che la rialimentazione influenza in maniera differenziale le due subpopolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico, in accordo con il fatto che esse svolgono differenti ruoli metabolici all'interno della cellula. Inoltre la persistente riduzione dell'energetica nei mitocondri SS durante la rialimentazione potrebbe rappresentare uno dei meccanismi con i quali la soppressa termogenesi può condurre alla resistenza all'insulina durante il recupero di grasso. Il fatto che dopo una settimana di rialimentazione, l'indice HOMA (indicatore di resistenza all'insulina), ma non il grasso corporeo, risulta essere più alto nei ratti rialimentati rispetto ai controlli, suggerisce che lo stato di insulino resistenza durante la rialimentazione precede lo sviluppo di un eccesso di adiposità. Usando un simile modello animale altri studi hanno mostrato che dopo una settimana di rialimentazione, nel momento in cui il grasso corporeo e i livelli di acidi grassi non esterificati erano invariati tra i due gruppi di ratti, gli animali rialimentati presentavano, dopo un carico di glucosio, livelli plasmatici di insulina significativamente più alti rispetto ai controlli [Crecenzo R et al, 2003].

In questo contesto le alterazioni quantitative e qualitative a carico dei mitocondri SS durante la rialimentazione potrebbero avere un importante ruolo nella patogenesi della resistenza all'insulina durante il recupero di grasso, poiché questa popolazione mitocondriale sembra fornire l'energia ai processi che avvengono a livello della membrana cellulare, come la traduzione del segnale, lo scambio ionico, il trasporto dei substrati e l'attivazione dei substrati [Hood D, 2001], funzioni rilevanti per l'azione dell'insulina; mentre i mitocondri IMF supportano direttamente la contrazione muscolare. In realtà, un ruolo per la ridotta attività dei mitocondri SS nella patogenesi della resistenza all'insulina del muscolo scheletrico, nell'obesità e nel diabete di tipo 2 è stata recentemente avanzata sulle basi di evidenze che suggeriscono meno mitocondri SS e una più bassa attività della catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri SS del muscolo scheletrico nei pazienti obesi o diabetici rispetto ai muscoli scheletrici dei volontari magri non diabetici [Ritov VB et al, 2005].

A causa, quindi, della potenziale importanza dei mitocondri SS per il supporto bioenergetico del segnale dell'insulina e il trasporto del glucosio mediato dall'insulina nel muscolo scheletrico, sorge la possibilità che la diminuzione sia della massa proteica mitocondriale sia dell'attività ossidativa nei mitocondri SS durante la rialimentazione, può giocare un ruolo nel meccanismo con cui la soppressa termogenesi nel muscolo scheletrico porta alla resistenza all'insulina durante il recupero di grasso

Nelle mie valutazioni sui cambiamenti nello stato funzionale dei mitocondri che possono contribuire ad una elevata efficienza di recupero di grasso ho anche misurato la conduttanza protonica basale così come la conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi.

I risultati ottenuti mostrano nei ratti ristretti una diminuzione della conduttanza protonica indotta nei mitocondri IMF.

Inoltre dopo una settimana di rialimentazione per i mitocondri IMF si osserva una conduttanza protonica basale maggiore rispetto a quella dei ratti di controllo (figura 14), mentre la conduttanza protonica indotta nei ratti rialimentati è maggiore sia per i mitocondri SS che per quelli IMF rispetto a quella dei ratti di controllo (figura 15). I risultati non sono in accordo con un ruolo per la conduttanza protonica nei meccanismi con i quali la termogenesi è soppressa durante la rialimentazione, infatti, le due conduttanze non sono diminuite come mi sarei aspettata, ma aumentate in entrambe le popolazioni mitocondriali isolate dai ratti trattati.

I dati ottenuti sulla conduttanza protonica sono però da collegare al ruolo della conduttanza protonica nel controllo dei ROS (specie reattive dell'ossigeno). Poiché la produzione dei ROS è bassa quando il gradiente protonico è ridotto (stato 3), è stato ipotizzato che un leggero disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa durante lo Stato 4 della respirazione impedirebbe l'accumulo dei ROS all'interno dei mitocondri [Miwa S et al, 2003]. Quindi l'elevata conduttanza protonica basale e quella palmitato indotta nei mitocondri muscolari SS e IMF durante la rialimentazione possono rappresentare un meccanismo di difesa contro l'aumentata produzione dei ROS specialmente quando il turnover energetico nel muscolo scheletrico è basso e la respirazione mitocondriale opera vicino alle condizioni dello Stato 4.

Il fatto che la produzione mitocondriale dei ROS è aumentata nel muscolo scheletrico durante la rialimentazione trova riscontro nell'osservazione che sia i mitocondri SS che IMF di animali rialimentati mostrano una più bassa attività dell'aconitasi (figura 15) un enzima, questo, sensibile al danno ossidativo. Inoltre il compartimento mitocondriale SS

mostra anche un aumento dell'attività della superossido dismutasi (figura 15) indicando in questa subpopolazione un aumento delle difese antiossidanti.

.Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile affermare che mentre la restrizione calorica è uno stato fisiologico di forte difesa antiossidante nei mitocondri del muscolo scheletrico, poiché si osserva un aumento dell'attività della SOD e nessuna variazione dell'attività dell'aconitasi, la rialimentazione sembra essere uno stato fisiologico in cui si verifica, oltre che un recupero di grasso, un aumento della produzione dei ROS. Ciò è dimostrato dalla diminuzione dell'attività dell'aconitasi, nonostante l'aumento delle difese antiossidanti. In definitiva, l'integrazione dei dati di questa tesi sottolineano un potenziale collegamento esistente tra diminuzione dell'energetica e della massa nei mitocondri SS, alterati livelli mitocondriali dei ROS e insulino-resistenza nei ratti che recuperano grasso come risultato della soppressa termogenesi.

RESTRIZIONE - RIALIMENTAZIONE CON DIETA IPOLIPIDICA E IPERLIPIDICA

Alcuni studi di bilancio energetico condotti negli ultimi anni in modelli animali hanno dato indicazioni sul fatto che la soppressione adiposo-specifica della termogenesi finalizzata al recupero di grasso corporeo risulta particolarmente svantaggiosa nella società attuale in cui il cibo è sempre presente e particolarmente ricco di lipidi.

Il mio secondo disegno sperimentale è stato progettato proprio per capire gli effetti di uno scambio isoenergetico fra carboidrati e grassi sulla spesa energetica, sulla composizione corporea e su alcuni parametri mitocondriali durante la rialimentazione ad alto contenuto lipidico.

In particolare i risultati da me ottenuti mostrano che nonostante i due gruppi di ratti introducano la stessa quantità di energia metabolizzabile, i ratti rialimentati con una dieta iperlipidica guadagnano significativamente più grasso di quelli alimentati con una dieta ipolipidica. Ciò è dovuto al fatto che una rialimentazione con una dieta iperlipidica dà luogo ad una riduzione della spesa energetica e ad un aumento dell'efficienza energetica metabolica (tabella 11), in confronto ad una rialimentazione con diete isoenergetiche ipolipidiche. Questi dati supportano l'idea che la fase di recupero del peso, grazie alla soppressione adiposo-specifica della termogenesi, sia un periodo particolarmente sensibile all'accumulo di grasso corporeo e allo sviluppo di patologie che predispongono a problemi cardiovascolari. Tale collegamento tra la termogenesi soppressa e i rischi cardiovascolari, durante una fase in cui la soppressione della termogenesi è esasperata nel corso di una rialimentazione ad alto contenuto di grassi, sottolinea anche come in risposta ai nostri moderni pasti grassi l'attuazione di una tale risposta adattativa è spinta oltre i limiti per la quale è stata progettata.

Questo modello sperimentale è stato caratterizzato non solo dal punto di vista della composizione corporea e del bilancio energetico, ma anche dal punto di vista di alcuni parametri plasmatici, quali i livelli di glucosio e insulina. In particolare, i dati relativi all'omeostasi glicemica mostrano che la rialimentazione con due distinte diete non influenza né i livelli plasmatici di glucosio né quelli di insulina.

Inoltre, ricordando l'importante ruolo svolto dai mitocondri nel metabolismo corporeo, anche in questo disegno sperimentale sono andati a valutare la massa, la capacità ossidativa e l'efficienza mitocondriale nel muscolo scheletrico. Analizzando i dati ottenuti nel corso del mio studio si evidenzia, però, che la rialimentazione ad alto contenuto lipidico non influenza significativamente nessun parametro mitocondriale.

Infatti, non si riscontrano variazioni tra i due gruppi di ratti in entrambe le subpopolazioni mitocondriali in nessuno dei parametri analizzati.

Un dato interessante riguarda invece la produzione dei ROS. Infatti, mentre l'attività dell'aconitasi non risulta variata tra i gruppi di ratti, l'attività della superossido dismutasi risulta significativamente ridotta nei ratti rialimentati con dieta iperlipidica rispetto ai ratti rialimentati con dieta ipolipidica in entrambi i compartimenti mitocondriali. Questi risultati indicano che si è verificato, al contrario di quanto riscontrato nel primo disegno sperimentale, un abbassamento delle difese antiossidanti che con il passare del tempo potrebbe tradursi in un aumento, nei ratti alimentati con dieta iperlipidica, dei danni ossidativi, danni che adesso dopo solo una settimana di trattamento non sono ancora riscontrati.

In definitiva i dati riportati nel secondo disegno sperimentale della mia tesi evidenziano che gli attesi danni dovuti all'esasperata soppressione della termogenesi non sono da ricercare nei siti da me analizzati e che in particolare questa esasperata soppressione non è correlata con un peggioramento dell'energetica e della funzionalità del compartimento subsarcolemmatico dei mitocondri del muscolo scheletrico. Una spiegazione plausibile a tali risultati potrebbe risiedere nella particolare composizione della dieta ipolipidica. Questa dieta, infatti, sebbene povera di grassi è però particolarmente ricca di carboidrati, è possibile ipotizzare quindi, che le modificazioni a carico del metabolismo corporeo indotte da questo tipo di rialimentazione vadano nella medesima direzione di quelle indotte dalla rialimentazione iperlipidica e come tali non risultano rintracciabili.

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

-
- Brand MD, Chein LF, Ainscow EK, Rolfe DFS, Porter RK: The causes and function of mitochondrial proton leak. *Bioch Biophys Acta* **1187**, pp 132-139 (1994)
- Brand MD: The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Bioch Biophys Acta* **1018**, pp 128-133 (1990)
- Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JT, Dulloo AG: A role for suppressed thermogenesis favoring catch-up fat in the pathophysiology of catch-up growth. *Diabetes* **52**, pp 1090-1097 (2003)
- Drapier JC, Hibbs JBJ: Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzimol* **269**, pp 26-36 (1996)
- Dulloo AG, Girardier L: Influence of diet composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesità relapse. *Metabolism* **41**, pp 1336-1342 (1992)
- Dulloo AG, Jacquet J: Adaptive reduction in basal metabolic rate in response to food deprivation in human: a role for feedback signal from the fat stores. *Am J Clin Nutr* **68**, pp 599-606 (1998)
- Dulloo AG, Jacquet J: An adipose-specific control of thermogenesis in body weight regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**, (Suppl 5) pp S22-S29 (2001)
- Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L: Dissociation of enhanced efficiency of fat deposition during weight recovery from sympathetic control of thermogenesis. *Am J Physiol* **269**, pp R365-369 (1995)

- Flohè L, Ötting F: Superoxide dismutase assay. *Methods Enzimol* **105**, pp 93-104 (1984)
- Folch J, Lees M, Stanley GHS: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, pp 497-510 (1957)
- Gardner PR: Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzimol* **349**, pp 9-23 (2002)
- Hartree EF: Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* **48**, pp 422-427 (1972)
- Hood D. *J Appl Physiol* **90**, pp 1137-1157 (2001)
- Imlay JA, Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in E.Coli. *J Biol Chem* **266**, pp 6957-6965 (1991)
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G: Energy intake and utilization vary during development in rats. *J Nutr* **129** (8), pp 1593-1596 (1999)
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G: Fat balance and hepatic mitochondrial function in response to fat feeding in mature rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23** (11), pp 1122-1128 (1999)
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G: Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. *Br J Nutr* **84** (3), pp 377-385 (2000)
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G: Effect of cold exposure on energy balance and liver respiratory capacity in post-weaning rats fed a high-fat diet. *Br J Nutr* **85** (1), pp 89-96 (2001)

- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G: Fat balance and serum leptin concentrations in normal, hypothyroid, and hyperthyroid rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25** (3), pp 417-425 (2001)
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G: Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br J Nutr* **90** (5), pp 953-960 (2003)
- Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Liverini G: Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26** (1), pp 65-72 (2002)
- Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Liverini G: Metabolic efficiency of liver mitochondria in rats with decreased thermogenesis. *FEBS Lett* **544** (1-3), pp 133-137 (2003)
- Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Tasso R, Liverini G: A possible link between skeletal muscle mitochondrial efficiency and age-induced insulin resistance. *Diabetes* **53** (11), pp 2861-2866 (2004)
- Nedergaard J: The relationship between extramitochondrial Ca^{2+} concentration, respiratory rate, and membrane potential in mitochondria from brown adipose tissue of the rat. *Eur J Biochem* **183**, pp 185-191 (1983)
- Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. *Diabetes* **54**, pp 8-14 (2005)
- Srere PA: Citrate synthase. *Meth Enzymol* **13**, pp 3-5 (1969)
- Stucki JW. *Metabolic Compartmentalization*. London: Academic pp 40-69 (1982)

- Stucki JW: The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation. *Eur J Biochem* **109**, pp 269-283 (1980)

BIBLIOGRAFIA CITATA

- Ames BN, Shinenaga MK, Hagen TM. *Biochem Biophys Acta* **1271**, pp 165-170 (1995)
- Antic V, Tempin A, Montani JP. *Am J Hypertension* **12**, pp 826-829 (1999)
- Arsenijevic D, Girardier L, Seydoux J, Chang HR, Dulloo AG. *Am J Physiol* **272**, pp E908-E917 (1997)
- Ashwell M, Rothwell NJ, Stirling D, Stock MJ, Winter PD. *Proc Nutr Soc* **43**, pp 148A (1984)
- Ashworth A. *Nature* **223**, pp 407-409 (1969)
- Barac-Nieto M, Spurr GB, Lotero H, Maksud MG, Dahners HW. *Am J Clin Nutr* **32**, pp 981-991 (1979)
- Benefice E, Garnier D, Simondon KB, Malina RM. *Eur J Clin Nutr* **55**, pp 50-58 (2001)
- Bizeau ME, Willis WT, Hazel JR. *J Appl Physiol* **85** (4), pp 1279-1284 (1998)
- Boss O, Samec S, Paolini-Giacobino A, Dossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. *FEBS Letters* **408**, pp 39-42 (1997)
- Brand MD. *Bioch Biophys Acta* **1018**, pp 128-133 (1990)
- Brand MD, Chein LF, Ainscow EK, Rolfe DFS, Porter RK. *Bioch Biophys Acta* **1187**, pp 132-139 (1994)
- Brozek J, Chapman CB, Keys A. *JAMA* **137**, PP 1569-1574 (1948)
- Cairns CB, Walther J, Harken AH, Banerjee A. *Am J Physiol* **274**, pp R1376-R1383 (1998)
- Cannon B, Nedergaard J. *Essays in Biochemistry* **20**, pp 110-164 (1985)

- Carbonnel F, Messing B, Rimbert A, Rongier M, Koziat J. *Am J Clin Nutr* **65**, pp 1517-1523 (1997)
- Castilla-Serna L, Pèrez-Oetiz B, Cravioto J. *Eur J Clin Nutr* **50**, pp 392-397 (1996)
- Cettour-Rose P, Samec S, Russell AP, Summermatter S, Mainieri D, Carrillo-Theander C, Montani JP, Seydoux J, Rohner-Jeanrenaud F, Dulloo AG. *Diabetes* **54**, pp 751-756 (2005)
- Challoner DR. *Nature* **217**, pp 78-79 (1968)
- Ciafarani S, Germani D, Branca F. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **81**, pp F71-F73 (1999)
- Cogswell AM, Stevens RJ, Hood DA. *Am J Physiol* **264**, pp C383-C389 (1993)
- Colle E, Schiff D, Andrew G, Bauer CB, Fitzhardinge P. *Pediatrics* **57**, pp 363-371 (1976)
- Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JT, Dulloo AG. *Diabetes* **52**, pp 1090-1097 (2003)
- Crowther NJ, Cameroun N, Trusler J, Grey JP. *Diabetologia* **41**, pp 1163-1167 (1998)
- Debray C, Zarakovitch M, Ranson B, Jacquemin J, Robert J, Siraga M. *Sem Hôpital Paris* **22**, pp 863-870 (1946)
- Dedukhova VI, Mokova EN, Skulachev VP, Starkov AA, Arigoni-Martelli E, Bobyleva VA. *FEBS Letters* **295**, pp 51-54 (1991)
- Desantels M, Himms-Hagen J. *Can J Biochem* **57**, pp 968-980 (1979)
- Diaz VA, Mainous AG, Everett CJ. *J Commun Health* **30**, pp 153-165(2005)
- Drapier JC, Hibbs JBJ. *Methods Enzimol* **269**, pp 26-36 (1996)

- Dulloo AG, Girardier L. *Am J Clin Nutr* **52**, pp 415-420 (1990)
- Dulloo AG, Girardier L. *Metabolism* **41**, pp 1336-1342 (1992)
- Dulloo AG, Girardier L. *Am J Clin Nutr* **58**, pp 614-621 (1993)a
- Dulloo AG, Girardier L. *Int J Obes* **17**,pp115-123 (1993)b
- Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L. *Am J Physiol* **269**, pp R365-369 (1995)
- Dulloo AG, Jacquet J, Girardier L. *Int J Obes Relat Metab Disord* **20**, pp 393-405 (1996)
- Dulloo AG *Clin Nutr* **16**, (Suppl 1) pp 25-35 (1997)
- Dulloo AG, Jacquet J. *Am J Clin Nutr* **68**, pp 599-606 (1998)
- Dulloo AG, Jacquet J. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**, (Suppl 5) pp S22-S29 (2001) a
- Dulloo AG, Samec S. *Br J Nutr* **86**, pp 123-139 (2001) b
- Dulloo AG, Seydoux J, Jacquet J. *Physiol Behav* **83**, pp 587-602 (2004)
- Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ. *BMJ* **318**, pp 427-431 (1999)
- Eriksson J, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker D. *Horm Metab Res* **34**, pp 72-76 (2002)
- Ernsberger P, Nelson DO. *Am J Physiol* **254**, pp R 47-R55 (1998)
- Euser AM, Finken MJ, Keijzer-Veen MG, Hille ET, Wit JM, Dekker FW. *Am J Clin Nutr* **81**, pp 480-487 (2005)
- Finken MJ, Keijzer-Veen MG, Hille ET, Wit JM, Dekker FW, Frolich M et al. *Diabetologia* **49**, pp 478-485 (2006)

- Fleury C, Neverona M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. *Nature Genetics* **15**, pp 269-273 (1997)
- Flint DH, Allen RM. *Chem Rev* **96**, pp 2315-2334 (1996)
- Flohè L, Ötting F. *Methods Enzimol* **105**, pp 93-104 (1984)
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. *J Biol Chem* **226**, pp 497-510 (1957)
- Foster DO, Frydman ML. *Can J Physiol Pharmac* **56**, pp 110-122 (1978)
- Freake HC, Oppenheimer JH. *Annu Rev Nutr* **15**, pp 263-291 (1995)
- Fridovich I. *Annu Rev Biochem* **64**, pp 97-112 (1995)
- Gardner PR, Costantino G, Szabò C, Salzman AL. *J Biol Chem* **272**, pp 25071-25076 (1997)
- Gardner PR. *Methods Enzimol* **349**, pp 9-23 (2002)
- Garlid KD, Orsz DE, Modriansky M, Vassanelli S, Jerek P. *Biol Chem* **271**, pp 2615-2620 (1996)
- Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. *Diabetes* **46**, pp 900-906 (1997)
- Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. *Journal of Biological Chemistry* **272**, pp 24129-24132 (1997)
- Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman M. *J Biol Chem* **275**, pp 16251-16257 (2000)
- Graham GG, Cordano A, Bizzaed RM, Cheek BD. *Pediatr Res* **3**, pp 579-589 (1969)
- Hales CN, Barker DJ. *Br Med Bull* **60**, pp 5-20 (2001)

- HammP,Shekelle RB,StamlerJ. *Am J Epidemiol* **129**, pp312-318 (1989)
- Hansford RG. *Bioch Biophys Acta* **726**, pp 41-80 (1983)
- Harper JA, Dickinson K, Brand MD. *Obes Rev* **2**, pp 255-265 (2001)
- Hartree EF. *Anal Biochem* **48**, pp 422-427 (1972)
- Henry CJK, Rivers, Payne PR. *Eur J Clin Nutr* **42**, pp 543-549 (1988)
- Hermann TS, Rask-Madsen C, Ihlemann N, Dominguez H, Jensen CB, Storgaard H et al. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, pp 1252-1257 (2003)
- Himms-Hagen J, Triandafillon J, Gwillam C. *Am J Physiol* **241**, pp E116-E127 (1981)
- Himms-Hagen J. *FASEB Journal* **4**, pp 2890-2898 (1990)
- Hofman PL, Regan F, Jackson WE, Jefferies C, Knight DB, et al. *N Engl J Med* **351**, pp 2179-2186 (2004)
- Holbrook TL,Barret-Connor E,Wingard D. *Int J Obes Rel Metab Disord* **13**, pp 723-729 (1989)
- Hood D. *J Appl Physiol* **90**, pp 1137-1157 (2001)
- Hulsmann WC, Elliot WB, Slater EC. *Biochim Biophys Acta* **39**, pp 267-276 (1960)
- Huxley RR, Shiell AW, Law CM. *J Hipertens* **18**, pp 815-831 (2000)
- Ibanez L, Ong K, Dunger DB, de Zegher F. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, pp 2153-2158 (2006)
- Imlay JA, Fridovich I. *J Biol Chem* **266**, pp 6957-6965 (1991)
- Iossa S, Liverini G, Barletta A. *J Endocr* **135**, pp 45-51 (1992)
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Samec S, Dulloo AG, Liverini G. *FEBS Lett* **505**, pp 53-56 (2001)

- Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Samec S, Solinas G, Mainieri D, Dulloo AG, Liverini G. *Pflügers Arch (European Journal of Physiology)* **445**, pp 431-436 (2002)
- Jezek P, Engstova H, Zackova M, Vercesi AE, Costa ADT, Arruda P, Garlid KD. *Biochim Biophys Acta* **1365**, pp 319-327 (1998)
- Jornayvaz FR, Selz R, Tappy L, Theintz GE. *Metabolism* **53**, pp 847-851 (2004)
- Kadenbach B. *Biochim Biophys Acta* **1604**, pp 77-94 (2003)
- Kensara OA, Wootton SA, Phillips DI, Patel M, Jackson AA, Elia M. *Am J Clin Nutr* **82**, pp 980-987 (2005)
- Keys A, Brozek J, Henschel A, Mickelson O, Taylor HL *University of Minnesota Press: Minneapolis MN* (1950)
- Kim JM, Woldgiorgis G, Elson CE, Shargo E. *Mech Aging Dev* **46**, pp 263-277 (1988)
- Klaus S, Castella L, Bouillaud F, Ricquier D. *International Journal of Biochemistry* **23**, pp 791-801 (1991)
- Klingenberg M, Winkler E. *J Biol Chem* **269**, pp 2508-2515 (1994)
- Kotler DP, Tierney AR, Culpepper-Morgan JA, Wong J, Pierson RM Jr. *J Parental Enteral Nutr* **14**, pp 454-458 (1990)
- Krauss S, Chen-Yu Zhang, Lowell BB. *Nature* **6**, pp 248-261 (2005)
- Krieger DA, Tade CA, McMillin-Wood J, Booth FW. *J Appl Physiol* **48**, pp 23-28 (1980)
- Laganriere S, Yu BP. *Gerontology* **39**, pp 7-18 (1993)
- Laloi M, Klain M, Riesmier JW, Muller-Rober B, Fleury C, Bouillaud F, Ricquier D. *Nature* **389**, pp 135-136 (1997)

- Landsberg L, Young JB. *New Engl J Med* **298**, pp 1295-1301 (1978)
- Landsberg L, Saville ME, Young JB. *Am J Physiol* **247**, pp E181-E189 (1984)
- Landsberg L. *Q J Med* **61**, pp 1081-1090 (1986)
- Landsberg L. *J Hypertension* **19**, pp 523-528 (2001)
- Larkin S, Mull E, Miao W, Pittner R, Albrandt K, Moore C, Young A, Denaro M, Beaumont K. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **240**, pp 222-227 (1997)
- Levitt NS, Lambert EV, Woods D, Hales CN, Andrew R, Seckl JR. *J Clin Endocrinol Metabol* **85**, pp 4611-4618 (2000)
- Levy-Marchal C, Jaquet D, Czernichow P. *Semin Neonatol* **9**, pp 67-74 (2000)
- Lissnet L, Bengtsson C, Lapidus L, Larson B, Bengtsson B. *Obesity in Europe* **88**, pp 55-60 (1989)
- Longo VD, Viola KL, Klein WL, Finch CE. *J Neurochem* **75**, pp 1977-1985 (2000)
- Ma SWY, Foster DO. *Can J Physiol Pharmac* **64**, pp 1252-1258 (1986)
- Maklashina E, Brian AC, Ackrell. *Aging cell* **3**, pp 21-27 (2004)
- Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G. *FEBS Letters* **443**, pp 326-330 (1999)
- Mecocci P, MacGarvery U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Fallace DC, Beal MF. *Ann Neurol* **34**, pp 609-616 (1993)
- Mitchell PB, Truswell AS. *Handbook of eating disorder Part I : anorexia and bulimia nervosa. Elsevier: Amsterdam* pp 45-77 (1987)
- Nedergaard J. *Eur J Biochem* **183**, pp 185-191 (1983)

- Nicholls DG, Bernson V, Heaton G., In: Effectors of thermogenesis, Girardier L, Seydoux J. (editors). Basel: Birkhauser Verlag, pp 89-93. (1978)
- Nicholls DG. *Eur J Biochem* **50**, pp 305-315 (1974)
- Nicholls DG. *Biochim Biophys Acta* **549**, pp 1-29 (1979)
- Nicholls DG, Locke RM. *Physiol Rev* **64**, pp 1-64 (1984)
- Noor R, Mittal S, Iqbal J. *Med Sci Monit* **8 (9)**, pp RA 210-215 (2002)
- Ong KKL, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. *BMJ* **320**, pp967-971 (2000)
- Papa S e Skulachev VP. *Mol Cell Biochem* **174** (1-2) pp 305-319 (1997)
- Polčić P, Šabovà L, Kolarov J. *FEBS Letters* **412**, pp 207-210 (1997)
- Popkin BM, Richards MK, Monteiro CA. *J nutr* **126**, pp 3009-3016 (1996)
- Pressman BC, Lardy HA. *Biochim Biophys Acta* **21**, pp 458-466 (1956)
- Quant PA, Robin D, Robin P, Ferre P, Brand MD, Girard J. *Eur J Biochem* **195**, pp 449-454 (1991)
- Ramsey JJ, Harper ME, Weindruch R. *Free Rad. Biol. Med.* **29**, pp 946-968 (2000)
- Rich-Edwards JV, Stamfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC, Hennekens CH. *Br Med J* **315**, pp 396-400 (1997)
- Richter D, Park JW, Ames BN. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, pp 6465-6467 (1998)
- Ricquier D, Castella L, Bouillaud F. *FASEB Journal* **5**, pp 2237-2242 (1991)
- Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. *Diabetes* **54**, pp 8-14 (2005)
- Rolfe DFS, Brand MD. *Am J Physiol* **271**, pp C1380-C1389 (1996)

- Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Ravelli ACJ, Osmond C, Barker DJP, Bleker OP. *Mol Cell Endocrinol* **185**, pp 93-98 (2001)
- Rothwell NJ, Stock MJ. *Nature* **281**, pp 31-35 (1979)
- Rottenberg H. *Biochim Biophys Acta* **549**, pp 225-253 (1979)
- Samec S, Assimacopoulos-Jeannet F, Giacobino JP, Seydoux J, Dulloo AG. *Int J Obes Relat Disord* **21**, (Suppl 2) pp S99 (1997)
- Sawaya AL, Martins P, Hoffman D, Roberts SB. *Nutr Rev* **61**, pp 168-175 (2003)
- Schönfeld P. *FEBS Letters* **264**, pp 246-248 (1990)
- Schroeder DG, Martorell R, Flores R. *Am J Epidemiol* **149**, pp 177-185 (1999)
- Seitz HJ, Muller MJ, Krone W, Tarnowski W. *Arch Biochem Biophys* **183**, pp 647-663 (1977)
- Shinohara Y, Unani A, Teshima M, Nishida H, Van Dam K, Terada H. *Biochim Biophys Acta* **1228**, pp 229-234 (1995)
- Singhal A, Fewtrell M, Cole TL; Lucas A. *Lancet* **361**, pp 1089-1097 (2003)
- Skulachev VP. *FEBS Lett* **294**, pp 158-162 (1991)
- Skulachev VP. *Biosci. Rep.* **17**, pp 347-366 (1997)
- Skulachev VP. *FEBS Lett* **423**, pp 275-280 (1998)
- Skulachev VP. *FEBS Lett* **24640**, pp 1-3 (2001)
- Smith GS, Smith JL, Mameesh MS, Simon J, Johnson BC *J Nutr* **82**, pp 173-182 (1964)
- Smith-Vanitz GT, Ashbum AD, Williams WL. *Yale J Biol Med* **43**, pp 61 -70 (1970)

- Soboll S, Grundel S, Schwabe U, Scholz R. *Eur J Biochem* **141** , pp 231-236 (1984)
- Solanes G, Vidal-Puig A, Grujic D, Flier JS, Lowel BB. *Biochemical and Biophysical Research Communications Acta* **272**, pp 25433-25436 (1997)
- Soto N, Bazaes RA, Pena V, Salazar T, Avila A, Iniguez G et al. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, pp 3645-3650 (2003)
- Srere PA. *Meth Enzymol* **13**, pp 3-5 (1969)
- Staniek K, Nohl H. *Bioch Biophys Acta.* **1460**, pp 268-275 (2000)
- Stock MJ. *Int J Obesity* **23**, p 1105 (1999)
- Streat SJ, Brodie AH, Hill GL. *J Trauma* **27**, pp 262-266 (1987)
- Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Brand MD. *Biochimic Biophys. Acta* **1413**, pp 50-54 (1999)
- Stucki JW. *Eur J Biochem* **109**, pp 269-283 (1980)
- Stucki JW. *Metabolic Compartmentalization. London: Academic* pp 40-69 (1982)
- Van Eys JA. *Rev Nutr* **5**, pp 435-461 (1985)
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy MC. *Bioch Molecular Biology* **275**, pp 14064-14069 (2000)
- Victora CG e Barros FC. *Int J Epidemiol* **30**, pp 217-220 (2001)
- Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowel BB. *Biochemical and Biophysical Research Communications. Acta* **235**, pp 79-82 (1997)
- Vidal-Puig A, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szcsepanik A, Wade J, Mootha V, Corthright R, Muoio DM, Lowel BB. *J Biol Chem* **275**, pp 16258-16266 (2000)

- Wallace DC. *Scienze* **256**, pp 628-632 (1992)
- Weyer C, Walford RL, Harper IT, Milner M, MacCallin T, Tataranni PA, Ravussin E. *Am J Clin Nutr* **72**, pp 946-953 (2000)
- Wilhelmj CM, Carnazzo AJ, McCarthy HH. *Am J Physiol* **191**, pp 103-107 (1957)
- Wojtczak L. *J Bioenerg Biomembr* **8**, pp 293-311 (1976)
- Wojtczak L, Schönfeld P. *Biochim Biophys. Acta* **1183**, pp 41-57 (1993)
- Wrigglesworth JM, Sharpe MA, Cooper CE. *Biochem Soc Trans* **21**, pp 781-784 (1993)
- Yajid F, Mercier JC, Mercier BM, Dubouchaud H, Prefault C. *J Appl Physiol* **84**, pp 479-485 (1998)
- Yatsuya H, Tamakoshi K, Hori Y, Zhang H, Ishikawa M et al. *Int J Obes Rel Metab Disord* **27**, 478-483 (2003)
- Young GB. *Trend Endocrinol Metab* **13**, pp 381-385 (2002)
- Zborowski J, Wojtczak L. *Biochim Biophys. Acta* **70**, pp 596-598 (1963)
- Zhang H, Tamakoshi K, Yatsuya H, Murata C, Wada K, Otsuka R et al. *Circ J* **69**, pp 13-18 (2005)
- Uthaya S, Thomas EL, Hamilton G, Dore CJ, Bell J, Modi N. *Pediatr Res* **57**, pp 211-215 (2005)