

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA

IN

“SCIENZA DEL FARMACO”

XX CICLO

Indirizzo Farmacologia, Farmacognosia e Tossicologia

**MECCANISMI DI CONTROLLO DELLA NEOSINTESI
PROTEICA IN FIBROCELLULE MUSCOLARI**

Coordinatore: Prof.ssa Maria Valeria D’Auria

TUTOR

Pietro Scotto di Vettimo

DOTTORANDO

Dott.ssa Maria Gabriella Dattolo

2004-2007

INDICE

1. INTRODUZIONE

	Pag 1
1.1. Generalità sul muscolo	Pag 2
1.1.1. Il muscolo scheletrico	Pag 6
1.1.2. Anatomia funzionale delle fibre muscolari	Pag 9
1.1.3. Fibre muscolari rapide e lente	Pag 10
1.1.4. Trasmissione di impulsi dal nervo al muscolo: la giunzione neuromuscolare	Pag 13
1.1.5. Contrazione muscolare	Pag 19
<i>1.1.5.1. Tensione generata dalle fibre muscolari durante la contrazione</i>	Pag 20
<i>1.1.5.2. Velocità di contrazione</i>	Pag 22
<i>1.1.5.3. Reclutamento temporale e spaziale della forza muscolare</i>	Pag 24
1.1.6. Metabolismo energetico	Pag 25
1.1.7. Fatica muscolare	Pag 26
1.2. Plasticità muscolare	Pag 29
1.2.1. Meccanismi molecolari coinvolti nella genesi dell'ipertrofia muscolare	Pag 32
<i>1.2.1.1. Fattori di crescita</i>	Pag 37
<i>1.2.1.2. Nutrienti: Aminoacidi</i>	

<i>1.2.1.3. Ipossia</i>	Pag 37
<i>1.2.1.4. Livelli energetici</i>	Pag 38
<i>1.2.1.5. Ormoni</i>	Pag 39
<i>1.2.1.6. Calcio</i>	Pag 44
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO	Pag 46
3. MATERIALI E METODI	
3.1. Sostanze chimiche	Pag 51
3.2. Colture cellulari	Pag 52
<i>3.2.1. Cellule muscolari</i>	Pag 52
<i>3.2.2. Cellule di origine non muscolare</i>	Pag 54
3.3. Modello sperimentale	Pag 54
3.4. Preparazione degli estratti citoplasmatici	Pag 55
3.5. Misura dell'ATP	Pag 56
3.6. Western Blot	Pag 58
3.7. Incorporazione di aminoacidi marcati	Pag 59
3.8. Analisi statistica	Pag 59

4. RISULTATI

4.1. Assenza di glucosio

4.1.1. Rimozione del glucosio in miociti, mioblasti e cellule non muscolari Pag 60

4.1.2. Fosforilazione delle proteine mTOR, p70S6k e 4EBP1 in miociti in mezzo carente di glucosio in presenza di rapamicina o wortmannina Pag 61

4.1.3. Sintesi proteica in cellule muscolari sottoposte a pre-incubazione in terreno di coltura deprivato del glucosio Pag 66

4.2. Azione del testosterone

4.2.1. Fosforilazione di mTOR e p70S6k in miociti incubati in presenza di testosterone Pag 68

4.3. Ruolo del calcio

4.3.1. Miociti incubati in assenza di glucosio ed in presenza di calcio-antagonisti o inibitori del rilascio del Ca²⁺ dal reticolo sarcoplasmatico Pag 72

4.3.2. Miociti incubati con testosterone enantato, calcio-antagonisti ed inibitori del rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico Pag 75

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI Pag 77

6. BIBLIOGRAFIA Pag 86

1. INTRODUZIONE

1.1. Generalità sul muscolo

I muscoli sono organi formati da tessuto che contraendosi produce il movimento reciproco di diverse parti del corpo, o di singoli organi. Ciascun muscolo è costituito da fasci di cellule di forma allungata (*fibre muscolari*), innervate dal sistema nervoso somatico o dal sistema nervoso autonomo. Il primo è responsabile di contrazioni di tipo volontario, mentre il secondo di contrazioni involontarie. Fondamentalmente è possibile distinguere tre tipi di muscolo, che differiscono tra loro per caratteristiche anatomiche e funzionali.

I **muscoli scheletrici**, saldamente legati a segmenti ossei, sono formati da tessuto striato, si contraggono sotto il controllo della volontà, rendendo possibile il movimento e garantendo la posizione del corpo (*postura*).

I **muscoli lisci** sono localizzati nello spessore degli organi interni, come l'intestino e lo stomaco, e nelle pareti dei vasi sanguigni; si contraggono lentamente ed in maniera prolungata, in risposta a stimoli involontari, consentendo lo svolgimento di funzioni fisiologiche quali i movimenti peristaltici durante la digestione o la dilatazione e la costrizione vasale.

Svolge un'attività involontaria anche il **muscolo cardiaco**, costituito da fibre striate che, contraendosi in modo sincrono, permettono al cuore di esercitare

una forza propulsiva sul sangue determinandone la circolazione all'interno dei vasi sanguigni.

In questo elaborato saranno prese in esame in particolare le proprietà anatomiche e funzionali del muscolo scheletrico.

1.1.1. Il muscolo scheletrico

I muscoli scheletrici rappresentano circa il 40% del peso corporeo. Ogni muscolo agisce come un'unità integrata, costituita da un insieme di cellule o *fibrocellule muscolari*. Le singole fibre di un muscolo scheletrico sono avvolte da tessuto connettivo e disposte con gli assi longitudinali in parallelo (fig. 1). Le *fibre muscolari* sono cellule di forma pressoché cilindrica, affusolata alle estremità, dal diametro variabile tra 10 e 100 micron. Esse derivano embriologicamente dalla divisione multipla di una singola cellula madre che da origine a mioblasti la cui fusione porta alla formazione di cellule sinciziali multinucleate, avvolte da un'unica membrana cellulare (*sarcolemma*) circondata da una guaina di tessuto connettivo lasso, detta *endomisio*. Gruppi di fibre adiacenti costituiscono *fascicoli* avvolti da tessuto connettivale, il *perimisio*; diversi fascetti di fibre muscolari si riuniscono in un fascio più grande, che costituisce il muscolo vero e proprio, anch'esso dotato di un rivestimento di natura connettivale (*epimisio*). Il muscolo può avere la forma di un fuso, con un ventre e due estremità allungate che sono saldamente ancorate

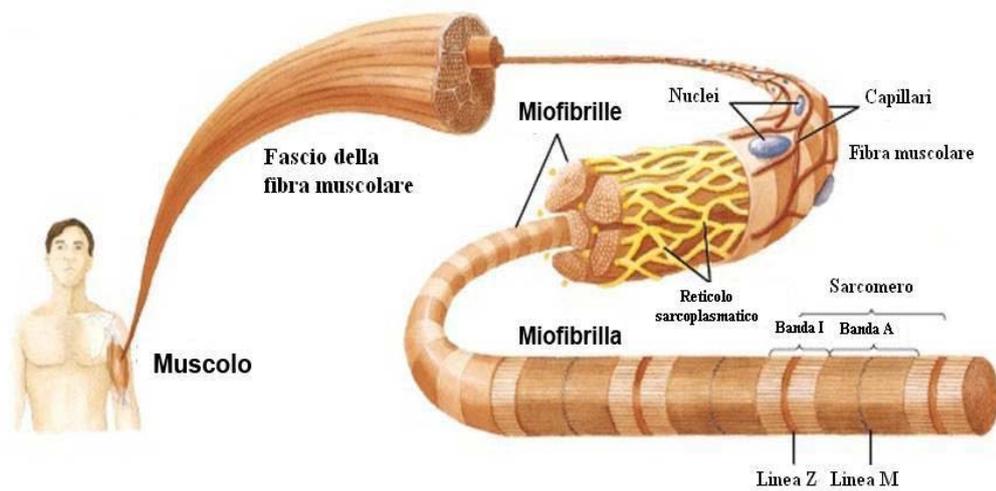


Fig. 1. Il muscolo scheletrico è composto da unità morfologiche dette *fibre muscolari*. Le singole fibre di un muscolo scheletrico sono avvolte da tessuto connettivo e disposte con gli assi longitudinali in parallelo. Gruppi di fibre adiacenti costituiscono fascicoli avvolti da tessuto connettivale; diversi fascetti di fibre muscolari si riuniscono in un fascio più grande, che costituisce il muscolo vero e proprio.

alle ossa attraverso i *tendini*, robusti cordoni di tessuto connettivo denso: presentano tale struttura, ad esempio, il bicipite ed il tricipite. Hanno, invece, forma laminare i muscoli della parete addominale, direttamente connessi alle strutture ossee per mezzo di fasce connettivali dette *aponeurosi*. Appaiono di forma appiattita anche i muscoli mimici o pellicciai che, posti al di sotto della cute del viso, sono responsabili delle espressioni del volto.

Una fitta rete di capillari circonda ogni singola fibra muscolare, garantendo apporto di ossigeno e nutrienti, e rimozione di anidride carbonica e cataboliti. Le esigenze nutrizionali dei muscoli variano in funzione del livello di attività, di conseguenza diversi meccanismi a breve termine, come la vasodilatazione nei distretti attivi, o a lungo termine, come l'incremento del numero di capillari nei muscoli allenati, regolano la distribuzione del flusso sanguigno in base alle specifiche necessità metaboliche del tessuto muscolare. A riposo il metabolismo dei muscoli scheletrici è molto basso per cui il flusso ematico è di solo 4ml/min/100 grammi. Al contrario, in condizioni di intensa attività fisica, le esigenze metaboliche muscolari aumentano e di conseguenza il flusso sanguigno sale a valori di 80 ml/min/100 grammi.

Due tipi di fibre nervose innervano il muscolo scheletrico: fibre sensitive (afferenti) e fibre motorie (efferenti).

Gli assoni sensitivi emergono da neuroni a T situati nei gangli delle radici dorsali del midollo spinale e nei nuclei sensitivi dei nervi cranici e trasportano informazioni meccanocettive riguardanti lo stato contrattile del muscolo

(lunghezza delle fibre e forza prodotta) e nocicettive riguardanti la sua integrità fisica.

I motoneuroni vengono distinti in:

- Motoneuroni α : cellule di grosse dimensioni (fino a 70 μm di diametro), il cui pirenoforo è localizzato nelle corna anteriori del midollo spinale o nei nuclei motori dei nervi cranici, che innervano i muscoli scheletrici.
- Motoneuroni γ : cellule più piccole (circa 20 μm di diametro), il cui corpo cellulare si trova nelle corna anteriori del midollo spinale, che innervano i *fusi neuromuscolari* e, più precisamente, le fibre muscolari modificate (*fibre intrafusali*) contenute in questi recettori di allungamento del muscolo.

I motoneuroni α rappresentano la via finale dei movimenti riflessi e volontari, e ricevono numerose afferenze eccitatorie ed inibitorie provenienti sia dai centri superiori sia da altri neuroni spinali. Ogni assone motorio, una volta penetrate le diverse fasce connettivali del muscolo, si dirama in numerose terminazioni, ciascuna delle quali entra in contatto sinaptico (*giunzione neuromuscolare* o *placca motrice*) con diverse fibre muscolari. L'insieme di un motoneurone e tutte le fibre che esso innerva (*unità motoria*) costituisce l'unità funzionale della contrazione; il numero di fibre appartenenti ad un'unità motoria può variare grandemente da una o poche decine fino ad alcune migliaia, a seconda della dimensione del muscolo e della sua funzione di fine

controllo di movimenti precisi (unità motorie con poche fibre) o di produzione più massiccia di forza (unità motorie con molte fibre).

1.1.2. Anatomia funzionale delle fibre muscolari

La fine architettura del muscolo striato è stata chiarita con indagini effettuate mediante microscopia elettronica e diffrazione a raggi X. Ogni singola fibra muscolare contiene fasci paralleli di fibre più piccole dette miofibrille, ognuna delle quali consta, a sua volta, di unità proteiche elementari (*miofilamenti*), disposte nel senso longitudinale della miofibrilla (fig.2).

La striatura del muscolo scheletrico è dovuta alla presenza di bande chiare e scure, ad andamento trasversale, che si ripetono periodicamente. Le bande chiare (*bande I*, isotrope alla luce polarizzata) sono costituite da filamenti sottili; le bande scure (*bande A*, anisotrope) contengono filamenti spessi circondati da filamenti esili. Le bande I sono tra loro separate dalla linea Z scura ed opaca; la porzione di fibra muscolare delimitata da due strie Z prende il nome di sarcomero. Le bande A presentano centralmente una fascia più chiara (*banda H*) composta esclusivamente da filamenti spessi.

Il filamento sottile consta di due catene di *F-actina* (*filamentosa o fibrillare*) avvolte a doppia elica. Ciascuna catena è, a sua volta, un polimero di *G-actina*, proteina globulare dal peso di circa 43.000 dalton. Ogni molecola di *G-actina* possiede un sito di legame per la miosina. Attorno alla duplice elica di actina

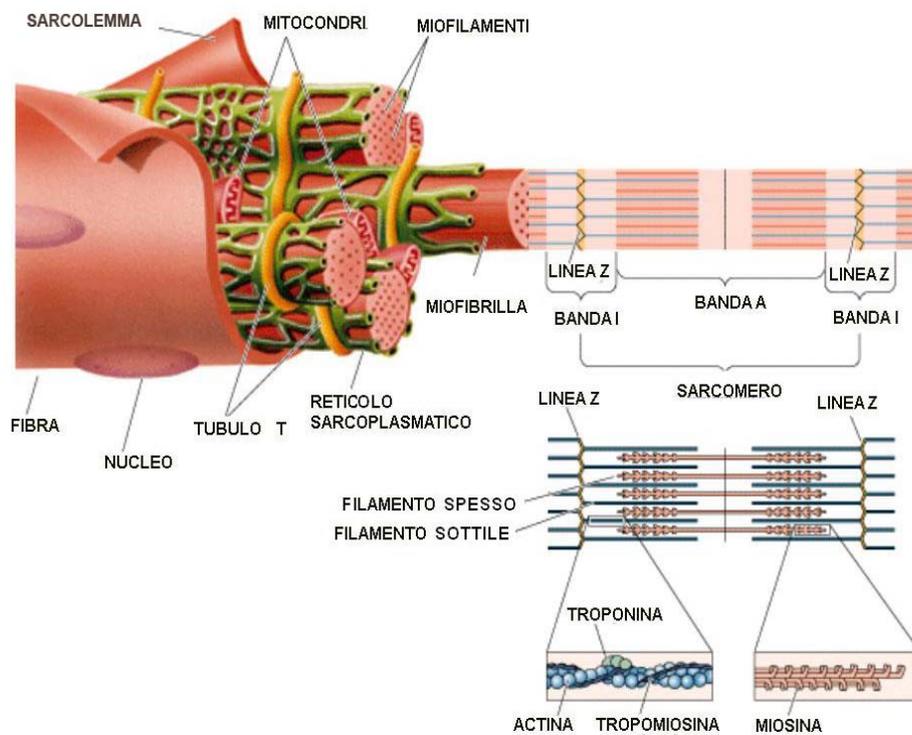


Fig. 2. L'interno di ogni *fibra muscolare* appare, al microscopio elettronico, costituito da fasci paralleli di *miofibrille* le quali sono, a loro volta, composte da unità proteiche elementari (*miofilamenti*), disposte secondo uno schema regolare che si ripete per tutta la lunghezza della miofibrilla. Un'unità di questo schema ripetitivo viene detta *sarcomero*.

sono presenti due filamenti di *tropomiosina* anch'essi avvolti a doppia elica. In posizione superficiale, invece, si trova disposta con regolarità lungo i miofilamenti sottili, la *troponina*. La tropomiosina è una molecola di 70.000 dalton, lunga 40 nm, cioè circa 7 monomeri di actina. La troponina è formata da tre subunità: TnT, TnI e TnC. TnT si lega alla tropomiosina, TnI contrae rapporto con l'actina e può inibire l'interazione acto-miosina, infine TnC possiede un sito di legame per il Ca^{2+} che svolge un ruolo fondamentale nel processo della contrazione. Il filamento spesso è formato da alcune centinaia di molecole di *miosina*, proteina di grosse dimensioni (circa 500.000 dalton), composta da 6 catene polipeptidiche: due catene pesanti identiche e due paia di catene leggere. Ciascuna catena pesante presenta una *testa* globulare ed una *coda*. Le due code sono avvolte l'un l'altra a formare una doppia elica. L'estremità cefalica della molecola è costituita dalle due teste globulari delle catene pesanti e dalle quattro catene leggere. Nel filamento spesso, le molecole di miosina si aggregano assieme a livello delle code, mentre le teste (*ponti trasversali*) si proiettano all'esterno. Ogni testa ha due siti: uno capace di legarsi all'actina e l'altro dotato d'azione ATPasica che, attraverso l'idrolisi dell'ATP, libera una notevole quantità di energia, necessaria alla contrazione.

1.1.3. Fibre muscolari rapide e lente

Le fibre dei muscoli scheletrici possono essere classificate in base alla velocità di contrazione ed alla resistenza alla fatica. Se ne distinguono tre tipologie:

1. fibre ossidative a contrazione lenta (tipo I o *Slow-Twitch*),
2. fibre ossidativo-glicolitiche a contrazione veloce (tipo IIa o *Fast Oxidative-Glycolitic*),
3. fibre glicolitiche a contrazione rapida (tipo IIb o *Fast-Glycolitic*).

Le fibre di I tipo, sono di colore più scuro per la ricchezza di mioglobina, presentano piccolo diametro, bassi valori di ATPasi miofibrillare e un ampio corredo di enzimi ossidativi; tali fibre, responsabili del tono muscolare, si contraggono lentamente e hanno notevole resistenza alla fatica;

Le fibre di II tipo (*chiare*), invece, sono atte a contrazioni rapide e strenue, come quelle nel salto in alto e nella corsa su brevi distanze. Tali fibre hanno uno sviluppato reticolo sarcoplasmatico che consente il rapido rilascio di ioni calcio, presentano un metabolismo prevalentemente anaerobico, e generano forza, o *tensione muscolare*, più velocemente delle fibre di tipo I.

La maggior parte dei muscoli scheletrici è composta da fibre di entrambi i tipi. Il potenziamento dell'uno o dell'altro tipo di fibre muscolari, attraverso uno specifico allenamento, permette lo sviluppo di particolari qualità fisiche come l'elasticità muscolare e la velocità.

1.1.4. Trasmissione di impulsi dal nervo al muscolo: la giunzione neuromuscolare

Come si è detto precedentemente, le fibre muscolari sono innervate da fibre nervose mieliniche (*fibre α*) che originano dai grandi motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale. Alla sua estremità, ogni fibra nervosa si ramifica più volte per andare a stimolare diverse fibre muscolari. La terminazione nervosa prende contatto con la fibra muscolare, circa a metà della sua lunghezza, formando una connessione o sinapsi chimica nota come *giunzione neuromuscolare* (fig. 3).

A livello della giunzione neuromuscolare, l'assone del motoneurone innerva una regione specializzata della membrana muscolare che è detta *placca motrice*. In prossimità della placca, la fibra motrice perde il suo rivestimento mielinico e si suddivide in numerose, sottili branche terminali. Ciascuna di queste forma, alla sua estremità, un grappolo di varicosità o *bottoni sinaptici*, ricoperti da un sottile strato di cellule di Schwann. Tra il bottone sinaptico e la membrana della fibra muscolare è compreso lo *spazio sinaptico*, occupato da un sottile strato reticolare spugnoso, la *lamina basale*, che si stende su numerosi ripiegamenti della membrana muscolare detti *pieghe giunzionali*. Nel bottone terminale sono presenti: *mitocondri*, che forniscono energia destinata prevalentemente alla sintesi del mediatore eccitatorio, l'*acetilcolina* (Ach); *vescicole sinaptiche*, in cui l'acetilcolina viene rapidamente accumulata; *zone attive*, ispessimenti della membrana presinaptica dove avviene il rilascio del

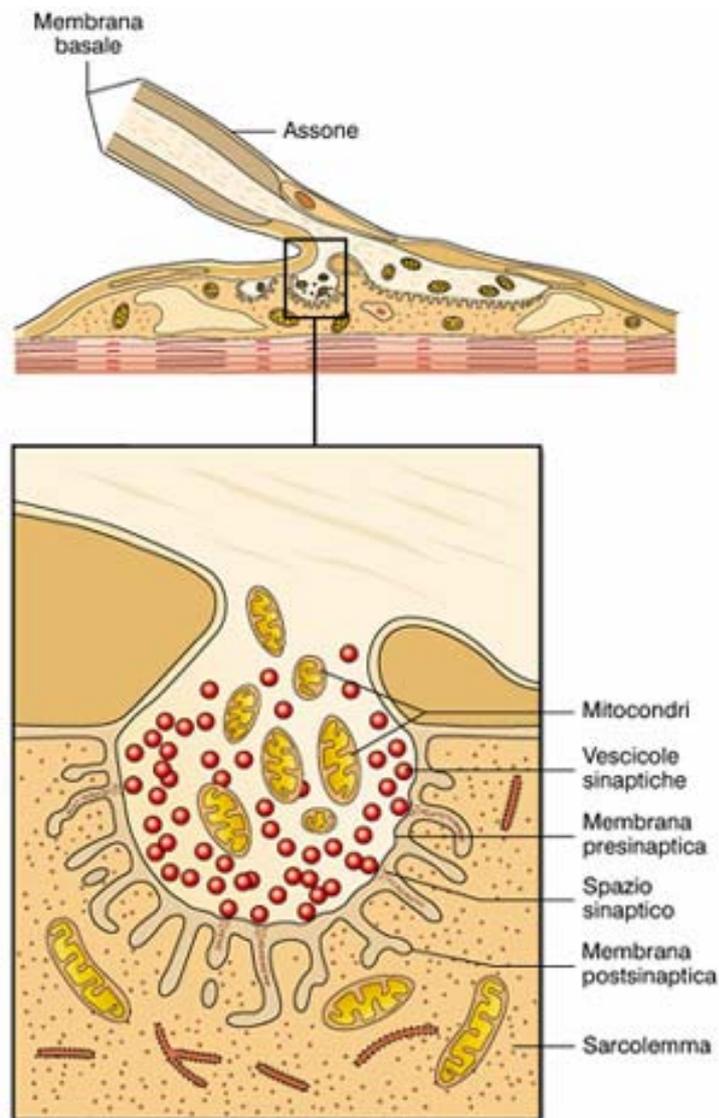


Fig. 3. Le fibre muscolari sono innervate da fibre nervose mieliniche (fibre α) che originano dai grandi motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale. Alla sua estremità, ogni fibra nervosa si ramifica più volte per andare a stimolare diverse fibre muscolari. La terminazione nervosa prende contatto con la fibra muscolare, circa a metà della sua lunghezza, formando una connessione o sinapsi chimica nota come *giunzione neuromuscolare*.

neurotrasmettitore. La membrana presinaptica è attraversata da canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti che, ad ogni potenziale d'azione, fanno entrare ioni calcio nella terminazione, promuovendo la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana del terminale nervoso e la conseguente liberazione di Ach nello spazio sinaptico. A riposo, le vescicole contenenti il neurotrasmettitore sono ancorate al citoscheletro del bottone presinaptico per mezzo di proteine note come *sinapsine*. All'arrivo del potenziale d'azione, in conseguenza dell'ingresso di ioni calcio, si ha la fosforilazione delle sinapsine ed il distacco delle vescicole, le quali si dirigono verso la membrana presinaptica. La fusione delle vescicole con la membrana del bottone, è guidata da un complesso macchinario biochimico i cui componenti, proteine della membrana vescicolare, le v-SNARES (*vesicles Soluble NSF Attachment Receptor*), e proteine della membrana pre-sinaptica, le t-SNARES (*target Soluble NSF Attachment Receptor*), interagiscono come una cerniera lampo, sino a portare le due membrane a stretto contatto (*emifusione*). L'entrata di calcio per apertura di canali localizzati nei pressi delle zone attive, consente il rilascio del neurotrasmettitore attraverso *pori di fusione* che si aprono reversibilmente; all'esocitosi fa seguito la ricostituzione endocitotica delle vescicole, le quali vengono riciclate e riutilizzate ripetutamente. A livello postsinaptico, l'Ach si lega a *recettori nicotinici* situati all'apice delle pieghe giunzionali. Il recettore nicotinico è una proteina integrale di membrana, composta da cinque subunità ($\alpha_2\beta\delta\gamma$); ogni subunità contiene quattro regioni idrofobiche che vanno a

costituire strutture ad α -elica che attraversano interamente la membrana a formare un canale tubulare (*recettore-canale*). Affinché il canale si possa aprire, è necessario che due molecole di Ach si leghino alle due subunità α , determinando una variazione conformazionale a cui segue un ingresso netto di ioni Na^+ e la comparsa di un potenziale sinaptico depolarizzante (*potenziale di placca*). Il numero di canali attivati che si aprono è limitato dai quanti di Ach che raggiungono la membrana post-sinaptica. Questi, tuttavia, depolarizzando la cellula post-sinaptica, attivano i canali per il Na^+ voltaggio-dipendenti, ubicati nelle immediate vicinanze della placca motrice. L'apertura di tali canali porta all'innescamento, nella fibra muscolare, di un potenziale d'azione che diffonde lungo il sarcolemma. I complessi recettore-canale, aperti dal legame con l'Ach, si chiudono poi, per un meccanismo intrinseco, in un tempo variabile tra 1 e 10 ms. La chiusura determina il distacco della molecola di Ach, che viene velocemente inattivata dall'enzima *acetilcolinesterasi*, ancorato alla lamina basale, il quale la idrolizza in acetato e colina.

1.1.5. Contrazione muscolare

La funzione della contrazione muscolare è quella di generare forza, sia per mantenere la postura corporea sia per produrre movimento.

È possibile distinguere due tipi di contrazione: **isotonica** o **isometrica**.

La contrazione isotonica (a forza costante) si verifica quando un muscolo, al quale sia applicato un carico costante, si accorcia per sollevare tale carico (ad es. sollevamento di un oggetto).

In una contrazione isometrica (a lunghezza costante), quando un muscolo viene attivato ed il suo accorciamento è reso impossibile da un impedimento, come un carico eccessivo, lo scorrimento dei filamenti di actina e miosina causa ugualmente la produzione di forza che, però, non si traduce in movimento. Sebbene in condizioni isometriche la lunghezza del muscolo *in toto* non cambi, le fibre muscolari, in realtà, vanno incontro ad un lieve accorciamento, che viene assorbito dall'elasticità dei tendini.

La contrazione del muscolo striato è mediata dal sistema nervoso attraverso un processo di *accoppiamento eccitazione-contrazione*. Il potenziale d'azione che viaggia lungo l'assone di un motoneurone raggiunge la *placca motrice* dove con normale modalità sinaptica viene rilasciata *acetilcolina (Ach)*. L'Ach si fissa ai recettori *nicotinici* della membrana postsinaptica generando una corrente depolarizzante. Espressione di questa depolarizzazione è il *potenziale di placca*, fenomeno locale e proporzionale all'intensità dello stimolo che, raggiungendo un certo *valore critico*, innesca un *potenziale d'azione*. Il potenziale d'azione muscolare, come quello nervoso, dipende dall'apertura di canali voltaggio-dipendenti per il Na^+ , obbedisce alla *legge del tutto o nulla* e si propaga velocemente, senza decremento lungo tutta la membrana. Nel caso della fibra muscolare, però, il potenziale d'azione, una volta raggiunta la

superficie cellulare, penetra all'interno della fibra, grazie alla presenza dei *tubuli trasversi* o *tubuli T*, invaginazioni della membrana sarcoplasmatica, che stabiliscono contatto con una rete di *cisterne* a sviluppo longitudinale (*reticolo sarcoplasmatico*), contenente un'alta concentrazione di ioni Ca^{2+} . Il complesso formato da due cisterne disposte lateralmente ad un tubulo T prende il nome di *triade* e svolge una funzione fondamentale nella sincronizzazione dei processi di contrazione della fibra muscolare. Infatti, i tubuli T consentono all'impulso nervoso, proveniente dalla giunzione neuromuscolare, di diffondere simultaneamente per l'intera lunghezza e spessore della fibra muscolare, innescando il rilascio di ioni Ca^{2+} da parte del reticolo sarcoplasmatico (RS) e dando il via alla contrazione muscolare. La membrana del RS contiene canali voltaggio-dipendenti che si aprono rapidamente, con liberazione di calcio nel citosol, al passaggio di un potenziale d'azione lungo i tubuli T. I tubuli T, infatti, sono funzionalmente collegati alla membrana del RS per mezzo di *strutture pedicellari* (*recettori per la rianodina*) che funzionano da recettori del calcio. Laddove tali strutture prendono contatto con i tubuli T ci sono altre strutture proteiche (*recettori per le diidropiridine*) che fungono da rilevatori di voltaggio. Quando un potenziale d'azione depolarizza la membrana dei tubuli T, questi sensori di voltaggio subiscono un cambiamento conformazionale che li fa meccanicamente agire sui piedi dei recettori della rianodina, inducendo l'apertura dei canali del calcio. Al termine della trasmissione nervosa, durante la fase di rilasciamento, gli ioni Ca^{2+} vengono rimossi dal sarcoplasma per

azione di pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPasi}$ localizzate sulle membrane del reticolo sarcoplasmatico. Grazie all'azione di tali pompe il reticolo è in grado di accumulare calcio contro gradiente di concentrazione.

La contrazione delle fibre muscolari scheletriche consente di generare forza per produrre un movimento o per sostenere un carico. Tale processo si realizza attraverso complesse interazioni molecolari tra actina, miosina e proteine regolatrici, innescate dall'improvviso aumento della concentrazione sarcoplasmatica di Ca^{2+} e sostenute dall'idrolisi dell'ATP. Durante la contrazione, i filamenti sottili di actina scorrono sui filamenti di miosina (*teoria dello scorrimento dei miofilamenti*) (fig. 4); in tal modo le successive linee Z si avvicinano tra loro ed il sarcomero diventa più corto: l'accorciamento cumulativo di tutti i sarcomeri posti in serie nel muscolo ne determina l'accorciamento totale.

Il ciclo degli eventi implicati nella contrazione muscolare ha inizio con l'idrolisi dell'ATP per azione adenosintrifosfatase della testa miosinica (*m-ATPasi*). I prodotti dell'idrolisi, ADP e P_i , restano legati alla miosina e la testa si estende perpendicolarmente verso il filamento di actina (conformazione ad "alta energia"). Successivamente, il Ca^{2+} , rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico, si lega alla subunità TnC del complesso troponina-tropomiosina, che subisce un cambiamento conformazionale tale da lasciare liberi, sul filamento di actina, dei siti attivi ai quali si possono legare le teste della miosina. Il legame della miosina-ADP- P_i all'actina porta al rilascio di P_i

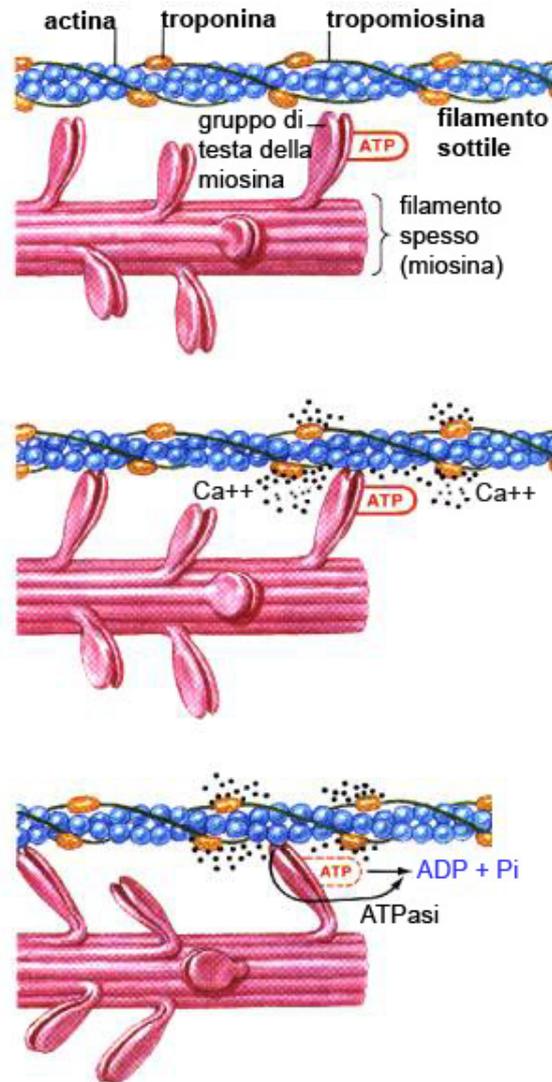


Fig. 4. A riposo, la testa della miosina si trova nella sua forma a massima energia, cioè lega ATP. Durante la contrazione l'attività ATPasica della testa miosinica idrolizza l'ATP in modo che il filamento spesso possa legare l'actina e si verifichi il cambiamento conformazionale che spinge il filamento sottile verso l'interno del sarcomero (*teoria dello scorrimento dei miofilamenti*).

dai ponti trasversali, che si piegano in direzione del centro della banda H, trascinando con sé i filamenti di actina a cui sono ancora legati. La flessione dei ponti trasversali favorisce anche il rilascio di ADP, mentre la miosina resta ancora legata all'actina. Il legame di una nuova molecola di ATP alla miosina provoca il rapido distacco dall'actina. L'idrolisi dell'ATP appena legato, riporta i ponti trasversali nella conformazione ad "alta energia", pronti per un nuovo legame con l'actina.

In sintesi, gli eventi coinvolti nella contrazione muscolare si ripetono ciclicamente secondo il seguente schema:

1. **Idrolisi dell'ATP.** Il sito, sulla testa di miosina, che lega ATP, lo idrolizza ad ADP e fosfato inorganico (P_i). Entrambi i prodotti rimangono legati alla miosina.
2. **Formazione del complesso actina-miosina.** La testa della miosina si lega alla molecola di actina formando un ponte trasversale disposto ad angolo di 90° rispetto ai filamenti.
3. **Dissociazione del P_i e flessione dei ponti trasversali.** In seguito al rilascio del fosfato inorganico, la testa di miosina ruota sul proprio cardine (*colpo di forza*) tirando il filamento di actina verso il centro del sarcomero.
4. **Rilascio di ADP.** La testa della miosina libera ADP; assumendo lo *stato di rigor*, o di legame stretto alle molecole di actina.

5. **Nuovo legame con ATP.** Una nuova molecola di ATP si lega alla testa miosinica, che si stacca dall'actina.

1.1.5.1. Tensione generata dalle fibre muscolari durante la contrazione

La tensione sviluppata da una fibra muscolare durante una contrazione è funzione della lunghezza dei singoli sarcomeri prima dell'inizio della contrazione stessa. Ciascun sarcomero è in grado di generare una forza massimale se si trova ad una lunghezza ottimale (2-2,2 micron) quando incomincia a contrarsi. A livello molecolare lo sviluppo di tensione, durante una singola contrazione in una fibra muscolare, dipende dal grado di sovrapposizione dei filamenti spessi e sottili. Secondo la teoria dello scorrimento dei filamenti, infatti, la tensione che può essere generata da una fibra muscolare è direttamente proporzionale al numero di ponti trasversi che si instaurano tra filamenti di actina e miosina. Se la fibra comincia a contrarsi quando i filamenti sottili e spessi sono scarsamente sovrapposti (sarcomero troppo lungo), nella parte iniziale della contrazione, tali filamenti possono interagire tra loro solo in minima misura, generando poca forza. Se al principio della contrazione, invece, i filamenti di actina e miosina sono eccessivamente sovrapposti (sarcomero più corto della sua lunghezza ottimale), l'accorciamento del sarcomero può aver luogo solo per breve distanza prima che la miosina non riesca più a trovare siti di legame per la formazione di

nuovi ponti trasversali; di conseguenza, la tensione che la fibra è in grado di sviluppare è molto ridotta.

1.1.5.2. Velocità di contrazione

La velocità ($v = l/t$, dove l è lo spostamento, e t il tempo) di contrazione di un muscolo dipende dal tipo di miosina presente nei filamenti spessi e dal carico che viene spostato.

Nell'uomo sono state identificate tre isoforme di miosina (MHC-I, MHC-IIa e MHC-IIx) con diverse attività ATPasiche, a cui corrispondono le fibre muscolari di tipo I, IIa e IIb. Le fibre di tipo I, dotate di ATPasi a cinetica lenta, sono caratterizzate da bassa velocità di contrazione. Le fibre IIb, a contrazione rapida, scindono l'ATP più velocemente e quindi completano i propri cicli contrattili in tempi più brevi rispetto alle fibre a contrazione lenta. Le fibre di tipo IIa hanno una velocità di contrazione intermedia.

La velocità di accorciamento di un muscolo è inversamente proporzionale all'entità del carico al quale è sottoposto (*relazione tensione-velocità*). E' ovvio che un muscolo in assenza di carico si contrae più velocemente rispetto a quando, ad esempio, si deve sollevare un peso. Se in una serie di contrazioni successive si aumenta il carico e si misura la velocità di contrazione in funzione della forza prodotta dal muscolo, si descrive una curva (fig. 5) nella quale la velocità di accorciamento massimale corrisponde alla contrazione con

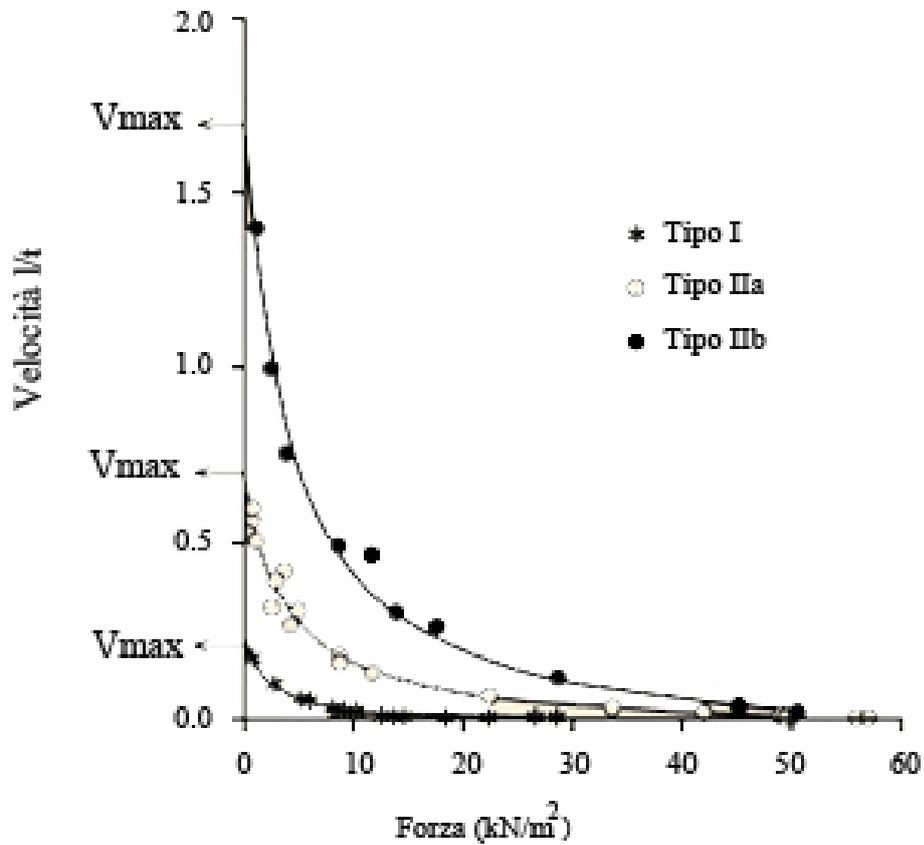


Fig. 5. Se in una serie di contrazioni successive si aumenta il carico e si misura la velocità di contrazione in funzione della forza prodotta dal muscolo, si descrive una curva nella quale la velocità di accorciamento massimale corrisponde alla contrazione con carico nullo. All'aumentare del carico la velocità di contrazione si riduce progressivamente sino ad arrivare a zero quando la forza massima generata dal muscolo è inferiore a quella necessaria per muovere il carico (*contrazione isometrica*).

carico nullo, mentre all'aumentare del carico la velocità di contrazione si riduce progressivamente sino ad arrivare a zero quando la forza massima generata dal muscolo è inferiore a quella necessaria per muovere il carico (*contrazione isometrica*). Il prodotto della forza per la relativa velocità di accorciamento in ogni particolare condizione di carico rappresenta la *potenza* (capacità di compiere *lavoro*) erogata dal muscolo in quelle condizioni.

1.1.5.3. Reclutamento temporale e spaziale della forza muscolare

La forza generata dalla contrazione di una singola fibra aumenta con l'aumentare della frequenza di stimolazione. Se potenziali d'azione ripetuti sono separati tra loro da brevi intervalli di tempo, la fibra muscolare non si rilascia completamente tra gli stimoli, e ogni nuova contrazione ha inizio prima che la precedente si sia esaurita. Ne consegue che, per definiti incrementi della frequenza di stimolazione, si assiste alla parziale sommazione delle singole scosse muscolari (*reclutamento temporale*) e quindi ad un aumento della tensione generata. Quando la frequenza raggiunge un livello critico, le contrazioni si susseguono così rapidamente da fondersi completamente: questo stato di contrazione massimale è detto *tetano*. La tetanizzazione si verifica perché, nell'intervallo tra i potenziali d'azione che si succedono, nel sarcoplasma rimane una concentrazione di ioni calcio sufficiente a mantenere la contrazione senza consentire il rilasciamento della fibra muscolare.

La graduazione della forza sviluppata dal muscolo dipende anche dalla possibilità di variare il numero di unità motorie stimulate simultaneamente.

Il meccanismo che regola il numero di unità motorie da attivare per generare tensioni di diversa entità viene definito *reclutamento spaziale*.

Tutte le fibre muscolari di un'unità motoria sono dello stesso tipo. In base al tipo di fibre muscolari che le costituiscono, le unità motorie vengono distinte in rapide e lente. In generale, le unità lente sono innervate da motoneuroni piccoli a bassa velocità di conduzione, mentre quelle rapide sono innervate da motoneuroni grandi a conduzione veloce. Quando il sistema nervoso centrale invia un debole segnale per far contrarre un muscolo, le prime ad essere reclutate sono le piccole unità motorie a contrazione lenta, che peraltro, essendo più vascolarizzate, sono più resistenti e hanno migliori capacità di recupero rispetto a quelle di diametro maggiore. Man mano che l'intensità del segnale aumenta, cresce anche il numero di unità motorie attivate, fino al reclutamento di quelle più grandi a contrazione rapida (*principio di dimensione*). In questo modo, le fibre più piccole vengono reclutate quando è sufficiente poca forza ed è richiesta piuttosto una maggiore finezza di movimenti; quando è necessaria una forza più elevata, invece, l'attivazione delle fibre di dimensione maggiore contribuisce progressivamente a fornirla. Comunque, anche durante la contrazione massimale di un muscolo, le unità motorie, lente e rapide, che lo compongono non vengono mai reclutate tutte contemporaneamente, bensì l'attivazione di alcune si alterna al rilassamento di

altre. Ciò permette il mantenimento della contrazione per tempi lunghi fino a quando nuove fibre possono continuare a sostituire quelle affaticate.

1.1.6. Metabolismo energetico

La contrazione muscolare richiede un continuo apporto di energia. La principale fonte energetica cui il muscolo attinge durante la contrazione è costituita da molecole di ATP, presenti nel sarcoplasma in quantità limitate e, pertanto, continuamente consumate e rigenerate. La resintesi di ATP da parte del muscolo può aver luogo mediante tre differenti processi biochimici:

1. demolizione della *fosfocreatina*, che produce rapidamente modeste quantità di ATP, sufficienti a sostenere l'attività contrattile solo per breve tempo (meno di 10 sec di attività fisica alla massima potenza);
2. glicolisi anaerobica, meccanismo che metabolizza il glucosio ad acido lattico producendo soltanto tre moli di ATP per ogni mole di zucchero consumata;
3. *glicolisi aerobica* (conversione di glucosio in piruvato il quale, in presenza di adeguate quantità di ossigeno, entra nel *ciclo dell'acido citrico*), via metabolica che è di gran lunga la più redditizia dal punto di vista energetico, portando alla produzione di 36 moli di ATP per mole di glucosio.

A riposo e durante l'esercizio leggero, i muscoli scheletrici ricavano energia, oltre che dal glucosio, dagli acidi grassi (*β -ossidazione*), ragion per cui programmi di allenamento aerobico moderato (per es. camminare rapidamente), rappresentano un modo efficace per ridurre il grasso corporeo.

1.1.7. Fatica muscolare

La *fatica muscolare* è un complesso fenomeno multifattoriale, caratterizzato dall'impossibilità di assicurare ulteriormente un livello di forza atteso, durante una contrazione sostenuta o ripetuta (*Edwards, 1981*). La fatica muscolare può insorgere a causa dell'esaurimento acuto di taluni substrati energetici (fonti di ATP) a livello miofibrillare.

Nella attività fisica di potenza, di breve durata, in cui il muscolo scheletrico utilizza principalmente un metabolismo di tipo anaerobico, la causa principale di insorgenza della fatica è la deplezione di fosfocreatina. Durante l'attività di lunga durata, in cui il muscolo utilizza come fonte energetica quasi esclusivamente un metabolismo di tipo aerobico, la fatica muscolare insorge fondamentalmente in seguito ad esaurimento delle scorte muscolari di glicogeno.

Quando si compie uno sforzo isometrico sottomassimale per un lungo periodo di tempo, la sensazione che tale prestazione non potrà essere mantenuta indefinitamente, deriva al soggetto non tanto da un'effettiva incapacità, ad

esempio di sostenere un carico, quanto dalla necessità di aumentare progressivamente lo sforzo per poter realizzare il compito. La sensazione soggettiva di fatica precede la reale fatica muscolare, e deriva dalla *percezione dello sforzo* necessario per sostenere il carico, piuttosto che dalla forza effettivamente sviluppata.

1.2. Plasticità muscolare

Le fibrocellule muscolari, una volta differenziate, perdono la capacità di dividersi e il loro numero è pressoché stabile e definito nel tempo. Il tessuto muscolare, però, è caratterizzato dal possedere una notevole *plasticità* (capacità di modificare il fenotipo o le proprietà delle sue cellule), infatti, è soggetto a continui cambiamenti dovuti al processo di invecchiamento, alle richieste d'uso nonché a particolari regimi d'attività fisica variamente somministrati.

Con l'avanzare dell'età, si ha perdita di massa muscolare a causa della riduzione delle dimensioni e non del numero delle fibre muscolari. Tale fenomeno pare coinvolgere soprattutto le fibre di tipo II, mentre si assiste ad un incremento dell'area relativa delle fibre di tipo I. Il processo di invecchiamento, inoltre, comporta un aumento della quota connettivale con la

conseguente riduzione della forza prodotta per unità di area di sezione trasversa muscolare.

L'esposizione di un muscolo a disuso prolungato, per esempio a seguito di infortuni o patologie, determina notevole ipotrofia delle fibre di tipo I e IIa, più spesso attivate durante le attività giornaliere e, pertanto, maggiormente sensibili all'inattività.

In seguito a specifiche richieste d'uso, le fibre muscolari possono andare incontro a significative alterazioni morfologiche, biochimiche e funzionali. La risposta di adattamento delle fibre muscolari all'allenamento di resistenza (attività fisica che porti la frequenza cardiaca tra il 60 e l'80% del suo valore massimo per almeno 20-30 minuti) consiste principalmente in un incremento delle capacità metaboliche e della resistenza allo sforzo, che trae origine dall'aumento della densità mitocondriale e dell'attività di enzimi coinvolti in processi ossidativi.

Un allenamento di potenza (per es. il sollevamento pesi), intenso e regolare, caratterizzato da ripetizione di sforzi oltre l'80% della massima contrazione volontaria, promuove l'*ipertrofia* delle fibre muscolari che vengono attivate.

Durante l'allenamento anaerobico, il lavoro muscolare compiuto per sostenere e sollevare carichi di notevole entità, porta ad un aumento dell'area della sezione trasversa delle singole fibre muscolari, probabile risultato di un incremento della sintesi proteica. Sia il muscolo cardiaco che il muscolo scheletrico tendono ad adattarsi ad un regolare incremento del carico di lavoro,

attraverso l'accrescimento della propria massa. Il muscolo cardiaco diviene, così, in grado di pompare più efficientemente il sangue in circolo, il muscolo scheletrico, invece, acquisisce la capacità di generare maggiore forza durante la contrazione (*Russell et al., 2000*). Il muscolo che viene sovraccaricato aumenta il proprio diametro per mantenere una velocità di contrazione costante per carichi sempre maggiori. Nelle cellule muscolari soggette a stimoli di carico progressivo, inoltre, si accrescono i depositi di CP, ATP e glicogeno, modificazioni vantaggiose per l'esecuzione di sforzi brevi ma intensi, tipici dell'attività anaerobica. Le alterazioni a carico delle miofibrille si accompagnano alla produzione di nuovo tessuto connettivo a livello di tendini e legamenti, con conseguente irrobustimento e maggiore protezione nei confronti di carichi massimali. L'allenamento anaerobico di potenza, quindi, comporta un incremento di materia contrattile e di composti chimici ad alto contenuto energetico, non induce, invece, processi angiogenetici né alterazioni a carico dei mitocondri, organuli il cui lavoro di centrali energetiche, strettamente legato all'ossigeno, non è particolarmente stimolato dall'attività anaerobica. Dal punto di vista meccanico gli esercizi di potenza provocano un'innalzamento della velocità di produzione di forza durante le contrazioni isometriche e della potenza durante le contrazioni isotoniche.

2.1. Meccanismi molecolari coinvolti nella genesi dell'ipertrofia muscolare

Nel 1990, *De Vol* e collaboratori hanno dimostrato, in un modello sperimentale in vivo, che all'aumentare della sezione traversa dei muscoli soleo e plantare di ratto, si osserva un incremento dell'espressione del fattore di crescita IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), la cui somministrazione è, tra l'altro, sufficiente ad produrre ipertrofia del muscolo scheletrico di ratto. Inoltre, IGF-1 sembra avere un ruolo determinante nel prevenire, nel topo, l'atrofia muscolare causata dall'angiotensina II (*Song et al., 2005*). Studi recenti hanno indotto ad ipotizzare che IGF-1 promuova la genesi dell'ipertrofia muscolare attraverso l'innescamento della via di traduzione del segnale PI3K-Akt-mTOR:

- l'incubazione di miociti murini (C2C12) con IGF-1, infatti, induce l'attivazione di tale via citosolica (*Rommel et al., 2001*);
- cellule C2C12, transfettate con il gene codificante per la proteina Akt in forma attiva, appaiono ipertrofiche all'analisi fluocitometrica (*Rommel et al., 2001*).

La proteina mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) (*Kubica et al., 2005*) è una molecola di 290 KDa, così chiamata perché inibita dal macrolide *rapamicina*, antibiotico prodotto dal batterio *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina e i suoi derivati presentano un unico meccanismo d'azione che comporta l'interazione con una piccola molecola proteica dal peso di 12 KDa, nota come FKBP12 (*FK506-binding protein*) a formare un complesso che si va a legare ad mTOR, inibendola (*Bjornsti and Hughton, 2004*). La proteina

mTOR è una serin-treonin chinasi costituita da un dominio catalitico, un sito di legame per il complesso FKBP12-rapamicina ed un probabile dominio ad azione auto-inibitoria (*negative regulatory domain*) (Sekulic et al., 2000). Nelle cellule eucariotiche, mTOR forma due distinti complessi multimerici, mTORC1, sensibile all'azione inibitoria della rapamicina, ed mTORC2, che non è suscettibile di inattivazione a breve termine da parte del macrolide. Il complesso mTORC1 è responsabile della regolazione della sintesi proteica e si compone di mTOR, raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) ed GβL (Hara et al., 2002). Raptor è una grossa molecola di 150 KDa, che stabilisce interazioni multiple con mTOR e con suoi substrati (Kim et al., 2002); GβL, invece, è una proteina di 36 KDa, che si lega al dominio chinasi di mTOR, regolandone positivamente l'attività catalitica (Wullschleger et al., 2005). Il complesso mTORC2 è costituito da mTOR, GβL e da una proteina dal peso molecolare di circa 200 KDa, nota come rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*). La funzione fisiologica di mTORC2 non è ancora del tutto chiara, tuttavia l'ipotesi ad oggi più accreditata è che tale complesso moduli l'organizzazione dell'actina citoscheletrica (Jacinto et al., 2004).

La chinasi mTOR promuove la sintesi di nuove molecole proteiche mediante fosforilazione di due diversi substrati: 4E-BP1 (initiation factor 4E binding protein), e p70S6k (Gingras et al., 2001).

La proteina 4EBP1, nota anche come PHAS-1 (*proteina di tipo 1 fosforilata dal calore ed acido-stabile*), lega il fattore di inizio della traduzione eIF4E

rendendolo inattivo; a seguito di fosforilazione ad opera di mTOR, 4EBP1 si dissocia dal fattore eIF4E che, pertanto, può dare inizio al processo di traduzione (*Hara et al., 1997*).

La proteina p70S6k (70 KDa) è un membro della famiglia delle AGC chinasi, di cui fanno parte anche PKC, PKA, Akt, PDK1. L'attivazione di tale chinasi, sembra aver luogo attraverso una complessa serie di cambiamenti conformazionali e di reazioni di fosforilazione, secondo il seguente schema:

Step1: rottura del ponte intracatenario tra il dominio C-terminale e il dominio N-terminale di S6k1;

Step2: fosforilazione dei residui C-terminali Ser-411, Ser-418, Ser-424 e Thr-421;

Step3: fosforilazione della Thr-389 (dominio idrofobo) da parte dell'm-TOR;

Step4: fosforilazione del residuo Thr-229 da parte di PDK1 (*Jefferies et al., 1997*).

Una volta attivata, la chinasi p70S6k fosforila la proteina ribosomale S6 con conseguente trascrizione del gruppo degli m-RNA 5'-TOP (*Terminal Oligo-Pyrimidine*) che codificano fattori di allungamento necessari per la sintesi proteica (*Meyuhas et al., 2000*).

L'attività della proteina mTOR e dei suoi target è modulata da numerosi stimoli, quali fattori di crescita (IGF-1), nutrienti, stress ambientali (ipossia) (*Inoki et al., 2005*), ormoni (insulina, T₃, GH, testosterone) (*Hayashi e Proud, 2007; Kenessey e Ojamaa, 2006*) e secondi messaggeri (IP₃, Ca²⁺) (*Conus et*

al. 1998) (fig. 6). Va sottolineato che la comprensione dei meccanismi molecolari che inducono la genesi dell'ipertrofia muscolare è il presupposto necessario per lo sviluppo di farmaci e strategie terapeutiche da affiancare ai normali piani di riabilitazione motoria nel trattamento dell'ipotrofia del muscolo scheletrico, conseguente a patologie miasteniche o a disuso.

1.2.1.1. Fattori di crescita

Il legame del fattore di crescita IGF-1 al proprio recettore (*IGFR*) innesca una cascata enzimatica intracellulare lungo la quale si ha l'attivazione, tramite fosforilazione, della proteina PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) che porta alla formazione di IP₃ (*fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato*). Questi, a sua volta, fornisce un sito di legame alla membrana per la proteina Akt o PKB (*protein-chinasi B*), la quale viene quindi fosforilata da parte della chinasi PDK-1. Dopo essere stata attivata, la proteina Akt può fosforilare una serie di substrati, tra cui proteine che mediano la sintesi proteica, la trascrizione genica e la proliferazione cellulare.

Dati riportati in letteratura (*Goldspink et al., 2005*) suggeriscono che il processo che conduce all'ipertrofia muscolare potrebbe essere innescato da contrazioni rapide ed improvvise responsabili di microlesioni a carico delle fibrocellule muscolari. A ciò seguirebbero processi riparativi ad opera delle *cellule muscolari satellite*, cellule mononucleate totipotenti che rimangono in

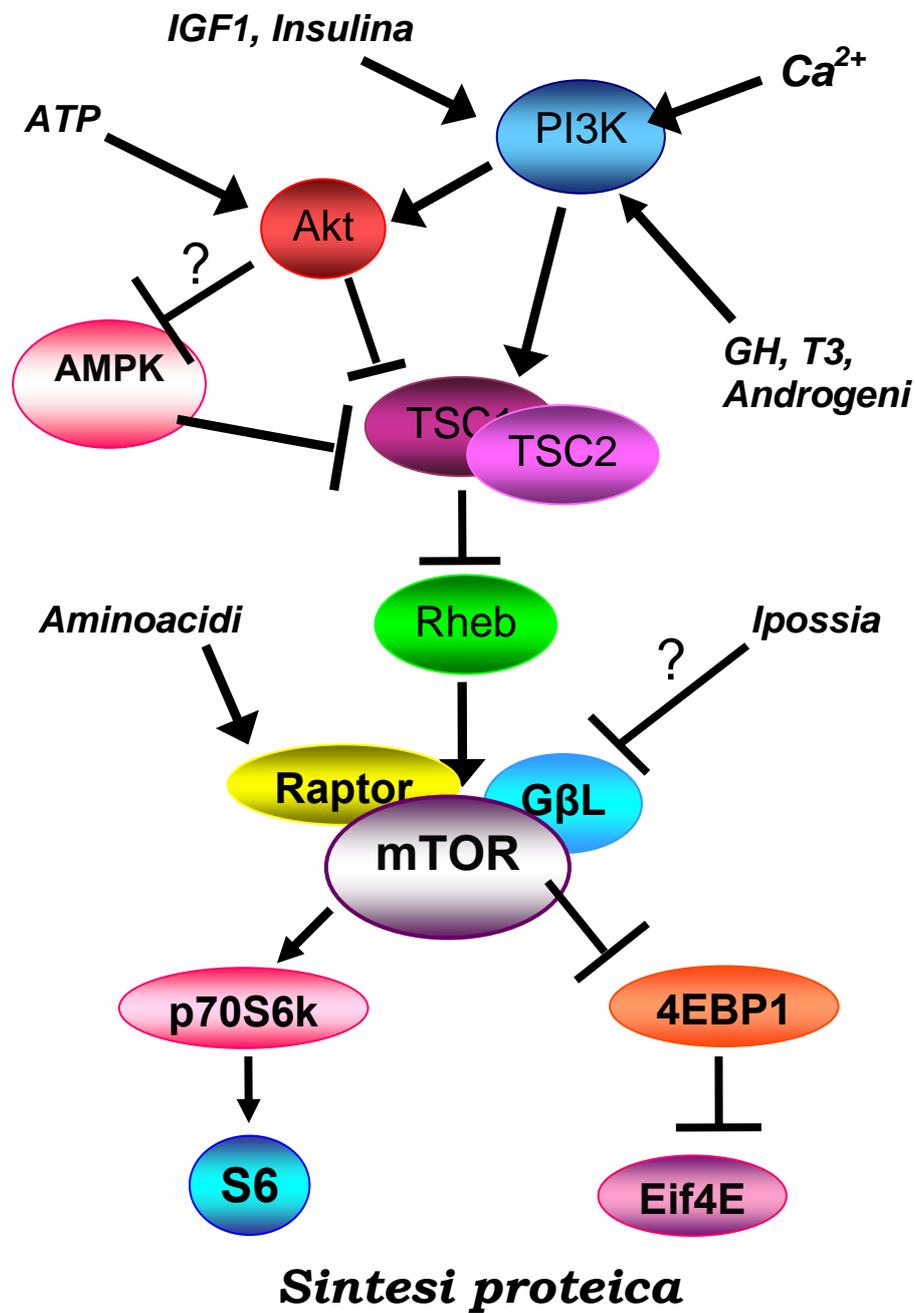


Fig. 6. L'attività della proteina mTOR e dei suoi target, p70S6k e 4EBP1, è modulata da numerosi stimoli, quali fattori di crescita (IGF-1), nutrienti, stress ambientali (ipossia), ormoni (insulina, T3, GH, testosterone) e secondi messaggeri (IP_3 , Ca^{2+}).

uno stato di quiescenza finché stimoli, tra cui anche stress meccanici, non ne determinino l'attivazione (*Hawhe et al., 2001*). Una volta attivate, le *cellule satellite* proliferano, generando mioblasti che differenziano e, fondendosi con le fibre muscolari lese, rigenerano cellule multinucleate. L'aumento del numero di nuclei permetterebbe a tali cellule di incrementare notevolmente la sintesi proteica, producendo nuove proteine contrattili (actina e miosina) e più recettori per agenti stimolanti quali gli androgeni (ormoni dalla nota azione anabolica). Questo insieme di processi contribuirebbe all'accrescimento della massa muscolare che si sviluppa in seguito ad allenamento. Tra i promotori dell'attivazione delle *cellule satellite* un posto di rilievo spetterebbe al fattore di crescita locale, MGF (*Mechano Growth Factor*), isoforma dell'IGF-1 espressa dalle cellule muscolari in risposta a stimoli meccanici (*Musarò et al., 2004*). Il suddetto fattore di crescita favorirebbe la riparazione del tessuto muscolare microleso, attraverso un'azione autocrina responsabile dell'attivazione delle *cellule satellite* (*Goldspink, 2005*) e del conseguente aumento dell'area della sezione trasversa del muscolo. La perdita di massa muscolare che si osserva nell'invecchiamento (*Owino et al., 2001*) e in patologie, come la distrofia muscolare di Deuchenne, sarebbe, invece, caratterizzata dalla incapacità di produrre MGF in risposta a stimoli meccanici (*Goldspink e Yang, 2001*) (*Goldspink, 2005*).

Per spiegare il *modus operandi* dell'IGF-1 (o dell'isoforma MGF), sono state avanzate due ipotesi:

A) mobilitazione del calcio e attivazione della via di trasduzione del segnale calcineurina-dipendente con induzione del fattore di trascrizione NFAT (*Musarò et al., 1999*);

B) legame con uno specifico recettore di membrana (IGFR) dotato di attività tirosin-chinasica, fosforilazione della proteina IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*) e innesco della via di trasduzione del segnale PI3K/Akt/mTOR (*Rommel et al., 1999*).

I risultati ottenuti mediante esperimenti condotti su mioblasti C2C12, derivanti da cellule satellite di topi adulti, transfettate con un plasmide codificante l'IGF-1 (*Semsarian et al., 1999*), hanno indotto ad ipotizzare che l'IGF-1 possa innescare la mobilitazione del calcio intracellulare mediante attivazione della calcineurina. La calcineurina è una serin-treonin fosfatasi calcio-dipendente, composta da due subunità: 1) Calcineurina-A (Cn-A; 58-64 kDa), ad azione catalitica, contenente un sito di legame alla calmodulina; 2) Calcineurina-B (Cn-B; 19 kDa), subunità regolatrice, che lega quattro ioni calcio (uno con alta affinità e tre con bassa affinità).

Il legame del calcio al complesso calmodulina-calcineurina, stimola l'attività serin-treonin fosfatasi della calcineurina A che va a defosforilare il fattore nucleare NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*), promuovendo la sua traslocazione nel nucleo. Una volta nel nucleo, NFAT si lega a specifiche sequenze di DNA, stimolando la trascrizione di mRNA e la sintesi di nuove proteine (*Alferi et al., 2007*).

Dati sperimentali (*Rommel et al., 2001*), ottenuti aggiungendo, a cellule muscolari C2C12 in coltura dosi di IGF-1 (10 ng/ml) sufficienti ad indurre un aumento del diametro dei miotubi, hanno evidenziato:

a) iperfosforilazione di NFAT (indice della probabile inibizione della calcineurina); b) attivazione della via di trasduzione del segnale PI3K-Akt-mTOR, anche in presenza di ciclosporina A (specifico inibitore della calcineurina) nel mezzo di coltura. Inoltre, è stato osservato che l'inattivazione farmacologica di PI3K con LY294002 [2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one] chiamato anche PI3K-Inhibitor determina una moderata atrofia dei miotubi, mentre l'attivazione IGF1-dipendente di PI3K comporta fosforilazione di Akt. Tali risultati suggeriscono che l'induzione dell'ipertrofia muscolare ad opera di IGF-1, possa aver luogo attraverso un meccanismo d'azione *calcineurina-indipendente*, che porta all'attivazione di mTOR attraverso la via PI3K-Akt. La chinasi Akt, infatti, mediante fosforilazione ed inattivazione dell'eterodimero amartina-tuberina o TSC1-TSC2 (*tuberous sclerosis complex 1-tuberous sclerosis complex 2*) (*Dan et al., 2002*), promuoverebbe la diretta attivazione di mTOR ad opera della proteina GTPasica Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) (*Tee et al., 2002*). È stato osservato, infatti, che la mancata funzionalità del complesso TSC e la sovraespressione di Rheb inducono, in cellule di mammifero, iperfosforilazione di p70S6k e 4EBP1 anche in assenza di fattori di crescita o in presenza di wortmannina (*Inoki et al., 2002; Goncharova et al., 2002*).

1.2.1.2. Nutrienti: Aminoacidi

La proteina mTOR, come precedentemente descritto, è presente nel citosol stabilmente legata alle proteine Raptor e GβL (mTORC1) (Kim *et al.*, 2002) (Kim *et al.*, 2003). Studi condotti su cellule di mammifero suggeriscono che, il complesso mTORC1 possa agire da sensore dei livelli intracellulari di nutrienti: in assenza di aminoacidi (in particolare leucina), tale complesso andrebbe incontro ad una variazione conformazionale che precluderebbe la chinasi mTOR dal fosforilare i suoi substrati (Kim *et al.*, 2002, 2003); al contrario, in presenza di aminoacidi, lo stesso complesso proteico subirebbe una modificazione tridimensionale tale da promuovere un'efficiente interazione tra raptor ed i substrati di mTOR, favorendone la fosforilazione ad opera della chinasi (Kim *et al.* 2002, 2003).

1.2.1.3. Ipossia

Le cellule, generalmente, rispondono a stress ambientali, quali condizioni di ipossia, rallentando i processi biochimici ad elevata richiesta energetica ed arrestando la propria crescita.

I dati presenti in letteratura relativi agli effetti esercitati dall'ipossia sulla proteina mTOR sono alquanto contrastanti. Studi condotti in *Drosophila* ed in fibroblasti di topo (Brugarolas *et al.*, 2004; Reiling e Hafen, 2004) hanno messo in evidenza che, in condizioni ipossiche, si ha inibizione della proteina

mTOR ed ipofosforilazione di p70S6k e 4EBP1 a cui si accompagna una significativa diminuzione della sintesi proteica. In altri studi, è stato anche osservato che un ridotto apporto di ossigeno induce attivazione di mTOR promuovendo processi angiogenetici (*Bernardi et al., 2006*), proliferazione di fibroblasti polmonari (*Gerasimovskaya et al., 2005*) e di cellule muscolari lisce vasali (*Humar et al., 2002*) ed incrementando l'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor*) e la sintesi di proteine (*Hudson et al., 2002*). I meccanismi attraverso cui l'ipossia influenza l'attività serin/treonin chinasi di mTOR, tuttavia, non sono ancora stati chiariti.

1.2.1.4. Livelli energetici

La traduzione di molecole di *RNA-messaggero* (mRNA) e la biogenesi ribosomale, due eventi biochimici strettamente correlati all'attività della proteina mTOR, implicano il consumo di elevate quantità di energia. Ciò induce ad ipotizzare che l'azione di mTOR possa, in qualche modo, dipendere dallo stato energetico cellulare (*Dennis et al 2001*). In cellule epatiche di ratto, l'attivazione di mTOR, indotta per aggiunta di insulina al mezzo di coltura, viene inibita se si riducono i livelli intracellulari di ATP mediante l'utilizzo di bloccanti della glicolisi o della respirazione mitocondriale (*Dennis et al., 2001*).

In altri esperimenti, è stato osservato che la diminuzione della concentrazione intracellulare di ATP comporta un significativo incremento dell'attività di AMPK (5' *AMP-activated protein kinase*) ed ipofosforilazione di p70S6k (*Hardie et al., 1998; Kimura et al., 2003*). Dall'analisi di tali dati è emersa la convinzione che AMPK agisca da sensore della caduta di risorse energetiche intracellulari, andando a fosforilare substrati, quali TSC2, in grado di inibire mTOR (*Inoki et al., 2003*). Ciò nonostante, non è da escludere l'eventualità che la concentrazione intracellulare di ATP possa influire sull'attività di mTOR attraverso meccanismi alternativi.

1.2.1.5. Ormoni

A livello cellulare la via di trasduzione del segnale di mTOR è regolata dalla presenza di numerosi ormoni, quali l'insulina, l'ormone della crescita, gli ormoni tiroidei ed ormoni steroidei tra cui gli androgeni.

L'insulina è una piccola proteina dal peso molecolare di circa 6 KDa, secreta dalle cellule β del pancreas, che interagisce con un recettore di membrana ad attività tirosinchinasica, stimolando o inibendo una serie di substrati intracellulari i quali mediano la risposta biologica all'ormone. L'insulina svolge un ruolo chiave nel controllo del metabolismo di carboidrati e lipidi, e regola l'utilizzo di proteine e minerali. Tale ormone, infatti, promuove l'ingresso del glucosio nel muscolo, nel tessuto adiposo ed in altri tessuti;

stimola la conversione di glucosio a glicogeno (fegato, muscolo scheletrico); favorisce la sintesi di trigliceridi (adipociti); incrementa la permeabilità di membrana per diversi ioni; facilita l'assorbimento degli aminoacidi, aumentando la sintesi di proteine. Da studi sperimentali condotti da *Wang et al.* (2006), su colture di adipociti 3T3-L1, è emerso che l'insulina attiva l'asse PI3K-Akt-mTOR, favorendo la fosforilazione di 4EBP1 e la conseguente sintesi proteica. Tale effetto si è rivelato essere *rapamicina-sensibile* e, pertanto, mediato dal complesso mTORC1. Gli stessi ricercatori ipotizzano, inoltre, che l'inattivazione di 4EBP1, indotta da concentrazioni fisiologiche dell'ormone, abbia luogo attraverso la formazione di un omodimero di mTORC1 (struttura proteica contenente due eterotrimeri di mTOR, raptor ed mLST8).

L'ormone della crescita o GH (*Growth Hormone*), è un polipeptide sintetizzato e secreto dalle cellule somatotrope dell'adenipofisi, che promuove lo sviluppo di cellule e tessuti (muscolo scheletrico e cartilagine), stimolando la sintesi di nuove proteine. *Hayashi e Proud*, nel 2007, hanno dimostrato che, in cellule di epatoma (H4IIE), il GH induce la rapida produzione di molecole proteiche, mediante attivazione PI3K-dipendente del complesso rapamicina-sensibile mTORC1 che determina fosforilazione delle proteine p70S6k e 4EBP1.

Gli ormoni tiroidei, triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄), vengono prodotti dalle cellule follicolari della tiroide. Tali ormoni regolano il normale sviluppo del

SNC e dello scheletro nel feto e nel periodo post-natale; aumentano il consumo di ossigeno a riposo, innalzando il metabolismo basale e la produzione di calore; favoriscono la glicogenolisi e la gluconeogenesi; incrementano la sintesi proteica, la lipolisi e la produzione endogena di altri ormoni (GH); aumentano la frequenza cardiaca, la motilità intestinale, il flusso renale e la filtrazione glomerulare.

Gli ormoni tiroidei esercitano le suddette funzioni per attivazione di un recettore nucleare (proteina nucleare non istonica appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari, caratterizzata da tre domini funzionali: un dominio di *transattivazione*, un dominio di *legame al DNA* e un dominio di *interazione con il ligando*) che agisce regolando la trascrizione di alcuni geni bersaglio, o attraverso un meccanismo “non genomico” che induce l’attivazione diretta e rapida di proteine intracellulari (*Zhang e Lazar, 2000*). E’ ben documentato (*Crie et al., 1983; Huang et al., 2000*) che gli ormoni tiroidei causano ipertrofia cardiaca; non sono stati ancora chiariti, però, i meccanismi molecolari responsabili di tale fenomeno. Secondo dati pubblicati di recente (*Kenessey e Ojamaa, 2006*), la triiodotironina indurrebbe l’accrescimento della massa muscolare cardiaca, formando un complesso con uno specifico recettore citosolico (TR α 1). A ciò seguirebbe, infatti, la rapida attivazione del sistema PI3K-Akt-mTOR, con significativo aumento della fosforilazione di p70S6k e 4EBP1.

Gli androgeni, (testosterone, diidrotestosterone e androstenedione), responsabili dello sviluppo dei caratteri sessuali maschili, determinano, tra l'altro, l'incremento della massa muscolare, durante la pubertà.

Come gli altri steroidi, il testosterone in forma libera, attraversa il doppio strato fosfolipidico, entrando nel compartimento intracellulare dove si va a legare ad un recettore citoplasmatico associato ad un dimero di **hsp90** (*heat shock protein*) (proteina dal peso molecolare di 90 kDa, che si forma quando le cellule sono sottoposte a stimoli nocivi, quali le elevate temperature) che lo stabilizza (Fang *et al*; 1996). Il legame dell'ormone al recettore ne altera la conformazione, determinando il rilascio nel citosol delle proteine da shock termico. Il complesso ormone-recettore migra nel nucleo dove forma omodimeri che si legano a specifiche sequenze nucleotidiche, definite *elementi responsivi agli androgeni* (ARE), presenti sui promotori di vari geni, regolando la loro trascrizione.

In virtù dell'azione trofica sulla muscolatura corporea, il testosterone e, più frequentemente, qualche androgeno sintetico vengono illecitamente impiegati da alcuni atleti nella convinzione di poter migliorare le prestazioni sportive. Gli androgeni esercitano i propri effetti anabolizzanti probabilmente mediante stimolazione della sintesi di proteine, riduzione della degradazione proteica e riutilizzazione degli aminoacidi derivanti dai processi catabolici (Bhasin *et al.*, 2003). Tuttavia, i meccanismi molecolari attraverso cui il testosterone incrementa la massa muscolare scheletrica sono, ad oggi, ancora poco noti.

Gli androgeni promuovono la proliferazione e la differenziazione di cellule mesenchimali pluripotenti appartenenti al tessuto muscolare ed il suddetto fenomeno è inibito dalla bicalutamide (*antagonisti del recettore per gli androgeni*) (Singh et al., 2003). Queste osservazioni hanno indotto ad ipotizzare che, probabilmente, anche le cellule muscolari satellite esprimano i recettori androgenici e che il testosterone, pertanto, possa indurre l'aumento della massa muscolare favorendo la differenziazione di tali cellule in miociti (Sinha-Hikim et al., 2004).

Nel 2006, Xu e collaboratori, sono giunti alla conclusione che la stimolazione con DHT (*diidrotestosterone*) di cellule tumorali prostatiche transfettate con un plasmide contenente il gene che codifica per la proteina Akt in forma attiva, determina un aumento dell'attività chinasi di mTOR, non per mezzo di un meccanismo Akt-dipendente, bensì di tipo genomico. Secondo tale ipotesi, il complesso ormone-recettore, indurrebbe la trascrizione di geni codificanti proteine in grado di incrementare l'assunzione di nutrienti da parte della cellula, favorendo l'attivazione di mTOR.

Studi condotti su cellule muscolari incubate in presenza di testosterone (Estrada et al., 2000) (Estrada et al., 2005), hanno evidenziato che, in tali condizioni sperimentali, si ha un rapido e temporaneo incremento dei livelli intracellulari di inositolo trifosfato (IP₃) e ioni calcio, effetto che persiste qualora si addiziona un antagonista androgenico, come il ciproterone, al mezzo di coltura. Pertanto, sulla base di questi risultati, è stato supposto che la sintesi

di nuove proteine, indotta dal testosterone in cellule muscolari scheletriche, possa aver luogo attraverso meccanismi mediati da secondi messaggeri (ad esempio IP₃, Ca²⁺) (*Estrada et al., 2005*).

1.2.1.6. Calcio

Lo ione calcio è un importante mediatore implicato in molteplici eventi fisiologici quali la conduzione nervosa e la contrazione muscolare (*Szent-Gyorgyi, 1975*).

Il calcio è normalmente presente nel citoplasma alla concentrazione di 10⁻⁷-10⁻⁶ M. I livelli citosolici di calcio possono aumentare per attivazione di specifici canali ionici localizzati nella membrana plasmatica, o a seguito del rilascio di questo ione da depositi intracellulari (ad es. reticolo sarcoplasmatico, calmodulina, etc.).

Nel tessuto muscolare sono presenti, a livello della membrana sarcolemmale, canali del calcio *voltage-dipendenti di tipo L*. Tali canali sono caratterizzati da lunga durata di apertura, elevata conduttanza ed alta soglia di attivazione; inoltre, sono sensibili all'azione bloccante di *calcio-antagonisti*, quali la nifedipina (*Liu et al., 2007*).

Nel muscolo striato, il *reticolo sarcoplasmatico* (RS) rappresenta un deposito intracellulare di calcio a rapido rilascio, contenente numerose proteine deputate

all'accumulo ed alla liberazione dello ione Ca^{2+} (pompe del calcio, canali ionici intracellulari).

Le *pompe del calcio* sono ATPasi, note come SERCA (*Sarcoplasmic-Endoplasmatic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*), che trasportano 2 ioni calcio per ogni molecola di ATP idrolizzata. Le SERCA sono il prodotto di geni diversi da quelli codificanti per le pompe Ca^{2+} -ATPasiche della membrana plasmatica, dalle quali differiscono in quanto suscettibili di inattivazione ad opera di sostanze come l'acido ciclopiazonico (*Moncoq et al., 2007*).

I canali ionici intracellulari o CRC (Ca^{2+} release channels) (rianodina-sensibili ed IP_3 -dipendenti) (*Berridge MJ, 1993; Mackrilli JJ, 1999*) consentono la messa in comunicazione diretta delle cisterne del reticolo sarcoplasmatico con il citosol circostante.

L'accesso alle scorte intracellulari di calcio è controllato da agenti quali secondi messaggeri come l'inositolo trifosfato (IP_3) (*Berridge e Irvine, 1989*) o lo stesso ione calcio (*Fabiato A, 1983*).

Recenti osservazioni sperimentali (*Hannan et al., 2003*) suggeriscono che l' IP_3 ed il calcio svolgano un ruolo rilevante nella modulazione della via di trasduzione del segnale PI3K-Akt-p70S6k. In fibroblasti Balb/c-3T3, sottoposti a trattamento con EGF (*Epidermal Growth Factor*), si ha attivazione delle chinasi Akt e p70S6k. Incubando le stesse cellule con EGF in presenza di EGTA (chelante del calcio), la fosforilazione EGF-dipendente della proteina Akt non viene modificata, mentre l'attivazione di p70S6k sembra essere

completamente inibita (*Conus et al., 1998*). L'aumento dei livelli intracellulari di calcio indotti con tapsigargina (specifico inibitore della calcio-ATPasi del reticolo endoplasmatico), non comportano alcuna variazione significativa a carico della chinasi Akt ma determinano aumenti considerevoli dei livelli di p70S6k fosforilata. Tale effetto, però, non si evidenzia qualora si addiziona al terreno di coltura la wortmannina, un inibitore selettivo di PI3K (*Conus et al., 1998*). Tali risultati sono stati interpretati ipotizzando che, a seguito di incrementi della concentrazione citosolica di calcio, l'attivazione della proteina p70S6k, ad opera della chinasi mTOR, sia indotta da PI3K attraverso una modalità Akt-indipendente (*Conus et al., 1998*).

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Per identificare gli eventi intracellulari responsabili dello sviluppo, così come del mantenimento, dell'ipertrofia muscolare, sino ad oggi, sono stati utilizzati svariati modelli sperimentali, quali l'elettro-stimolazione (*Baar ed Esser, 1999*), la transfezione (*Bodine et al., 2001*), esercizi di potenza (*Bolster et al., 2003; Kubica et al., 2005*) e la somministrazione di fattori di crescita o di alcuni ormoni in animali o cellule (*Hayashi e Proud, 2007*). I risultati così ottenuti hanno permesso di attribuire a specifiche proteine citoplasmatiche

(PI3K, mTOR, p70S6k e 4EBP1) un ruolo cruciale per l'accrescimento della massa muscolare.

Baar ed *Esser*, nel 1999, hanno evidenziato che intense contrazioni del muscolo tibiale anteriore di ratto, indotte mediante l'elettro-stimolazione del nervo sciatico, alla frequenza di 100 Hz, due volte alla settimana, per sei settimane, causano aumento della fosforilazione di p70S6k che raggiunge un massimo d'attivazione a 6 ore dalla stimolazione, mentre a fine trattamento, si osserva un incremento del diametro muscolare pari al 14% del relativo controllo.

Altri studi *in vivo* (*Bodine et al., 2001*) hanno dimostrato che l'attivazione della cascata Akt-mTOR indotta per iniezione, nelle fibrocellule del muscolo tibiale anteriore di topo, di un costrutto genetico progettato per esprimere la chinasi Akt in forma attiva, promuove l'aumento dell'area della sezione trasversa delle fibre muscolari ed impedisce lo sviluppo dell'atrofia del muscolo tibiale conseguente alla recisione del nervo sciatico.

Recentemente, *Bolster* (2003) e *Kubica* (2005) hanno condotto interessanti esperimenti, utilizzando un modello animale in cui ratti Sprague-Dawley maschi venivano addestrati a stare in piedi sulle zampe posteriori e a toccare una sbarra luminosa posta in alto sulla parete di una gabbia di plexiglass. Il protocollo d'esercizio consisteva di quattro sessioni intervallate da 1 giorno di riposo; in ogni sessione gli animali eseguivano 50 ripetizioni con carichi progressivi. Dopo l'ultima sessione di esercizi, i ratti venivano sacrificati a

tempi diversi e, quindi, sottoposti ad espianto del muscolo gastrocnemio. L'analisi degli omogenati del tessuto muscolare ha messo in evidenza che nel periodo di riposo (5, 10, 15, 30 e 60 min) che fa seguito all'allenamento di potenza, la fosforilazione delle proteine PI3K, mTOR, p70S6k e 4EBP1 aumenta significativamente rispetto ai controlli, raggiungendo un picco a 10 minuti dal termine della fase di attività fisica; a ciò si accompagna un rilevante incremento della sintesi proteica documentato dalla massiva incorporazione di ³H-fenilalanina nelle proteine estratte dal muscolo gastrocnemio di ratti sacrificati a 16 ore dalla fine dell'esercizio.

Dai vari studi che utilizzano i modelli sperimentali descritti, non si evince quali siano i meccanismi che permettono l'accrescimento della massa muscolare conseguente ad allenamento di potenza.

Goldspink (2005) e *Rommel* (2001) sostengono che, nel corso degli esercizi fisici, contrazioni rapide ed improvvise provocano stress meccanici a carico del muscolo scheletrico, promuovendo il rilascio di fattori autocrini e paracrini, quali IGF-1 ed MGF, responsabili dell'innescamento della cascata PI3K-Akt-mTOR-p70S6k. Tale meccanismo, però, è presumibilmente coinvolto nella risposta del muscolo a sforzi estremi, causa di microlesioni che innescano processi riparativi ad opera delle cellule muscolari satellite.

Non è da escludere che, più probabilmente, la rapida e temporanea attivazione di mTOR (*Bolster et al., 2003*), che ha luogo a seguito di esercizi di potenza, possa essere il risultato delle variazioni metaboliche, come la riduzione del

pool energetico intracellulare, che si verificano nel muscolo durante l'attività fisica. Dati riportati in letteratura suggeriscono che l'azione serin/treonin chinasi di mTOR dipenda dalla concentrazione intracellulare di ATP (*Dennis et al., 2001*) e dall'attività di AMPK (*Inoki et al., 2003*), la quale, in seguito alla caduta di risorse energetiche intracellulari, andrebbe a fosforilare TSC2, inibendo mTOR. Nel 2005, *Hahn-Windgassen et al.* hanno dimostrato, in fibroblasti di topo (MEF), che Akt può attivare mTOR, mediante inibizione di AMPK. Infatti, cellule MEF in cui il gene codificante per Akt è stato silenziato, presentano incrementi dell'attività di AMPK; al contrario, in fibroblasti transfettati con il gene codificante per Akt in forma attiva, si osserva inibizione di AMPK ed attivazione di mTOR. Dall'analisi dei suddetti risultati è plausibile ipotizzare che Akt possa agire da sensore della diminuzione della concentrazione intracellulare di ATP, che ha luogo durante esercizi fisici di tipo anaerobico, promuovendo l'attività di mTOR attraverso l'inibizione di AMPK.

Da quanto esposto appare evidente che vi siano ipotesi controverse riguardo le possibili cause e meccanismi che determinano l'aumento di massa muscolare. Nondimeno, tutti concordano sull'attribuire ad mTOR un ruolo chiave nell'induzione della sintesi proteica responsabile di ipertrofia muscolare, l'obiettivo di questa tesi sarà quello di far luce sui meccanismi che portano all'attivazione della chinasi, allestendo un modello sperimentale *in vitro*, che non sia meccanicamente sollecitato e che si presti a mimare le condizioni

metaboliche presenti nel muscolo durante gli allenamenti di potenza. Pertanto, si valuterà

- 1) la probabile attivazione della via mTOR-p70S6k a seguito di sottrazione di nutrienti in miociti ed in colture di cellule di origine non muscolare;
- 2) l'espressione delle suddette chinasi in seguito ad esposizione a testosterone (noto agente ad azione anabolizzante);
- 3) l'effetto della diminuzione del pool energetico intracellulare sulla neosintesi di proteine;
- 4) il possibile ruolo esercitato dal calcio nell'attivazione della via citosolica mTOR-p70S6k.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Sostanze chimiche

Per la preparazione delle soluzioni adoperate negli esperimenti, erano usati normali reagenti di laboratorio ad elevato grado di purezza.

Le sostanze chimiche di uso specifico sono state acquistate da varie case produttrici come di seguito riportato: DMEM, FBS, HEPES e miscela penicillina-streptomina (Cambrex Bio Science, Belgium); rapamicina e wortmannina (LC Laboratories, USA); L-[4,5-³H]leucina (GE Healthcare, UK); testosterone enantato (Schering AG, Germany); flutamide e ciproterone acetato (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); verapamil, nifedipina e acido ciclopiazonico (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); rianodina (TOCRIS bioscience, USA); kit per il saggio di bioluminescenza (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); inibitori delle proteasi (Roche Applied Science); membrana di nitrocellulosa (Hybond ECL Nitrocellulose, GE Healthcare, UK); Ponceau-S (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); anticorpo primario per la miogenina (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-PmTOR e anti-Pp70S6k (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-P4EBP1 (Santa Cruz Biotechnology, USA); anticorpi secondari (Dako Cytomation, Danimark); kit per la chemiluminescenza (Amersham Pharmacia, UK); anti- β -actina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

3.2. Colture cellulari

3.2.1 Cellule muscolari

Mioblasti di embrione di ratto (linee L6 ed H9c2) erano coltivati per 3-4 giorni, a 37°C, in aria mescolata a CO₂ al 5%, in terreno di coltura Eagle modificato secondo Dulbecco (DMEM) con aggiunta di siero bovino fetale (FBS) al 10%, HEPES (acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico) 25 mM, penicillina 100 Unità/ml e streptomomicina 100 µg/ml.

Allo stato di sub-confluenza, le cellule *mioblastiche* venivano poste in mezzo a basso contenuto di siero (1%) per promuovere il loro differenziamento in *miociti* (Sato et al, 1991; Pagano et al., 2003). Dopo circa 6 giorni, in tale terreno di coltura, le cellule L6 ed H9c2 apparivano, all'analisi morfologica, non più di forma tondeggianti (*mioblasti*), bensì sottili, allungate e organizzate in sincizi multinucleati (*miotubi*). L'avvenuto differenziamento in miociti delle cellule L6 ed H9c2 così trattate, veniva confermato dall'incrementata espressione intracellulare della proteina miogenina (fig. 7), fattore di trascrizione che svolge un ruolo essenziale nella differenziazione dei mioblasti in cellule muscolari scheletriche.

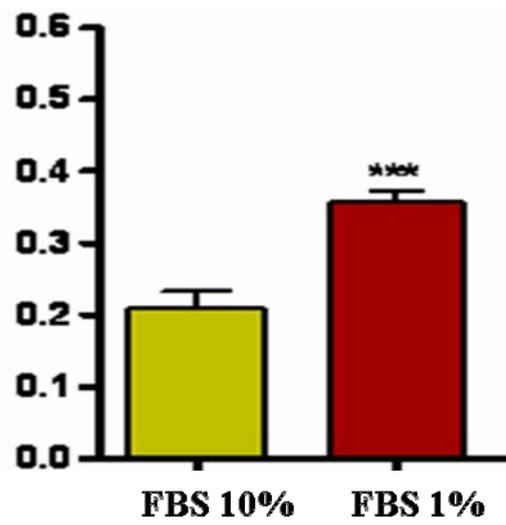
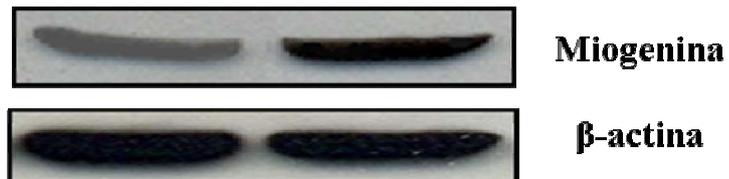


Fig. 7. Aumento dei livelli di *miogenina* in cellule H9c2 ed L6 coltivate in DMEM con FBS 1% v/v.

3.2.2. Cellule di origine non muscolare

Linee cellulari non muscolari, cioè di cervice uterina (HeLa), fibroblastiche (3T3-L1), intestinali (CaCo-2) e gliali (C6), venivano coltivate nelle stesse condizioni utilizzate per le cellule di origine muscolare..

3.3. Modello sperimentale

Le cellule muscolari (L6 e H9c2) differenziate erano poste per 30, 60, 120 e 180 min, in aerobiosi, a 37°C, in mezzo privo di glucosio (inducendo la riduzione della [ATP] da 5,2 mM a 0,9 mM); successivamente alle stesse cellule veniva riaddizionato il glucosio, alla concentrazione di partenza, per 4 ore, al fine di ripristinare il normale apporto di nutrienti. In altri esperimenti le cellule muscolari venivano esposte a rimozione del glucosio dal terreno di coltura in presenza o meno di rapamicina 20 nM o wortmannin 100 nM. Alla fine delle due ore di deplezione del glucosio, l'apporto energetico ai miociti veniva ricostituito, incubando tali cellule, per 3, 6 e 12 ore, in terreno di coltura standard, contenente 15 µl/ml di L-[4,5-³H]leucina. In ulteriori esperimenti, alcuni miociti venivano mantenuti, per due ore, in mezzo di coltura, con o senza glucosio, previa aggiunta di testosterone enantato a varie concentrazioni (10^{-9} - 10^{-5} M), in presenza o assenza di un antagonista del recettore androgenico (AR) (flutamide o ciproterone acetato 10^{-5} M) rapamicina (20 nM) o wortmannin (100 nM).

Gli effetti del ridotto apporto energetico o del testosterone venivano valutati, inoltre, in cellule muscolari poste, per due ore, in mezzo addizionato di verapamil, nifedipina, acido ciclopiazonico o rianodina, alla concentrazione finale di 10^{-5} M.

Successivamente, venivano esposte a condizioni di impoverimento energetico (2 ore, in aerobiosi, a 37°C, in mezzo privo di glucosio) mioblasti o linee cellulari di origine non muscolare.

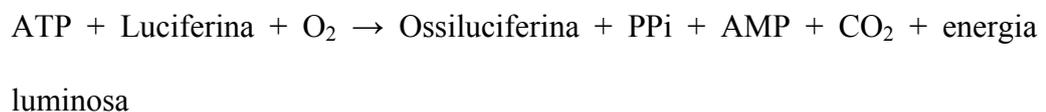
3.4. Preparazione degli estratti citoplasmatici

Le cellule sottoposte ai trattamenti precedentemente descritti, venivano lavate con PBS (contenente EDTA 1 mM e raccolte dopo centrifugazione. Successivamente i pellets cellulari venivano lisati a 4°C utilizzando un tampone di lisi (Hepes 20 mM pH 7.5, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 40 mM, glicerolo 20%, ditiotreitolo (DTT) 1 mM, Nonidet P-40 (NP-40) 1%, PMSF 0.5 Mm, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM e NaF 50 mM) contenente una miscela completa di inibitori delle proteasi. I nuclei ed i residui di membrane erano allontanati mediante centrifugazione a 13000 rpm a 4°C per 10 minuti, e il supernatante veniva aliquotato e conservato a -80°C.

La concentrazione proteica era determinata mediante saggio colorimetrico, secondo il metodo di Bradford (*Bradford, 1976*), utilizzando il “Bio-Rad protein assay”.

3.5. Misura dell'ATP

I livelli intracellulari di ATP venivano determinati sulle frazioni citosoliche mediante saggio di bioluminescenza. Tale metodo (*Leach et al., 1981*) utilizza l'enzima luciferasi che catalizza, in presenza di ATP, la decarbossilazione ossidativa della luciferina, producendo un segnale luminoso la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di ATP (fig. 8).



La luminescenza veniva misurata per mezzo di un luminometro (EG&G Berthold, USA). A 100 µl di campione venivano aggiunti 100 µl di soluzione contenente l'enzima luciferasi. Dopo rapida agitazione del campione, veniva immediatamente misurato lo spettro temporale di intensità dell'emissione luminosa mediante il luminometro. I risultati, espressi in percentuale rispetto ai valori delle cellule di controllo, erano normalizzati per numero di cellule.

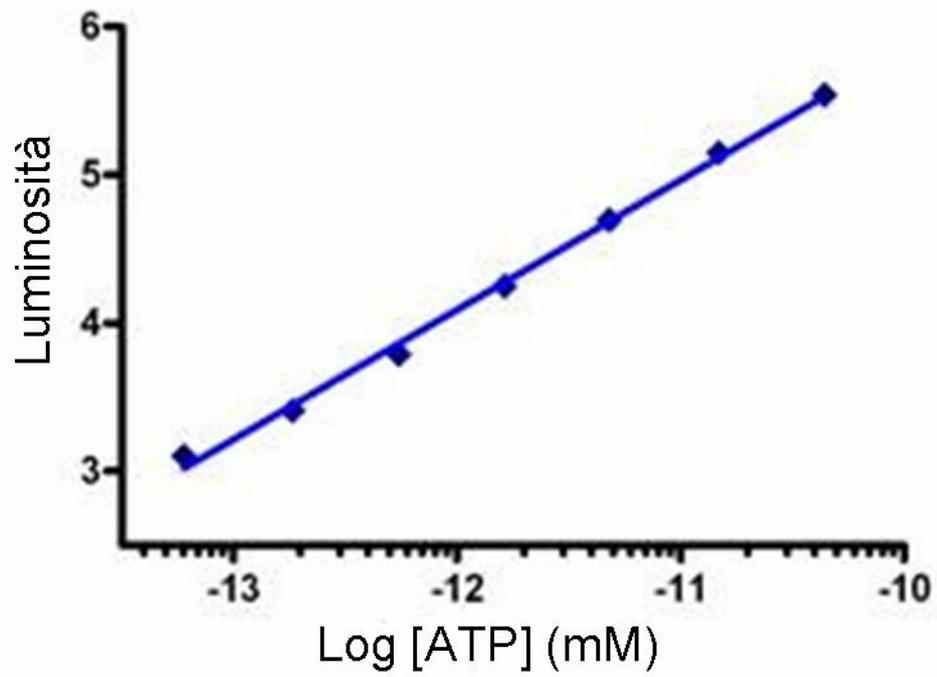


Fig. 8. Il saggio di bioluminescenza utilizza l'enzima luciferasi che, in presenza di ATP, catalizza la decarbossilazione ossidativa della luciferina, producendo un segnale luminoso la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di ATP

3.6. Western Blot

Aliquote di lisati contenenti 50-100 µg di proteine erano denaturate, separate su gel di SDS-poliacrilammide (8-10%) e trasferite su membrane di nitrocellulosa, usando un'unità per elettrotrasferimento (Transblot SD, Bio-Rad Laboratories, Italia) e un tampone costituito da glicina 3.9 mM, TRIS 4.8 mM, metanolo 20%, ed SDS 0.0037%. Il filtro di nitrocellulosa veniva poi colorato con una soluzione di Ponceau-S per verificare l'uniforme trasferimento delle proteine. I filtri erano bloccati in milk buffer (10% non fat dry milk, NaF 50 mM e TBS-T costituito da 2mM TRIS-HCl, 50mM NaCl, e 0.1% Tween 20) per 1 ora a temperatura ambiente e poi incubati per tutta la notte a 4°C con un anticorpo primario specifico per la miogenina (diluizione 1:100), oppure per la forma fosforilata delle proteine mTOR, p70S6k e 4EBP1 (diluizione 1:250). Successivamente, le membrane erano incubate per 90 minuti con anticorpi secondari specifici coniugati con l'enzima per ossidasi. I complessi antigene-anticorpo venivano visualizzati mediante un sistema di chemiluminescenza e successiva autoradiografia. La densità ottica delle bande era determinata utilizzando il densitometro GS-700 (Bio-Rad Laboratories, Italia). La normalizzazione dei risultati veniva effettuata incubando in parallelo le membrane di nitrocellulosa con un anticorpo specifico per l'β-actina.

3.7. Neosintesi di proteine

La neosintesi proteica veniva valutata misurando l'incorporazione di L-[4,5-³H]leucina nelle proteine cellulari totali. A tale scopo, gli estratti citosolici erano incubati con acido tricloroacetico al 10%, in ghiaccio, per 30 minuti. Dopo centrifugazione (13.000 rpm, 10 min, 4°C), i precipitati proteici venivano solubilizzati in NaOH 0,2 N, a 60°C, per 30 min. La radioattività veniva determinata mediante un contatore a scintillazione liquida, riportando i risultati come conte/min/piastra.

3.8. Analisi statistica

I risultati erano espressi come media \pm errore standard medio (SEM) di n osservazioni, dove n rappresenta il numero di esperimenti eseguiti in giorni differenti. Ogni trattamento era eseguito in triplicato. L'analisi dei dati era effettuata mediante ANOVA (analisi della varianza) ad una via. Erano considerati statisticamente significativi valori di p inferiori a 0.05 ($p < 0.05$).

4. RISULTATI

4.1. ASSENZA DI GLUCOSIO

4.1.1. Rimozione del glucosio in miociti, mioblasti e cellule non muscolari

Nelle cellule muscolari differenziate poste, per tempi diversi (30, 60, 120 e 180 min), in aerobiosi, a 37°C, in mezzo privo di glucosio, la concentrazione intracellulare di ATP dal valore iniziale di 5,2 mM, si riduce, a fine test, a 0,9 mM, per tornare ai livelli di partenza quando i miociti vengono successivamente posti, per 4 ore, in terreno di coltura contenente glucosio (fig. 9). Il decremento dell'ATP si accompagna ad un significativo aumento delle proteine mTOR e p70S6K fosforilate. Come illustrato in figura 10, tale incremento raggiunge un picco (+ 40-70% rispetto al controllo) a 2 ore dalla sottrazione del glucosio dal mezzo di coltura che corrisponde ad un livello intracellulare di ATP pari a circa il 30-40% dei valori iniziali (n=3; p<0.01). Quando alle stesse cellule muscolari viene addizionato, per altre 4 ore, un mezzo contenente glucosio alla concentrazione di 25 mM, i livelli delle proteine mTOR e p70S6k in forma attiva ritornano a valori non dissimili da quelli del controllo.

Per valutare l'eventuale tessuto-specificità dell'attivazione della via mTOR-p70S6k indotto dalle nostre condizioni sperimentali, si sono sottoposte a condizioni di rimozione del glucosio per 2 ore, a 37°C, in mezzo DMEM, mioblasti (L6 e H9c2), altri miociti (cellule muscolari scheletriche murine,

C2C12) e linee cellulari di origine non muscolare [uterine (HeLa), fibroblastiche (3T3-L1), intestinali (CaCo-2) e gliali (C6)]. Sugli estratti citoplasmatici delle cellule così trattate è stata misurata, mediante Western blot, l'espressione della proteina p70S6k fosforilata (fig.11). Tale analisi ha messo in evidenza che, ad eccezione delle C2C12, nelle forme indifferenziate e nei suddetti citotipi (i quali non presentano caratteristiche biochimiche e fisiologiche tipiche del tessuto muscolare scheletrico) non si assiste ad alcuna attivazione della chinasi.

4.1.2. Fosforilazione delle proteine mTOR, p70S6k e 4EBP1 in miociti sottoposti a deplezione energetica in presenza di rapamicina o wortmannina

L'attivazione delle chinasi mTOR, p70S6k e 4EBP1 che si ottiene in colture di miociti deprivati di glucosio conseguente alla rapida caduta di risorse energetiche intracellulari, viene inibita se si aggiunge al mezzo di coltura rapamicina 20 nM o wortmannina 100 nM, rispettivamente specifici inibitori di mTOR (*Jefferies et al., 1997*) e PI3K (fig.12).

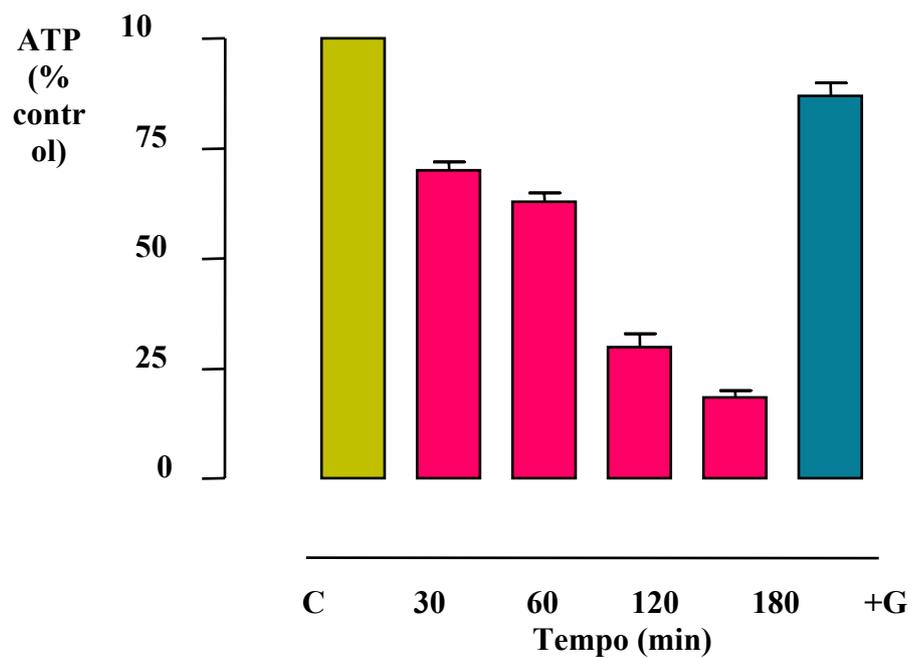


Fig. 9. Andamento, in funzione del tempo, della concentrazione intracellulare di *ATP* in colture di *miociti* dopo sottrazione del glucosio.

C = controllo;

+ G = cellule muscolari poste nuovamente in terreno di coltura contenente glucosio alla concentrazione di partenza, per 4 ore.

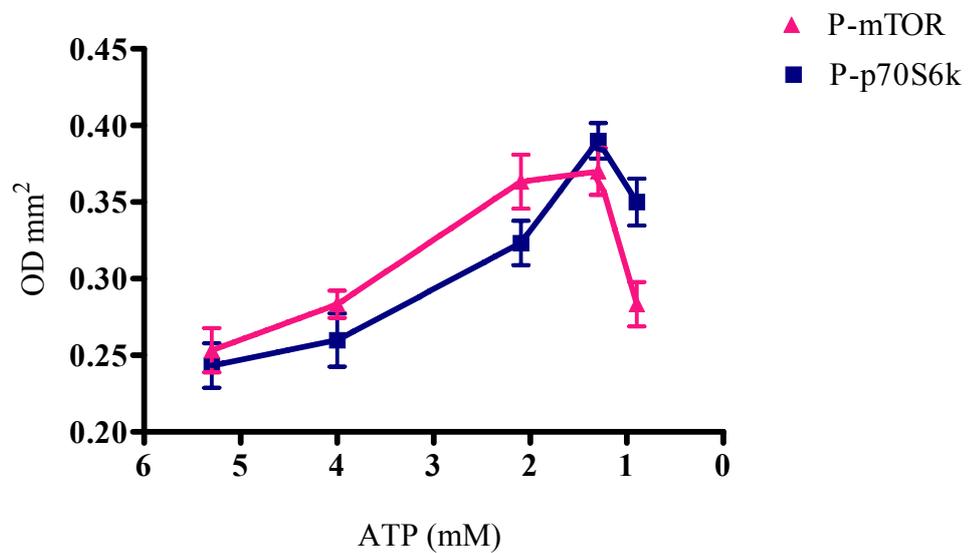
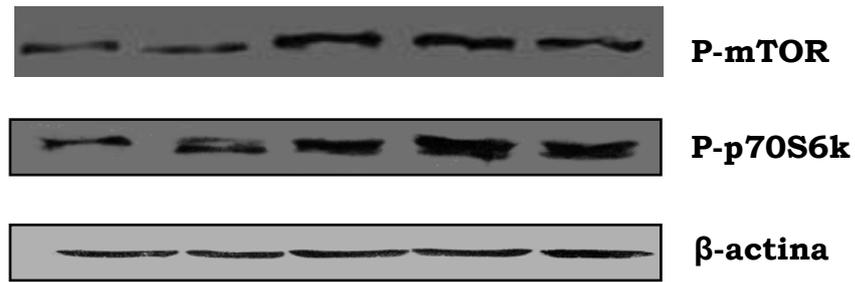


Fig. 10. Aumento delle proteine *mTOR* e *p70S6k fosforilate* in colture di miociti sottoposti a rimozione del glucosio. Il massimo valore (+50-70%) viene raggiunto dopo 2 ore dalla sottrazione del glucosio, in corrispondenza di una diminuzione della concentrazione di ATP del 70%. Le condizioni sperimentali del trattamento sono identiche a quelle descritte in fig. 9

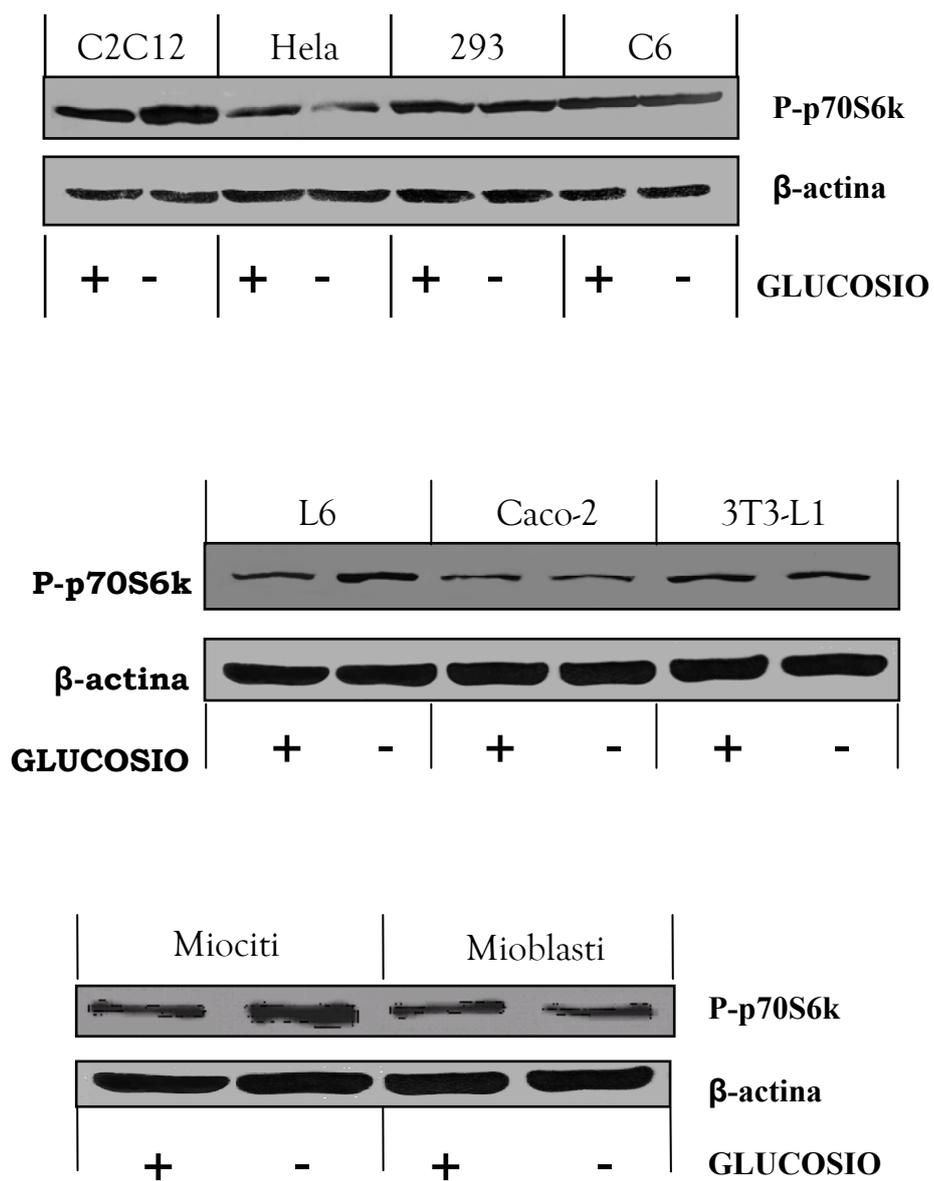


Fig. 11. Analisi Western Blot della proteina p70S6k fosforilata in *miociti*, *mioblasti* e *cellule non muscolari* sottoposte a deplezione di glucosio.

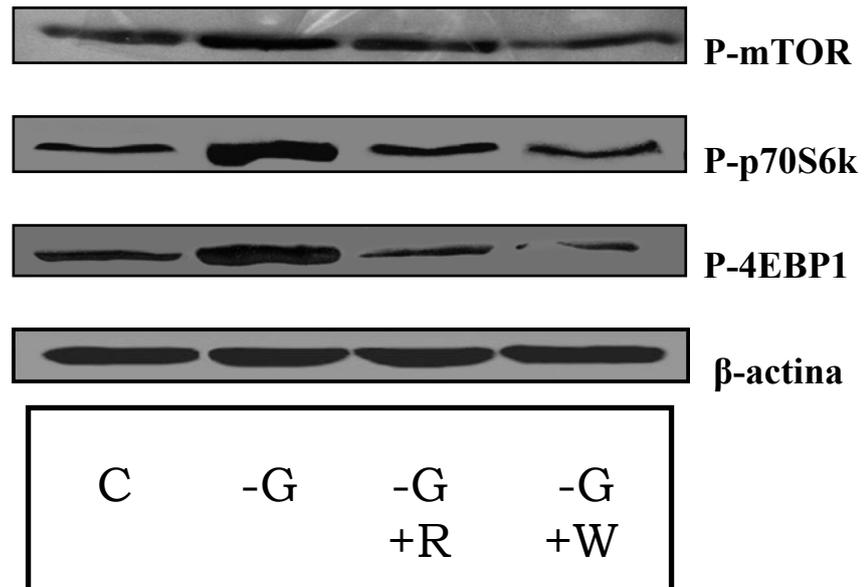


Fig. 12. Miociti sottoposti, per 2 ore, a deplezione di glucosio (-G) in presenza di *rapamicina* (R) 20 nM o *wortmannin* (W) 100 nM. La sola rimozione di glucosio produce un incremento del 50-70% della fosforilazione di mTOR e p70S6k, al contrario, l'aggiunta di R o W inibisce l'attivazione delle due chinasi.

4.1.3. Sintesi proteica in cellule muscolari sottoposte a pre-incubazione in terreno di coltura deprivato del glucosio

Se cellule muscolari vengono pre-incubate, per 2 ore, a 37°C, in mezzo di coltura senza glucosio e successivamente mantenute, per tempi diversi (3, 6 e 12 ore), in terreno contenente glucosio, in presenza di L-[4,5-3H]leucina, si assiste ad una crescente incorporazione dell'aminoacido radioattivo nella frazione proteica cellulare, significativamente maggiore che in cellule tenute per gli stessi periodi di tempo costantemente in presenza di glucosio (fig. 13).

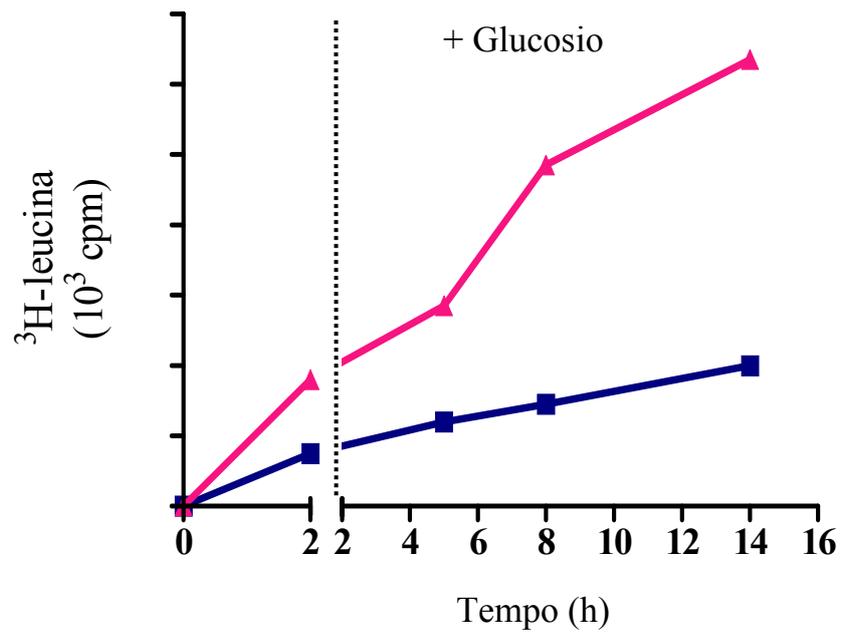


Fig. 13. Colture di miociti incubate, per 2 ore, in terreno privo di glucosio e, successivamente, poste in nuovo mezzo contenente glucosio (25 mM) (—), in presenza di ^3H -Leucina (10 $\mu\text{Ci/ml}$). Ai controlli viene addizionata solo ^3H -Leucina (—).

4.2. AZIONE DEL TESTOSTERONE

4.2.1. Fosforilazione di mTOR e p70S6k in miociti incubati in presenza di testosterone

L'effetto del testosterone sulle chinasi mTOR e p70S6k è stato valutato misurando l'espressione di tali proteine in miociti incubati per 2 ore, a 37°C, in terreno di coltura DMEM, contenente diverse concentrazioni dell'ormone (testosterone enantato, 10^{-5} - 10^{-9} M). La fosforilazione di mTOR e p70S6k aumenta significativamente (+50-70%) rispetto ai valori delle cellule di controllo (n=3; p<0.01) (fig. 14). Se le cellule muscolari vengono incubate, per 2 ore, in mezzo standard in presenza di testosterone enantato (10^{-5} M) e di un antagonista del recettore per gli androgeni (flutamide o ciproterone acetato alla concentrazione finale di 10^{-5} M), l'attivazione ormone-dipendente delle suddette proteine viene completamente inibita (n=3; p<0.01) (fig. 15).

Se l'incubazione dei miociti in presenza di testosterone viene effettuata in condizioni di ridotto apporto energetico (2 h, in terreno di coltura privo di glucosio, con l'aggiunta di testosterone enantato 10^{-5} M), i livelli di mTOR e p70S6k in forma fosforilata raggiungono valori pari al 110-120% dei rispettivi controlli (n=3; p<0.001) (fig. 16).

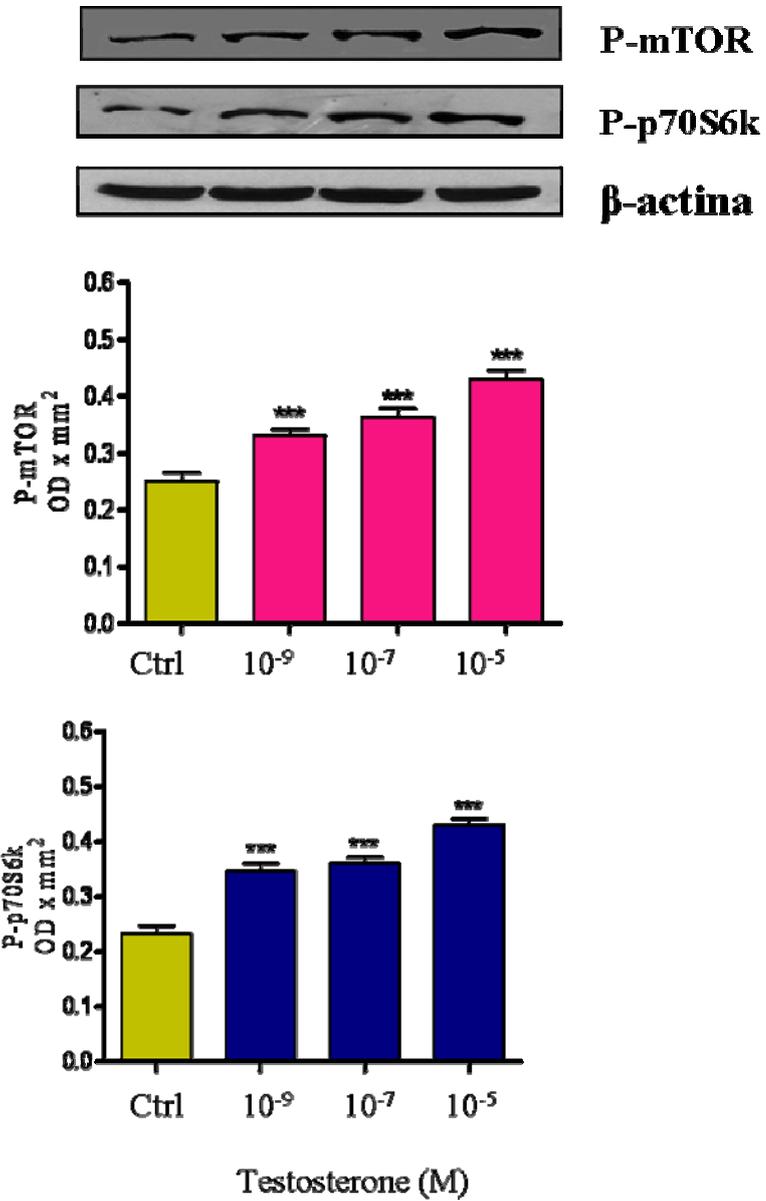


Fig. 14. Aumento dose-dipendente dei livelli di mTOR e p70S6k fosforilate (+45-75%) in presenza di diverse concentrazioni di testosterone enantato (10^{-9} - 10^{-5} M).

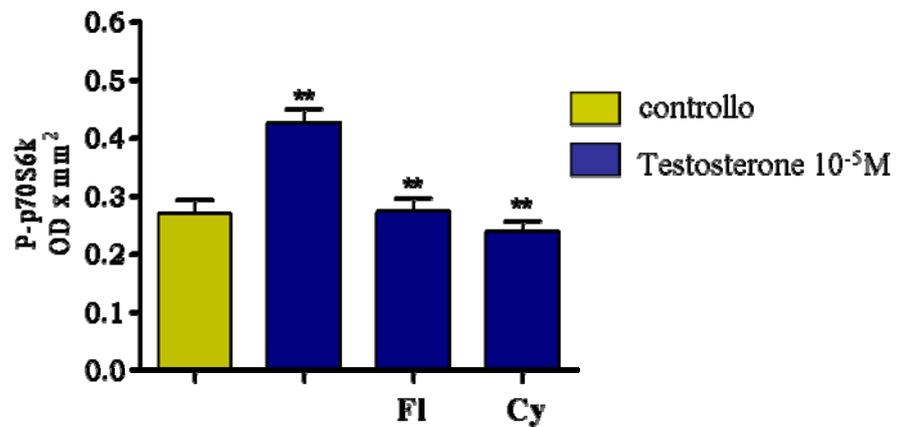
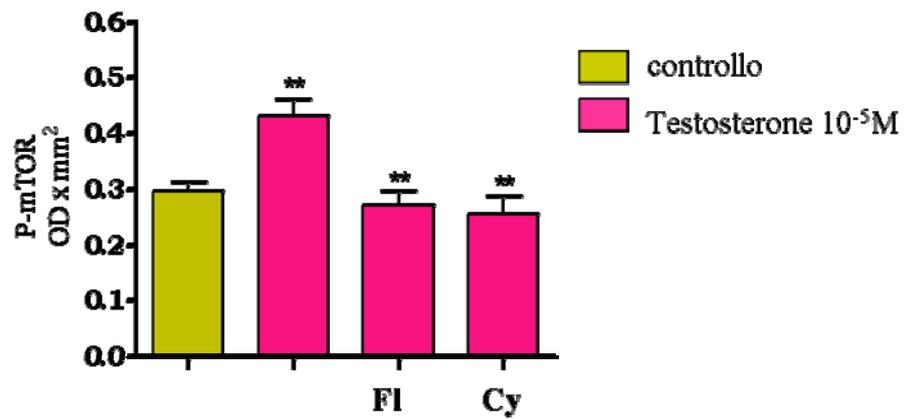
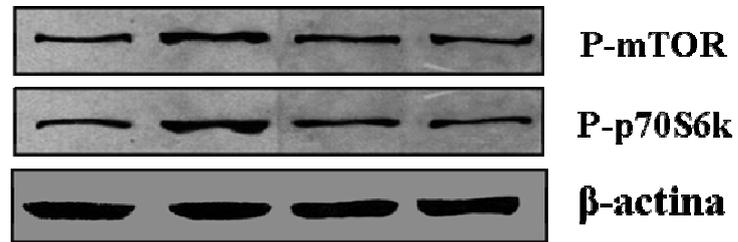
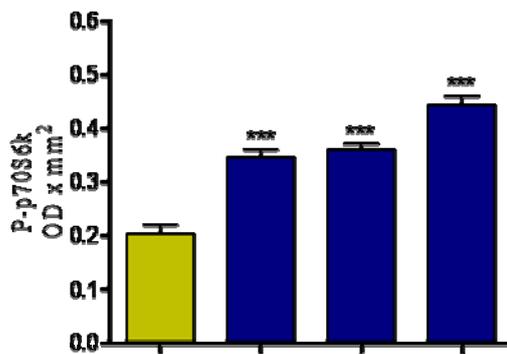
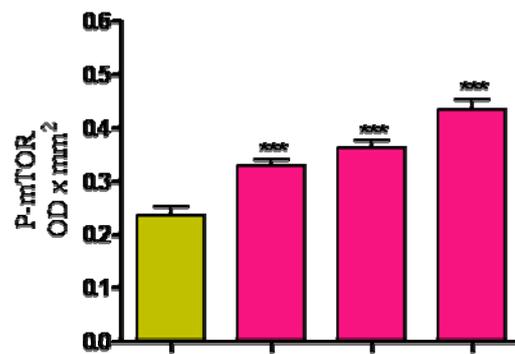
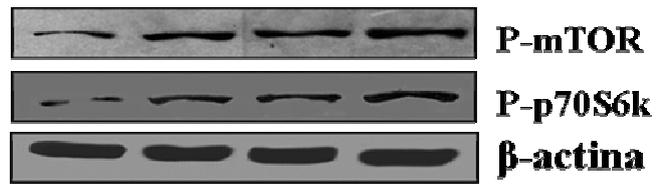


Fig. 15. Mancata fosforilazione di mTOR e p70S6k in cellule muscolari incubate con testosterone enantato 10⁻⁵M, in presenza di flutamide (Fl) o ciproterone acetato (Cy) alla concentrazione finale di 10⁻⁵M.



-	+	-	+	- glucosio
-	-	+	+	+ Testosterone

Fig. 16. Livelli intracellulari di *P-mTOR* e *P-p70S6k* in miociti esposti, per due ore, o deplezione energetica o al solo testosterone enantato (10^{-5} M), ed in cellule muscolari coltivate in mezzo assente di glucosio a cui è stato addizionato testosterone enantato (10^{-5} M).

4.3. RUOLO DEL CALCIO

4.3.1. Miociti incubati in assenza di glucosio ed in presenza di calcio-antagonisti o inibitori del rilascio del Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico

Per determinare il ruolo svolto dal calcio nell'attivazione della via mTOR-p70S6k, alcune cellule muscolari sono state poste, per 2 ore, in terreno di coltura privo di glucosio, in presenza di chelanti del Ca^{2+} (EDTA o EGTA 1,5 mM). In tali condizioni sperimentali, l'aggiunta del chelante inibisce la fosforilazione della p70S6k (fig. 17).

Per stabilire se il calcio richiesto per l'attivazione della chinasi fosse di origine intra- o extra-cellulare, cellule L6, sottoposte a deplezione energetica per 2 h, sono state incubate in presenza di calcio-antagonisti (verapamil o nifedipina, 10^{-5}M) o inibitori del rilascio di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico (acido ciclopiazonico 10^{-6}M o rianodina 10^{-5}M). Nelle suddette condizioni sperimentali, l'aggiunta di calcio-antagonisti o acido ciclopiazonico non comporta alcuna inibizione della fosforilazione di p70S6k ed mTOR. Per effetto della rianodina, invece, le chinasi fosforilate si mantengono ai valori basali ($n=3$; $p<0.05$) (fig. 18).

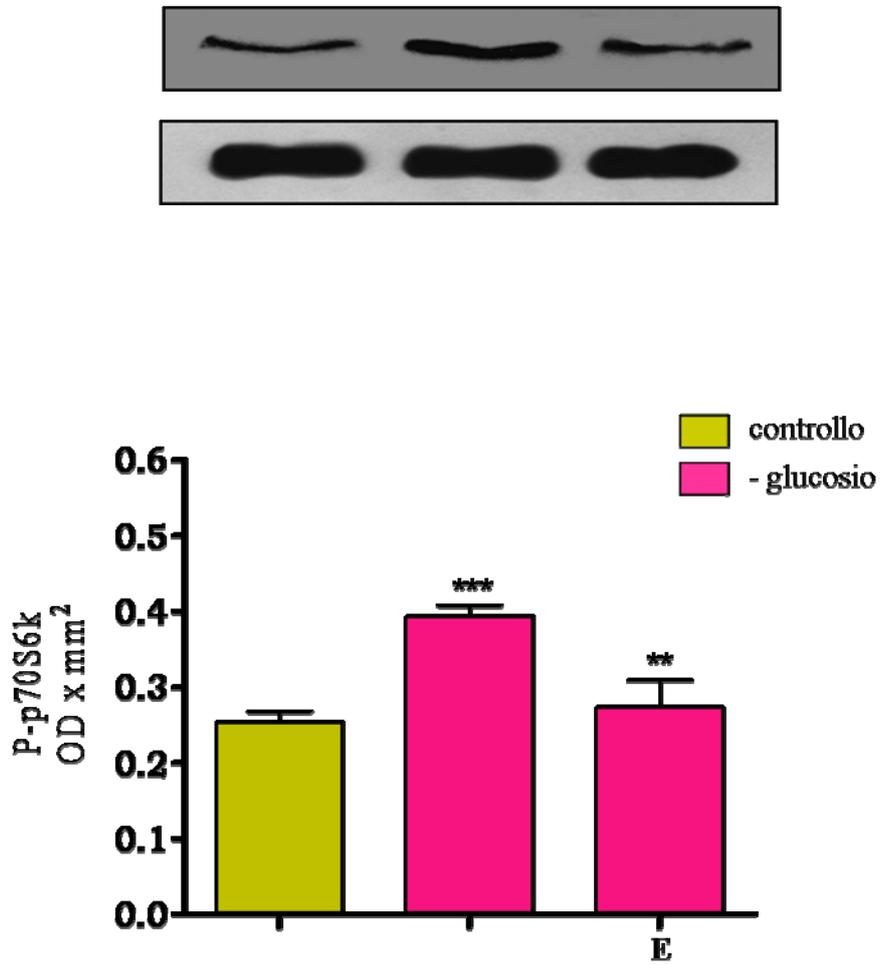


Fig. 17. Inibizione della fosforilazione di p70S6k indotta dalla deplezione di glucosio, per aggiunta di *EDTA* (E) al mezzo di coltura.

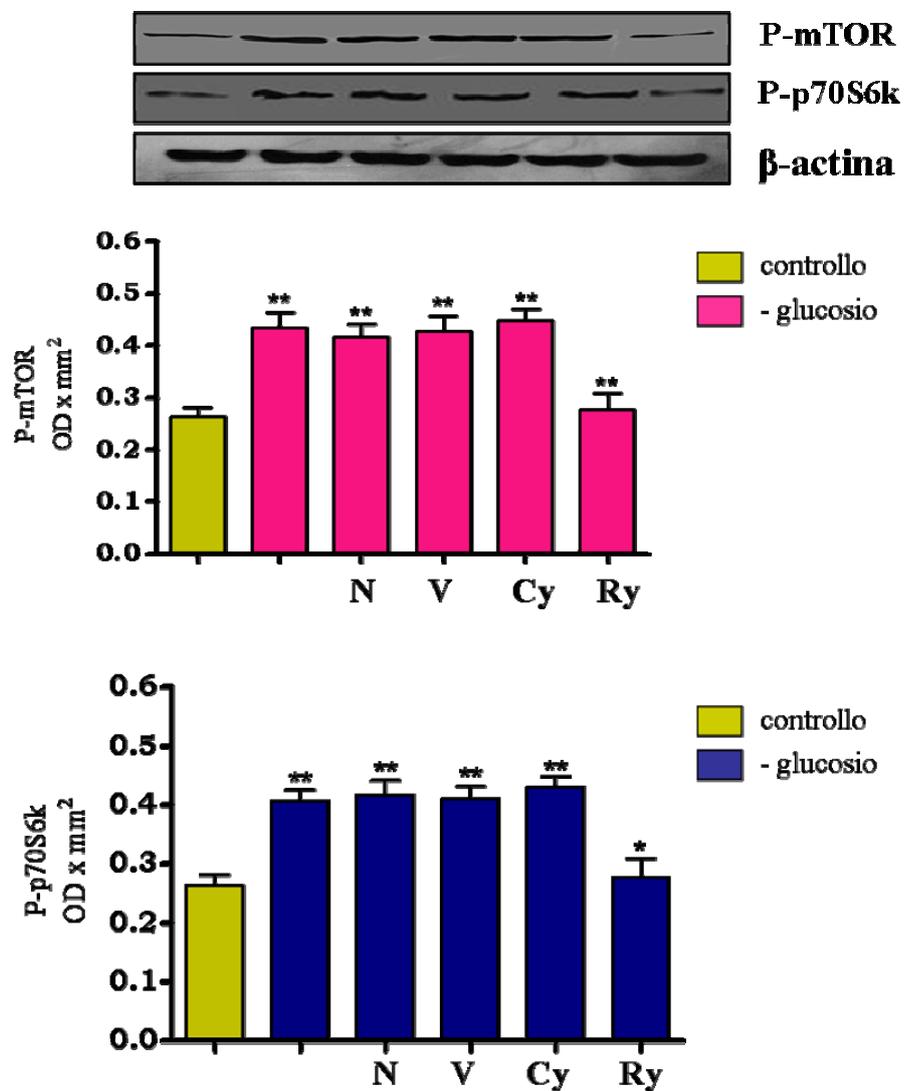


Fig. 18. Livelli di p70S6k ed m-TOR fosforilate in miociti incubati, per due ore, in mezzo di coltura *privo di glucosio*, in presenza di calcio-antagonisti [*nifedipina* 10^{-5} M (N), *verapamil* 10^{-5} M (V)] o di inibitori del rilascio del Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico [*acido ciclopiazonico* 10^{-6} M (Cy) o *rianodina* 10^{-5} M (Ry)].

4.3.2. Miociti incubati con testosterone enantato, calcio-antagonisti ed inibitori del rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico

Cellule muscolari sono state incubate, per 2 h, in mezzo standard con aggiunta di testosterone enantato (10^{-5} M), in presenza di verapamil, nifedipina, acido ciclopiazonico o rianodina.

L'analisi Western blot di P-p70S6k e P-mTOR, effettuata sugli estratti citosolici delle cellule esposte a tali condizioni sperimentali, ha messo in evidenza che la presenza di calcio-antagonisti, nel mezzo di coltura, non inibisce la fosforilazione delle proteine indotta dal testosterone. Al contrario, tale fosforilazione viene inibita dall'acido ciclopiazonico alla concentrazione di 10^{-6} M (fig. 19).

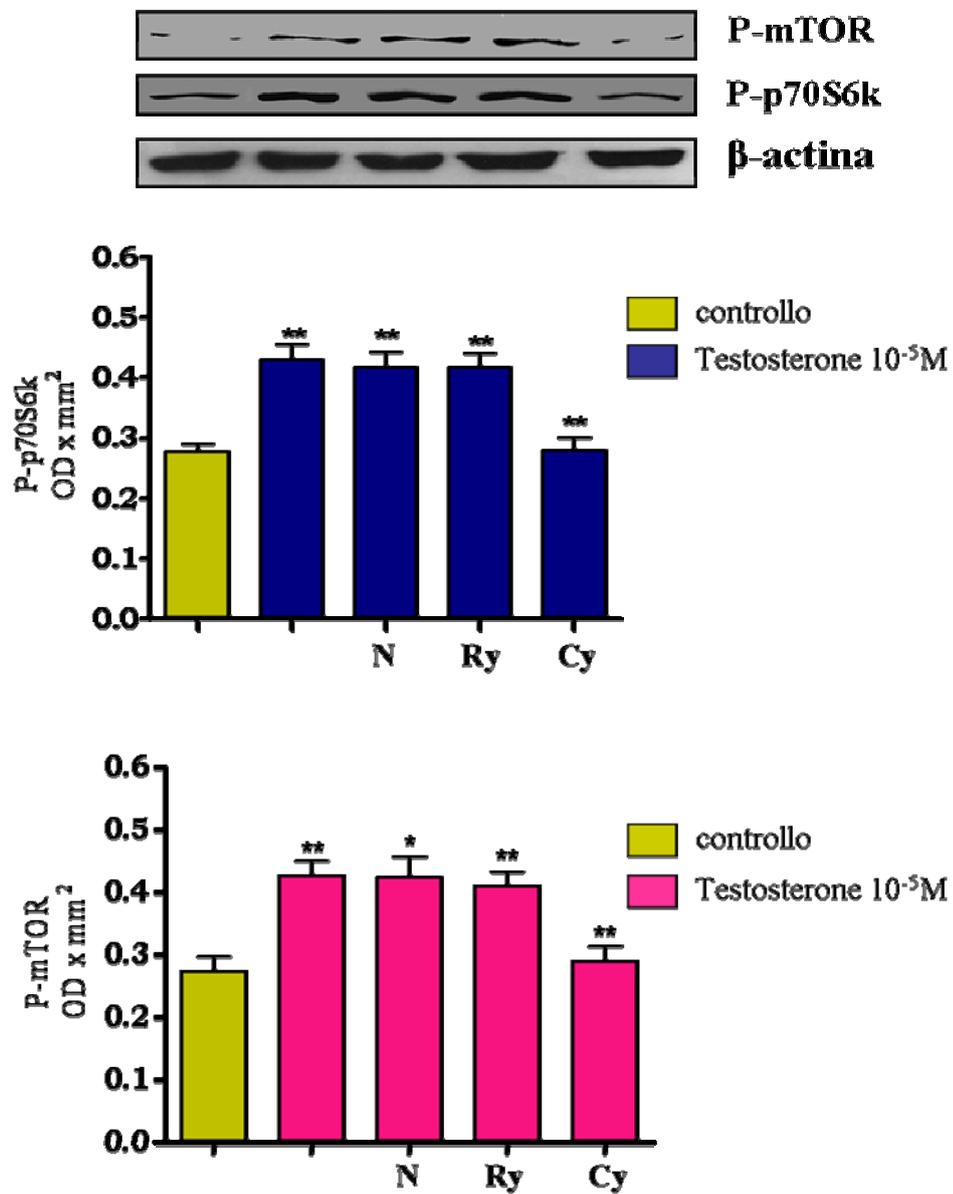


Fig. 19. Livelli di p70S6k ed m-TOR fosforilate in miociti incubati, per due ore, in mezzo di coltura contenente *testosterone* ($10^{-5}M$), in presenza di calcio-antagonisti [*nifedipina* $10^{-5}M$ (N)] o di inibitori del rilascio del Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico [*acido ciclopiazonico* $10^{-6}M$ (Cy) o *rianodina* $10^{-5}M$ (Ry)].

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il tessuto muscolare, sia esso scheletrico, cardiaco o liscio, è caratterizzato dal possedere notevole plasticità; infatti, va incontro a continui processi di rimodellamento, tra cui *ipertrofia*, in risposta a stimoli di varia natura quali ormoni e particolari regimi di attività fisica. e, in modelli cellulari, deprivazione di nutrienti.

I diversi regimi di attività fisica corrispondono al lavoro muscolare in condizioni aerobiche o in condizioni anaerobiche. Come si evince dai due termini, essi presentano caratteristiche metaboliche diverse che si ripercuotono anche sull'estensione dell'area della sezione trasversa del corpo muscolare, nel senso che soltanto esercizi di tipo anaerobico (denominati di potenza) sono in grado di produrre ipertrofia, consentendo al muscolo di generare maggiore forza durante la contrazione. Va ricordato che la forza generata dal muscolo è funzione diretta dell'area della propria sezione trasversa. Dunque, l'ipertrofia deve essere determinata ed accompagnata da neosintesi di proteine nelle fibrocellule muscolari.

Studi sulla genesi dell'ipertrofia muscolare, hanno utilizzato diversi modelli sperimentali: l'elettro-stimolazione ad alta frequenza del muscolo tibiale anteriore di ratto (*Baar ed Esser, 1999*); iniezione di plasmidi codificanti per la forma attiva di proteine coinvolte in processi biosintetici, nelle fibrocellule del muscolo tibiale anteriore di topo (*Bodine et al., 2001*); ratti addestrati ad

eseguire sessioni di esercizi di potenza (*Bolster et al., 2003; Kubica et al., 2005*); somministrazione di fattori di crescita (IGF-1) o di ormoni (GH, T3, etc.) a cellule in coltura o ad animali (*Hayashi e Proud, 2007; Kenessey e Ojamaa, 2006*). Dai risultati così ottenuti è emersa la convinzione che la protein-chinasi mTOR ed i suoi substrati, p70S6k e 4EBP1, giocano un ruolo chiave nell'induzione della sintesi proteica responsabile dell'accrescimento distrettuale della massa muscolare. In particolare, *Bolster (2003) e Kubica (2005)*, utilizzando un modello animale, sono giunti a dimostrare che, nella fase di riposo successiva ad una sessione di esercizi di potenza, nel muscolo scheletrico di ratto, si ha attivazione delle chinasi mTOR, p70S6k e 4EBP1 seguita da aumento di sintesi proteica.

Ad oggi, tuttavia, non è ancora chiaro quali siano le cause ed i meccanismi che portano all'innescò della via biosintetica mTOR-p70S6k ed all'incremento della massa muscolare in soggetti che praticano sport classificabili come anaerobici.

Goldspink (2005) e Rommel (2001) ipotizzano che lo sviluppo dell'ipertrofia muscolare sia determinato da stress meccanici, provocati da contrazioni rapide ed improvvise, causa di microlesioni a livello delle fibrocellule muscolari. Questa ipotesi, seppur suggestiva, presenta dei limiti in quanto presuppone che stimoli, i quali non producano microtraumi organici a carico del muscolo, non siano in grado di generare ipertrofia muscolare. Ciò non è sempre vero, il che porta a considerare la possibilità che i segnali meccanici, che intervengono

durante gli esercizi di potenza, possano non essere l'unico determinante della neosintesi proteica. Dal momento che l'ipertrofia muscolare si sviluppa, di solito, in soggetti che praticano attività fisica di tipo anaerobico, ad elevato consumo di risorse energetiche, un'ipotesi alternativa, altrettanto accattivante, è quella secondo cui l'aumento distrettuale della massa muscolare tragga origine dalle variazioni metaboliche che hanno luogo durante l'utilizzo della specifica muscolatura. In altri termini, è da considerare l'eventualità che l'attivazione di mTOR e la conseguente neosintesi proteica (*Bolster et al., 2003*) siano il risultato della diminuzione del pool energetico intracellulare che si verifica nel muscolo durante l'attività fisica. Infatti, benché dati presenti in letteratura suggeriscano che l'azione chinasi di mTOR sia direttamente correlata ai livelli intracellulari di ATP (*Dennis et al., 2001*), altri dati sperimentali (*Hahn-Windgassen et al., 2005*) danno adito all'idea, alquanto stimolante, dell'attivazione di mTOR in risposta a condizioni di ridotte risorse energetiche. Tali risultati, tra loro contrastanti, sono stati ottenuti utilizzando come modello sperimentale cellule non muscolari, precisamente renali e fibroblastiche. Nel presente studio, invece, nel intento di contribuire a far luce su cause e meccanismi responsabili dell'attivazione della via biosintetica mTOR-p70S6k in cellule di tessuto muscolare, ci si è avvalsi di un modello sperimentale, non meccanicamente sollecitato, atto a simulare le condizioni metaboliche presenti nel muscolo durante gli allenamenti di potenza.

Pertanto, cellule muscolari di ratto, H9c2 ed L6, e di topo, C2C12, sono state coltivate in mezzo privo di glucosio per ridurre la concentrazione intracellulare di ATP. Con sorpresa, al diminuire dell'ATP, è stato osservato un significativo aumento delle proteine mTOR e p70S6K fosforilate, con il raggiungimento di un picco (+ 40-70% rispetto al controllo) in corrispondenza di un livello intracellulare di ATP pari a circa il 30-40% dei valori iniziali.

Quanto riscontrato, evidenzia l'esistenza di una correlazione inversa tra attivazione del sistema mTOR-p70S6k e pool energetico intracellulare, confortando l'ipotesi che variazioni metaboliche possano fungere da giusto stimolo per l'induzione di processi biosintetici mirati all'ipertrofia del muscolo. Il fenomeno sopra descritto, inoltre, sembra essere peculiare delle sole cellule muscolari, il che è comprovato dalla mancata attivazione della cascata chinasi mTOR-p70S6k osservata, qualora si esponano alle stesse condizioni sperimentali, mioblasti delle linee cellulari L6 ed H9c2, o cellule di origine non muscolare [uterine (HeLa), fibroblastiche (3T3-L1), intestinali (CaCo-2) e gliali (C6)]. Nelle forme indifferenziate e nei suddetti citotipi (privi delle caratteristiche biochimiche e fisiologiche tipiche del tessuto muscolare scheletrico) non si evidenzia, infatti, alcun incremento della fosforilazione di p70S6k, suggerendo che la sottrazione di nutrienti possa costituire uno specifico segnale di innesco della cascata mTOR-p70S6k in cellule muscolari mature.

La sottrazione di glucosio dal terreno di coltura, in presenza di rapamicina o wortmannina (rispettivamente specifici inibitori di mTOR e PI3K), non ha prodotto attivazione né di mTOR né dei suoi substrati, p70S6k e 4EBP1, indicando che, in cellule muscolari, l'impoverimento di sostanze nutritive possa dare inizio ad eventi intracellulari che intervengono a monte della via PI3K-mTOR-p70S6k.

In cellule muscolari sottoposte a deplezione di glucosio e, successivamente, mantenute, sino a 12 ore, in terreno di coltura standard, con l'aggiunta di L-[4,5-³H]leucina, si assiste ad una crescente incorporazione dell'aminoacido marcato nella frazione proteica cellulare. Tale incorporazione, per di più, è significativamente maggiore rispetto a quella riscontrata in cellule tenute, per gli stessi periodi di tempo, in presenza costante di glucosio 25 mM che, a tale concentrazione, costituisce uno stimolo sufficiente a promuovere la biosintesi di macromolecole (DNA e proteine), come osservato da *Kim et al.* (2006) in cellule staminali di topo. Quanto descritto è in linea con l'ipotesi secondo cui l'attivazione del "pathway" PI3K-mTOR-p70S6k, che scaturisce dalla rapida caduta di risorse energetiche, possa attivare, nella successiva fase di recupero, processi fisiologici responsabili di sintesi proteica.

Essendo risaputo (*Beato, 1989; Rooyackers e Nair, 1997*) che gli androgeni (testosterone, diidrotestosterone e androstenedione) determinano ipertrofia muscolare, attraverso meccanismi molecolari ancora poco conosciuti, colture di miociti sono state incubate in presenza di testosterone. A seguito di tale

trattamento, è stato constatato un incremento dei livelli P-mTOR e P-p70S6k pari al 50-70% in più dei rispettivi controlli. In presenza di flutamide o ciproterone, l'attivazione testosterone-dipendente delle suddette proteine, invece, sembra essere completamente inibita. D'altra parte, l'azione del testosterone in miociti posti in mezzo di coltura privo di glucosio, scaturisce in un incremento della fosforilazione di mTOR e p70S6k superiore a quello ottenuto con il solo ormone in cellule coltivate in mezzo contenente glucosio. Tali risultati inducono ad ipotizzare che ormone e sottrazione di nutrienti interagiscano sinergicamente nel promuovere, mediante modalità presumibilmente diverse, l'attivazione di vie citosoliche preposte a sintesi di molecole proteiche.

Il ruolo svolto dal calcio (noto mediatore di numerose cascate enzimatiche) nell'attivazione del sistema PI3K-mTOR-p70S6k, è stato valutato sia in miociti esposti a rimozione del glucosio che in cellule muscolari incubate con testosterone, mediante l'utilizzo di calcio-antagonisti o di inibitori del rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico.

Soltanto in presenza di rianodina, l'assenza di glucosio non comporta alcun fosforilazione di p70S6k ed mTOR, mentre l'attivazione testosterone-dipendente di tali proteine viene inibita esclusivamente dall'acido ciclopiazonico. Pertanto, si può ipotizzare che, nei miociti, l'induzione della suddetta cascata, a seguito di impoverimento di risorse nutritive, necessiti di

un incremento dei livelli citosolici dello ione Ca^{2+} , rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico, per attivazione dei recettori della rianodina (RyR) (fig.20).

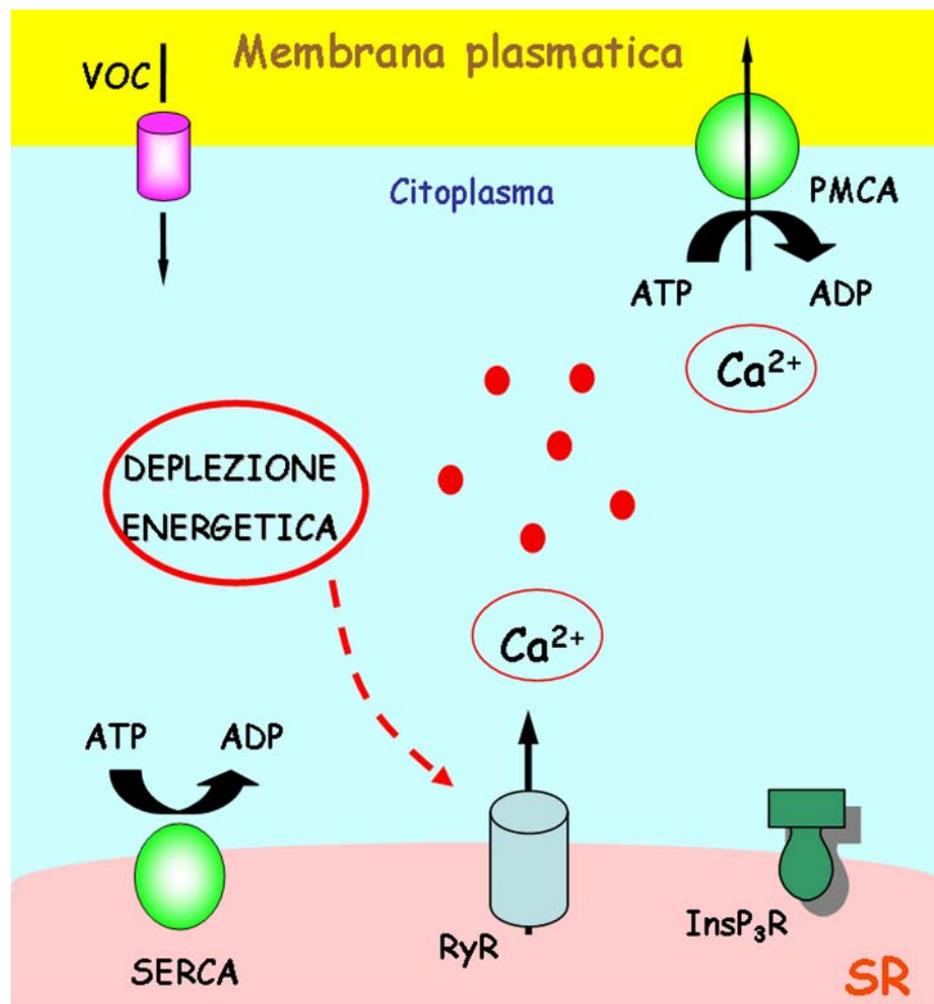


Fig. 20. In cellule muscolari, l'attivazione della cascata PI3K-mTOR-p70S6k, indotta dalla riduzione di risorse nutritive, ha luogo in seguito al rilascio di ioni Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico, probabilmente per attivazione dei recettori della rianodina (RyR).

L'attivazione della via citosolica PI3K-mTOR-p70S6k ad opera del testosterone, invece, sembra richiedere un innalzamento dei livelli citoplasmatici di Ca^{2+} per apertura di canali IP_3 -dipendenti, presenti sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico (fig. 21).

Con il presente studio, nel tentativo di chiarire i meccanismi preposti alla regolazione della neosintesi proteica nelle fibrocellule muscolari, si è giunti a riconoscere una funzione determinante all'attivazione del sistema PI3K-mTOR-p70S6k, indotta da stimoli metabolici previa liberazione nel citosol di ioni Ca^{2+} .

Inoltre, i risultati conseguiti hanno, inaspettatamente, permesso di evidenziare l'esistenza di una correlazione inversa tra processi molecolari, oramai ampiamente considerati parte integrante della dinamica dell'accrescimento della massa muscolare, e risorse energetiche intracellulari.

In conclusione è verosimile sostenere che, nell'intricato e complesso quadro di eventi molecolari finalizzati alla sintesi di proteine ed al conseguente sviluppo dell'ipertrofia muscolare, sensori metabolici intracellulari debbano occupare una posizione fisiologicamente rilevante.

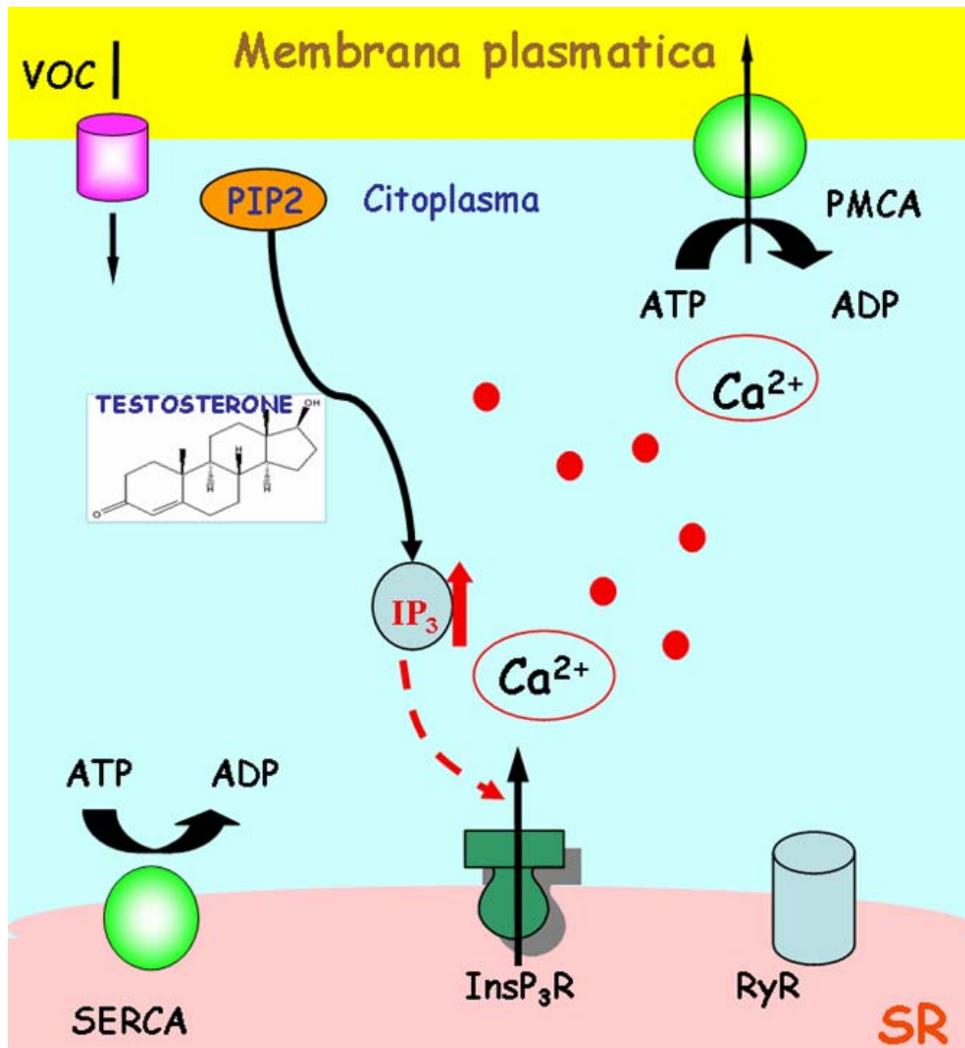


Fig. 21. In colture di miociti, l'attivazione della cascata PI3K-mTOR-p70S6k ad opera del testosterone, necessita del rilascio di ioni Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico, presumibilmente, in seguito all'apertura di *canali IP₃-dipendenti*.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alfieri CM, Evans-Anderson HJ, Yutzey KE.** (2007) Developmental regulation of the mouse IGF-I exon 1 promoter region by calcineurin activation of NFAT in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiology*; 292(5): C1887-94.
- Baar K, Esser K.** (1999) Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am. J. Physiol.*; 276(1 Pt 1): C120-7.
- Beato M.** (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell.*; 56: 335-344.
- Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Simon MC, Rafii S, Pandolfi PP.** (2006) PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature.*; 442(7104): 779-85.
- Berridge MJ.** (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.*; 361(6410): 315-25.
- Berridge MJ, Irvine RF.** (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature.*; 341(6239): 197-205.
- Bhasin S, Taylor WE, Singh R, Artaza J, Sinha-Hikim I, Jasuja R, Choi H, Gonzalez-Cadavid NF.** (2003) The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*; 58: M1103–M1110.

- Bjornsti MA, Houghton PJ.** (2004) The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*; 4(5): 335-48.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD.** (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell. Biol.*; 3: 1014–1019.
- Bolster DR, Kubica N, Crozier SJ, Williamson DL, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS.** (2003) Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. *J. Physiol.*; 553(Pt 1): 213-20.
- Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG.** (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes. Dev.*; 18(23): 2893-904.
- Conus NM, Hemmings BA, Pearson RB** (1998) Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k. *J. Biol. Chem.*; 273(8): 4776-82.
- Crie JS, Wakeland JR, Mayhew BA, Wildenthal and K** (1983) Direct anabolic effects of thyroid hormone on isolated mouse heart *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 245: C328-C333.

- Dan HC, Sun M, Yang L, Feldman RI, Sui XM, Ou CC, Nellist M, Yeung RS, Halley DJ, Nicosia SV, Pledger WJ, Cheng JQ. (2002)**
Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *J. Biol. Chem.*; 277(38): 35364-70.
- Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. (2001)**
Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science.*; 294(5544): 1102-5.
- DeVol DL, Rotwein P, Sadow JL, Novakofski J, Bechtel PJ. (1990)**
Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am. J. Physiol.*; 259: E89–E95.
- Edwards RH. (1981)** Human muscle function and fatigue. *Ciba Found Symp.*; 82: 1-18.
- Estrada M, Liberona JL, Miranda M, Jaimovich E. (2000)** Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*; 279(1): E132-9.
- Estrada M, Espinosa A, Gibson CJ, Uhlen P, Jaimovich E. (2005)**
Capacitative calcium entry in testosterone-induced intracellular calcium oscillations in myotubes *J. Endocrinol.*; 182(2): 371-9.
- Fabiato A. (1983)** Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*; 245(1): C1-14.

- Fang Y, Fliss AE, Robins DM, Caplan AJ.** (1996) Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. *J. Biol. Chem.*; 271(45): 28697-702.
- Gerasimovskaya EV, Tucker DA, Stenmark KR.** (2005) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin is necessary for hypoxia-induced pulmonary artery adventitial fibroblast proliferation. *J. Appl. Physiol.*; 98(2): 722-31.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N.** (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes. Dev.*; 15(7): 807-26.
- Glass DJ.** (2003) Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol. Med.*; 9(8): 344-50.
- Goldspink DF, Garlick PJ, McNurlan MA.** (1983) Protein turnover measured in vivo and in vitro in muscles undergoing compensatory growth and subsequent denervation atrophy. *Biochem. J.*; 210: 89-98.
- Goldspink G, Scutt A, Loughna P, Wells D, Jaenicke T, Gerlach G.** (1992) Gene expression in skeletal muscle in response to mechanical signs. *American Journal of Physiology.*; 262: R326-R363.
- Goldspink G, Yang SY.** (2001) Effects of activity on growth factor expression. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 11 Suppl: S21-7.
- Goldspink G.** (2003) Gene expression in muscle in response to exercise. *J Muscle Res Cell Motil.*; 24 (2-3): 121-6

- Goldspink G.** (2005 Oct) Impairment of IGF-I gene splicing and MGF expression associated with muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.*; 37(10): 2012-22.
- Goncharova EA, Goncharov DA, Eszterhas A, Hunter DS, Glassberg MK, Yeung RS, Walker CL, Noonan D, Kwiatkowski DJ, Chou MM, Panettieri RA Jr, Krymskaya VP.** (2002) Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM). *J. Biol. Chem.*; 277(34): 30958-67.
- Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N.** (2005) Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J. Biol. Chem.*; 280(37): 32081-9.
- Hannan KM, Thomas G, Pearson RB.** (2003) Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochemical journal.*; 370(Pt2): 469-77.
- Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP, Kasuga M, Nishimoto I, Avruch J.** (1997) Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J. Biol. Chem.*; 272: 26457–26463.
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K.** (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell.*; 110(2): 177-89.

- Hardie DG, Carling D, Carlson M.** (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.*; 67: 821-55.
- Hawke TJ, Garry DJ.** (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology.*; 91: 534-551.
- Hayashi AA, Proud CG.** (2007) The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*; 292(6): E1647-55.
- Hokin MR, Hokin LE.** (1953) Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem.*; 203(2): 967-77.
- Huang X, Lee KJ, Riedel B, Zhang C, Lemanski LF, Walker JW.** (2000) Thyroid hormone regulates slow skeletal troponin I gene inactivation in cardiac troponin I null mouse hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*; 32(12): 2221-8.
- Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT.** (2002) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell. Biol.*; 22(20): 7004-14.
- Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battagay EJ.** (2002) Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *FASEB J.*; 16(8): 771-80.

- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL.** (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell. Biol.*; 4(9): 648-57.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL.** (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.*; 115(5): 577-90.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, Hall MN.** (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell. Biol.*; 6(11): 1122-8.
- Jefferies, H. B., S. Fumagalli, P. B. Dennis, C. Reinhard, R. B. Pearson, and G. Thomas.** (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.*; 16: 3693-3704.
- Kenessey A, Ojamaa K.** (2006) Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. *J. Biol. Chem.*; 281(30): 20666-72.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM.** (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.*; 110(2): 163-75.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM.** (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-

sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell.*; 11(4): 895-904.

Kim YH, Heo JS, Han HJ. (2006) High glucose increase cell cycle regulatory proteins level of mouse embryonic stem cells via PI3K/Akt and MAPKs signal pathways. *J. Cell. Physiol.*; 209: 94-102

Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, Richardson C, Yoshino K, Hara K, Kemp BE, Witters LA, Mimura O, Yonezawa K. (2003) A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes.Cells.*; 8(1): 65-79.

Kubica N, Bolster DR, Farrell PA, Kimball SC, Jefferson LS. (2005) Resistance exercise increases muscle protein synthesis and traslation of eukaryotic initiation factor 2By mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem.*; 280(9): 7570-80.

Liu H, Zhang L, Li P, Cukier RI, Bu Y. (2007) Exploration of the Ca²⁺ interaction modes of the nifedipine calcium channel antagonist. *Chemphyschem.*; 8(2): 304-14.

MacKrell JJ. (1999) Protein-protein interactions in intracellular Ca²⁺-release channel function. *Biochem. J.*; 337 (Pt 3): 345-61.

Meyuhas O. (2000) Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem.*; 267(21): 6321-30.

- Moncoq K, Trieber CA, Young HS.** (2007) The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J. Biol. Chem.*; 282(13): 9748-57.
- Musarò A, McCullagh KJA, Naya FJ, Olson EN and Rosenthal N.** (1999) Androgens IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature.*; 400: 581–585.
- Musarò A, Giacinti C, Borsellino G, Dobrowolny G, Pelosi L, Cairns L, Ottolenghi S, Cossu G, Bernardi G, Battistini L, Molinaro M, Rosenthal N.** (2004) Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; 101(5): 1206-10.
- Owino V, Yang SY, Goldspink G.** (2001) Age-related loss of skeletal muscle function and the inability to express the autocrine form of insulin-like growth factor-1 (MGF) in response to mechanical overload. *FEBS Lett.*; 505(2): 259-63.
- Pallafacchina G, Calabria E, Serrano AL, Kalhovde JM, Schiaffino S.** (2002) A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 99: 9213–9218.
- Reiling JH, Hafen E.** (2004) The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes. Dev.*; 18(23): 2879-92.

- Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ** (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf–MEK–ERK pathway by Akt. *Science.*; 286: 1738–1741.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ** (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways *Nature Cell Biology*; 3: 1009-1013.
- Rooyackers OE, Nair S.** (1997) Hormonal regulation of human muscle protein metabolism. *Annu Rev Nutr.*; 17: 457-485.
- Russell B, Motlagh D, Ashley WW.** (2000) Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J. Appl. Physiol.*; 88(3): 1127-32.
- Sekulić A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, Abraham RT.** (2000) A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer. Res.*; 60(13): 3504-13.
- Semsarian C, Sutrave P, Richmond DR & Graham RM** (1999) IGF-induced myotube hypertrophy associated with an increase in anaerobic glycolysis in a clonal skeletal muscle cell model. *Biochem. J.*; 339: 443±451.
- Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S.** (2003) Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in

C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology*.; 144: 5081–5088.

Sinha-Hikim I, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Zheng W, Bhasin S.

(2004) Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J Clin Endocrinol Metab.*; 89(10): 5245-55.

Song YH, Li Y, Du J, Mitch WE, Rosenthal N, Delafontaine P. (2005)

Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J. Clin. Invest.*; 115(2): 451-8.

Szent-Gyorgyi AG. (1975) Calcium regulation of muscle contraction..

Biophysical Journal.; 15: 707–23.

Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J.

(2002) Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; 99(21): 13571-6.

Wang L, Rhodes CJ, Lawrence JC Jr. (2006) Activation of mammalian

target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1. *J. Biol. Chem.*; 281(34): 24293-303.

Wullschleger S, Loewith R, Oppliger W, Hall MN. (2005) Molecular

organization of target of rapamycin complex 2. *J. Biol. Chem.*; 280(35): 30697-704.

Xu Z, Stokoe D, Kane LP, Weiss A. (2002) The inducible expression of the tumor suppressor gene PTEN promotes apoptosis and decreases cell size by inhibiting the PI3K/Akt pathway in Jurkat T cells. *Cell Growth Differ.*; 13: 285–296.

Zhang J, Lazar MA. (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.*; 62: 439-66.

Ringraziamenti

Sono molte le persone che sento di dover ringraziare per l'aiuto che mi hanno dato nel corso di questi lunghi tre anni di lavoro di ricerca.

In modo particolare, desidero manifestare la mia riconoscenza al Professore Pietro Scotto per i suoi ineguagliabili consigli ed insegnamenti, per la costanza con cui mi ha seguita e per la pazienza con cui ha sopportato i miei ritardi.

Sentiti ringraziamenti vanno al Professor Enrico Abignente ed alla Professoressa Maria Valeria D'Auria, coordinatori di questo Dottorato, per essere stati, con la loro esperienza e dedizione, un prezioso punto di riferimento.

Un caloroso grazie alle persone con cui ho avuto l'onore ed il piacere di lavorare ed ai colleghi con cui ho condiviso un cammino intenso ed istruttivo.

Infine, voglio esprimere la mia gratitudine alla mia famiglia che mi è sempre stata accanto, ai miei amici che mi hanno incoraggiato, e a Cristian per essermi stato vicino anche quando quattrocento chilometri ci separavano.

Grazie a tutti.

Gabriella