

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**

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

***“La 3,5 diiodo-l-tironina, obesità e steatosi epatica:  
focus sulla funzionalità mitocondriale”***

*Coordinatore*  
Ch.mo Prof.  
Ezio Ricca

*Docente Tutore*  
Ch.mo Prof.  
Lillà Lionetti

*Candidato*  
Dott.Giorgio Gifuni

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	5
<b>CAPITOLO 1: I MITOCONDRI.</b>	
1.1	Struttura e funzioni dei mitocondri nella cellula. 8
1.2	Efficienza e disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale. 14
1.3	Radicali liberi e mitocondri. 18
<b>CAPITOLO 2: GLI ORMONI TIROIDEI.</b>	
2.1	La tiroide: biosintesi, rilascio e azione degli ormoni tiroidei. 24
2.2	Regolazione della secrezione degli ormoni tiroidei: asse ipotalamo-ipofisi-tiroide. 29
2.3	Metabolismo periferico degli ormoni tiroidei: la deiodinazione. 30
2.4	Le funzioni degli ormoni tiroidei. 33
2.5	I recettori degli ormoni tiroidei. 34
2.6	Effetti trascrizionali e post-trascrizionali della T3. 36
2.7	Recettori mitocondriali per la T3. 37
2.8	Recettori citosolici per la T3. 38
<b>CAPITOLO 3: LA 3,5-DIODO-L-TIRONINA (T2).</b>	
3.1	La 3,5-diiodo-l-tironina e i suoi effetti sul metabolismo energetico. 40
3.2	I bersagli cellulari della T2. 44
3.3	La T2 riduce l'adiposità nei ratti. 46
<b>CAPITOLO 4: NAFLD-STEATOSI EPATICA NON ALCOLICA.</b>	
4.1	NAFLD: Definizione, caratteristiche e cause della steatosi epatica. 47
4.2	Le alterazioni mitocondriali nella NAFLD. 49

## **CAPITOLO 5: INSULINA E RESISTENZA ALL'INSULINA.**

<b>5.1</b>	Biosintesi, struttura e azioni dell'insulina.	55
<b>5.2</b>	Le vie di trasduzione dell'insulina.	60
<b>5.3</b>	La resistenza all'insulina.	64

## **CAPITOLO 6: SCOPO DELLA TESI.**

68

## **CAPITOLO 7: PARTE SPERIMENTALE.**

71

### **METODICHE UTILIZZATE NEI DISEGNI SPERIMENTALI**

#### **MISURE A LIVELLO CORPOREO**

<b>7.1.</b>	Metodiche utilizzate per determinare la composizione corporea e il bilancio energetico.	76
<b>7.1.1</b>	Misura del bilancio energetico dell'organismo.	76
<b>7.1.2</b>	Determinazione del metabolismo corporeo.	77
<b>7.1.3</b>	Misura del contenuto di acqua della carcassa.	77
<b>7.1.4</b>	Misura del contenuto lipidico della carcassa.	78
<b>7.1.5</b>	Misure del contenuto energetico della carcassa.	78
<b>7.1.6</b>	Misure del contenuto proteico della carcassa.	79
<b>7.2.</b>	Determinazione dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi, ALT e TSH.	80
<b>7.3.</b>	Test di risposta della glicemia ed insulinemia ad un carico orale di glucosio.	80
<b>7.3.1</b>	Dosaggio del glucosio: principio e metodo utilizzati.	81
<b>7.3.2</b>	Dosaggio dell'insulina:ELISA	82
<b>7.3.3</b>	Procedura sperimentale del dosaggio dell'insulina.	82
<b>7.4</b>	Analisi delle proteine mediante Western Blot.	84
<b>7.5</b>	Determinazione del contenuto epatico di trigliceridi.	87
<b>7.6</b>	Analisi istologica.	87

<b>ANALISI DEI PARAMETRI MITOCONDRIALI</b>	
<b>7.7.</b>	Preparazione dei mitocondri. 87
<b>7.7.1</b>	Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati. 88
<b>7.7.2</b>	Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati. 90
<b>7.7.3</b>	Misura della conduttanza protonica basale. 91
<b>7.7.4</b>	Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi. 92
<b>7.7.5</b>	Determinazione dell'attività totale della Carnitina-palmitoil-transferasi. 93
<b>7.7.6</b>	Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale. 93
<b>7.7.7</b>	Determinazione dell'attività della superossido dismutasi. 94
<b>7.7.8</b>	Determinazione del rilascio mitocondriale di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . 95
<b>7.8.</b>	Analisi statistiche. 96
<b>CAPITOLO 8. RISULTATI.</b>	97
<b>CAPITOLO 9. DISCUSSIONE.</b>	122
<b>PROSPETTIVE FUTURE.</b>	134
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	137

## INTRODUZIONE

L'obesità è la più frequente disfunzione nutrizionale nel mondo; col termine obesità si intende un aumento di peso corporeo per accumulo di grassi nel tessuto adiposo in quantità eccessiva rispetto alle necessità fisiologiche dell'organismo tale da determinare un rischio per la salute. E' una patologia molto frequente ed in costante aumento. La sua prevalenza varia notevolmente da un paese all'altro a seguito di fattori genetici, culturali, socioeconomici, ma è maggiormente diffusa nei paesi industrializzati.

Infatti, l'obesità è in aumento in tutti i paesi occidentali, al punto da essere definita come una epidemia. In USA contribuisce a 300.000 morti/anno, diventando in tal modo la seconda causa di morte dopo il fumo<sup>1</sup>.

Questo è dovuto al fatto che, rappresenta, non solo, un problema estetico, ma soprattutto un problema fisiopatologico in quanto è correlata ad una maggiore probabilità di contrarre malattie quali diabete mellito, ipertensione, osteoartriti, disturbi cardiovascolari, infarto, ictus, che costituiscono la cosiddetta *sindrome metabolica*.<sup>2</sup>

L'assunzione e la digestione degli alimenti rendono possibile l'assorbimento di sostanze portatrici di energia chimica. Le tre fonti di maggior rilievo per la produzione di energia sono il glucosio ematico, il glicogeno epatico e cellulare e gli acidi grassi del tessuto adiposo.

La funzione fisiologica del tessuto adiposo è quella di depositare e mobilizzare energia. I trigliceridi costituiscono circa il 90% della cellula adiposa e il 65 % del tessuto adiposo; essi rappresentano la forma di deposito di energia a più alta concentrazione e più prontamente disponibile.

In effetti, l'obesità deriva da alterazioni nell'assunzione, utilizzazione e nel deposito delle sostanze nutritive: meccanismi che comportano un bilancio energetico positivo; è quindi il risultato di uno squilibrio tra eccessiva introduzione calorica e dispendio energetico. In questo caso, l'energia in eccesso viene depositata in piccola parte nelle riserve di glicogeno delle cellule, ma la

maggior parte, appunto, viene invece immagazzinata sotto forma di trigliceridi a livello del tessuto adiposo.

Se l'individuo è costantemente in bilancio energetico positivo aumenterà la massa grassa e quindi anche il suo peso corporeo, generando quindi obesità e scompensi metabolici ad essa associati. Infatti tra le principali conseguenze metaboliche dell'obesità troviamo la steatosi epatica e l'insulino-resistenza.

Con il termine "steatosi epatica" si intende un aumento del contenuto di grasso all'interno delle cellule del tessuto epatico. Lo sviluppo di steatosi è legato al ruolo che il fegato ha nel metabolismo dei grassi ed in particolare dei trigliceridi. La steatosi si verifica quando la cellula epatica accumula trigliceridi in conseguenza o di un'aumentata captazione, o di un aumento della sintesi endogena, di acidi grassi. Inoltre, la steatosi epatica può evolvere verso processi infiammatori e/o necrotici ( NASH "steatoepatite non alcolica") con eventuale sviluppo di fibrosi e cirrosi.

L'insulino-resistenza è una condizione caratterizzata da una diminuzione degli effetti biologici dell'insulina; in tale condizione, le quantità fisiologiche di insulina producono una risposta biologica ridotta a livello dell'omeostasi glicemica.

In effetti, l'insulino-resistenza è una condizione in cui la cellula è insensibile all'azione dell'insulina ed il glucosio non riesce a penetrarvi. Un mediatore cruciale nell'azione dell'insulina è la proteina chinasi B (PKB), anche conosciuta come Akt, una chinasi serina/treonina la cui attivazione contribuisce a regolare l'uptake di glucosio, il metabolismo del glicogeno, l'espressione genica, la sopravvivenza delle cellule e, quindi, la loro proliferazione e protezione dall'apoptosi<sup>3</sup>.

I mitocondri, la centrale del metabolismo energetico cellulare, sembrano essere coinvolti nello sviluppo delle patologie associate all'obesità, quali appunto, steatosi epatica e insulino-resistenza. Infatti diversi studi hanno dimostrato che disfunzioni mitocondriali e stress ossidativo sono meccanismi alla base dello sviluppo di tali patologie<sup>4-5</sup>.

Nella terapia dell'obesità, per lungo tempo, sono stati utilizzati gli ormoni tiroidei, in particolare la triiodotironina o T3, per la sua capacità di incrementare la spesa energetica. In seguito l'utilizzo della T3 come farmaco anti-obesità è stato abolito per i suoi effetti tireotossici indesiderati (aumento della frequenza cardiaca, ipertrofia cardiaca, riduzione della massa magra, alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide),

Negli ultimi anni, è stato dimostrato che la 3,5-diiodo-L-tironina (T2), una iodotironina naturalmente prodotta dalla tiroide, possiede attività biologiche simili a quelle della T3, ma indipendenti da essa e senza induzione dello stato tireotossico<sup>6</sup>.

E' evidente l'importanza della prevenzione e/o dell'intervento precoce in modo da arrestare o, quantomeno, far regredire lo sviluppo dell'obesità e delle patologie ad essa correlate, tramite lo studio di molecole biologicamente attive, come appunto, la T2: l'analisi è focalizzata soprattutto sull'effetto della T2 sulla funzionalità mitocondriale epatica tenendo presente il ruolo fondamentale di questi organelli cellulari nell'energetica cellulare e nello sviluppo della steatosi epatica<sup>4</sup>.

# CAPITOLO 1.

## I MITOCONDRI

### 1.1 Struttura e funzioni dei mitocondri nella cellula.

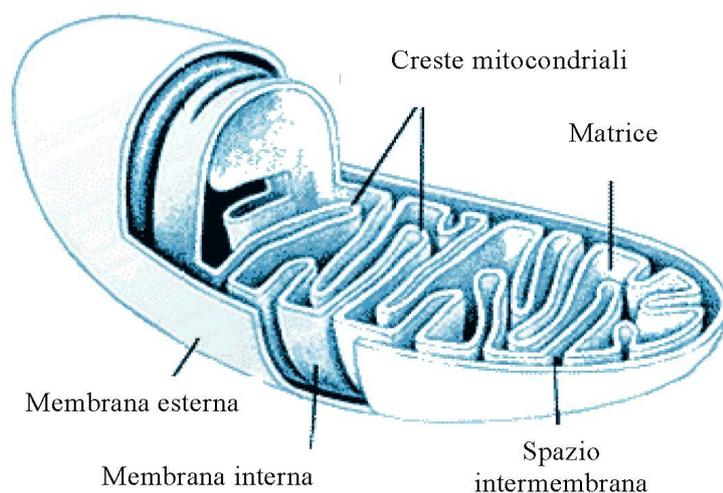
I mitocondri, presenti in qualsiasi cellula eucariotica, sono gli organelli che convertono l'energia in forme utili a promuovere le reazioni cellulari. Con la respirazione mitocondriale, la cellula opera l'ossidazione completa dei substrati organici a spese dell'ossigeno fino ad anidride carbonica ed acqua, ricavandone energia. Vista la loro importanza nel metabolismo, essi occupano in genere una frazione importante del volume cellulare totale.

I mitocondri hanno una forma approssimativamente cilindrica ed allungata, con un diametro pari a 0,5-1  $\mu\text{m}$  e sono costituiti da diversi compartimenti, ciascuno con specifiche funzioni metaboliche.

La struttura mitocondriale presenta due membrane (Figura 1.1):

- la membrana mitocondriale esterna, si presenta liscia e circonda completamente l'organello; è permeabile a piccole molecole e agli ioni che si muovono liberamente attraverso i canali trans membrana i quali sono formati da proteine integrali di membrana dette porine.
- la membrana mitocondriale interna, formata da ripiegamenti detti creste, che aumentano l'area superficiale. La membrana è impermeabile a quasi tutti gli ioni e a piccole molecole, compresi i protoni ( $\text{H}^+$ ); le uniche specie in grado di attraversarla sono quelle che possiedono uno specifico trasporto inserito nella membrana stessa. Questa struttura essendo così selettivamente permeabile determina una separazione netta degli intermedi e degli enzimi citosolici da quelli dei mitocondri.

Le due membrane identificano due differenti regioni: lo spazio intermembrana, delimitato dalle due membrane;



**Fig.1.1 Mitocondrio**

mentre, lo spazio delimitato dalla membrana interna forma la *matrice mitocondriale*, una soluzione acquosa molto concentrata di enzimi e di intermedi chimici coinvolti nel metabolismo energetico.

I mitocondri, infatti, contengono molti enzimi che nel loro insieme catalizzano l'ossidazione dei nutrienti organici mediante l'ossigeno molecolare ( $O_2$ ); alcuni di questi enzimi sono nella matrice, mentre altri sono immersi nella membrana interna.

Nel citosol, ad esempio, gli zuccheri vengono demoliti con reazioni che non utilizzano ossigeno, per cui la digestione è parziale e la resa in energia bassa. Nei mitocondri il metabolismo degli zuccheri (ma anche quello dei lipidi) si completa con la loro ossidazione (ciclo di Krebs). I prodotti di questa reazione (NADH e  $FADH_2$ ) vengono utilizzati nella fosforilazione ossidativa per produrre molecole ad alta energia (ATP).

Attraverso un complesso multienzimatico, avente la funzione di catena di trasporto, gli elettroni vengono prelevati da NADH e  $FADH_2$  e, dopo una serie di passaggi intermedi, vengono ceduti all'ossigeno molecolare ( $O_2$ ) che viene ridotto ad acqua. Durante il trasferimento elettronico le varie proteine trasportatrici subiscono dei cambiamenti conformazionali che consentono di

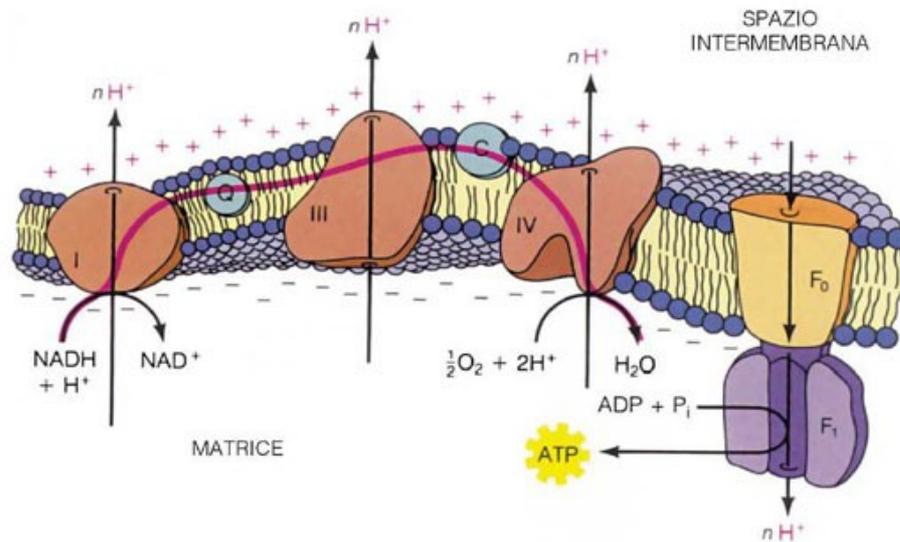
trasferire dei protoni dalla matrice allo spazio intermembrana, portando così alla formazione di un gradiente protonico ed elettrico (Figura 1.2).

I diversi complessi poliproteici, responsabili del trasporto degli elettroni, sono localizzati sulla membrana interna del mitocondrio:

- Il complesso I (NADH deidrogenasi), chiamato anche coenzima Q reductasi, contiene diversi polipeptidi, una flavoproteina e 9 centri ferro-zolfo, che oscillano tra due stati: ossidato e ridotto. Tale complesso acquista elettroni dal NADH e per ogni coppia di elettroni fatta passare vengono trasferiti 4 protoni nello spazio intermembrana. Questo complesso trasferisce gli elettroni ricevuti direttamente al secondo trasportatore, il coenzima Q<sup>7</sup>.
- Il coenzima Q, noto anche come ubiquinone, presenta una struttura chinonica, con una catena laterale più o meno lunga. Esso è solubile nella membrana; cioè non ha una posizione fissa come gli altri complessi respiratori, ma si può muovere liberamente; questa caratteristica gli consente di prendere elettroni sia dal complesso I che dal complesso II.
- Il complesso II (succinico deidrogenasi) oltre a catalizzare una reazione del ciclo di Krebs<sup>8</sup>, ossida il FADH<sub>2</sub> e, come il complesso I, trasferisce gli elettroni al coenzima Q, riducendolo; ma non permette il passaggio di protoni.
- Il complesso III, anche detto “citocromo c reductasi”, riceve elettroni dal coenzima Q e li trasferisce al citocromo c e in seguito trasferisce 4 protoni nello spazio intermembrana.
- Il complesso IV, detto “citocromo c ossidasi” contiene ioni rame che permettono il trasferimento degli elettroni dal citocromo c all’ossigeno, e determina un nuovo ed ultimo spostamento di protoni verso lo spazio intermembrana.

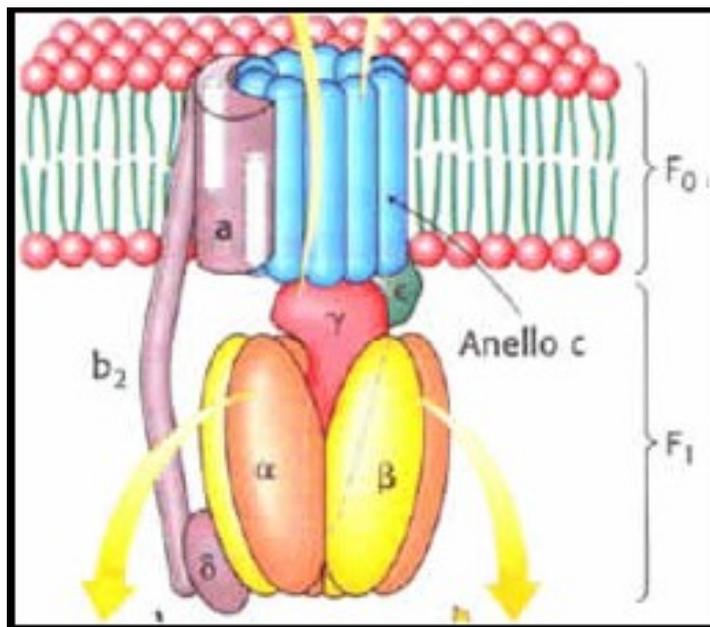
Nei mitocondri, l’azione dei complessi I, III e IV ha come effetto principale quello di portare elettroni dal NADH all’ossigeno, mentre i complessi II, III e IV dal FADH<sub>2</sub> all’ossigeno. Il flusso di elettroni attraverso questi trasportatori è accompagnato al passaggio di protoni verso lo spazio intermembrana, generando

un gradiente protonico, utilizzato per fosforilare ADP, attraverso il complesso V (ATP sintasi).



**Fig. 1.2. Catena respiratoria**

L'ATP sintasi è una pompa protonica di tipo F, costituita da due strutture dette  $F_0$  e  $F_1$ . La subunità  $F_1$  è una proteina periferica direttamente responsabile della sintesi di ATP<sup>9</sup>, costituita da tre subunità  $\alpha$  e da tre  $\beta$ , organizzate in dimeri  $\alpha$ - $\beta$ , disposti a delimitare un canale. Al centro vi è una subunità  $\gamma$  che si collega alla struttura della  $F_0$ . La subunità  $F_0$  è una proteina integrale di membrana, attraversa la membrana mitocondriale interna e costituisce il canale per il passaggio dei protoni dallo spazio intermembrana alla matrice. La proteina strutturalmente è costituita da due subunità b e da dieci subunità c, quest'ultime delimitano il canale. Il passaggio di protoni attraverso la porzione  $F_0$  determina la rotazione della subunità  $\gamma$  che a sua volta determina una variazione conformazionale dei dimeri  $\alpha$ - $\beta$  della porzione  $F_1$  e la sintesi di ATP (Figura 1.3).



**Fig. 1.3. Struttura ATP sintasi**

L'ATP prodotta esce dal mitocondrio grazie all'enzima "Traslocasi dei Nucleotidi Adeninici"(ANT), inserito nella membrana mitocondriale interna, che catalizza lo scambio con ADP citosolico, entrante nel mitocondrio.

Nel processo di fosforilazione della catena respiratoria, l'ADP e il fosfato sono dei reagenti necessari per il trasporto degli elettroni dal NADH all'ossigeno.

Infatti una diminuzione della disponibilità di ADP (ossia una bassa richiesta di energia) rallenta la velocità di fosforilazione (stato 4 o stato di riposo della respirazione), portando ad un incremento del gradiente protonico ai lati della membrana interna e rallentando così la velocità di trasporto degli elettroni. Diversamente un aumento del contenuto di ADP (incrementato dall'idrolisi di ATP, dovuto ad una maggiore richiesta di energia), produce un aumento della velocità di fosforilazione da parte del complesso V, attenuando il gradiente

protonico e stimolando il trasporto di elettroni e il consumo di ossigeno (stato 3 o stato attivo della respirazione).

Infatti se ad un sistema isolato di mitocondri, allo Stato 4 della respirazione, si aggiunge una quantità saturante di ADP, il consumo di ossigeno aumenta bruscamente fino ad un massimo e contemporaneamente l'ADP viene fosforilato ad ATP, Stato 3. Quando l'ADP aggiunto è stato fosforilato, la velocità di consumo dell'ossigeno ritorna allo Stato 4.

Questo fenomeno, in cui la velocità di trasporto degli elettroni è controllata dalla concentrazione di ADP, è chiamato controllo da parte dell'accettore o controllo respiratorio. L'indice di controllo da parte dell'accettore (RCR) è il rapporto tra la velocità di respirazione dei mitocondri in presenza di notevoli quantità di ADP e la velocità di respirazione in assenza di ADP.

Questo rapporto è normalmente molto alto, può essere di 5 o più nei mitocondri intatti, ma quando i mitocondri sono danneggiati perdono la loro capacità di fosforilare l'ADP e il rapporto scende ad 1. L'RCR è quindi un'utile misura dell'integrità dei mitocondri isolati.

## 1.2 Efficienza e disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale.

La sintesi di ATP e il trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria appaiono, dunque due processi strettamente accoppiati. Tuttavia, l'accoppiamento tra l'ossidazione di substrati e la sintesi di ATP non è pari al 100%. Questo disaccoppiamento risulta essere alla base della produzione di calore negli animali a sangue caldo.

Esistono due tipi di disaccoppiamento :

- *Il disaccoppiamento basale*, il quale non è finemente regolato ed è presente in tutti i mitocondri.
- *Il disaccoppiamento inducibile*, il quale è catalizzato da proteine e si trova solo in alcuni tipi cellulari.

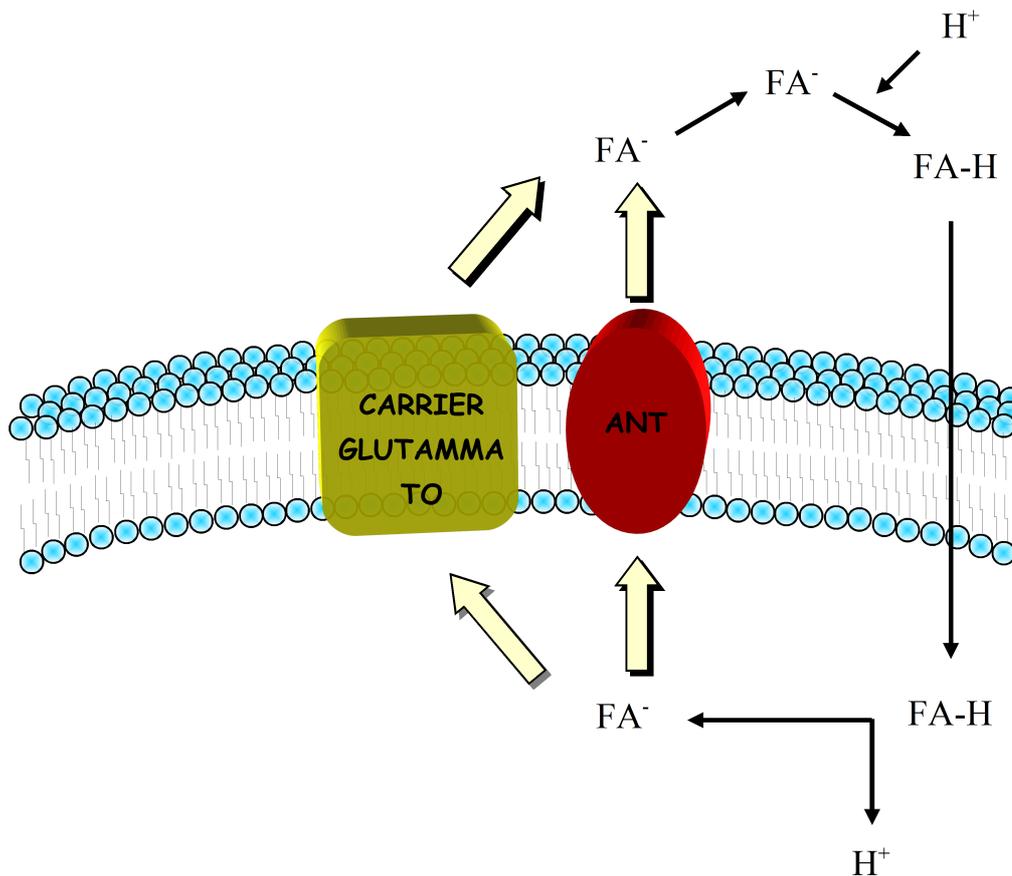
Il disaccoppiamento basale, definito anche conduttanza protonica basale<sup>10</sup> è dovuto ad una perdita protonica passiva da parte della membrana mitocondriale interna, determinata dalle caratteristiche intrinseche della membrana stessa. La conduttanza protonica basale non è il risultato di un artefatto nell'isolamento dei mitocondri, in quanto risulta essere presente anche nei mitocondri di cellule ed organi intatti, come fegato, timociti, linfociti, muscolo scheletrico, e cuore<sup>11</sup>.

Il contributo della conduttanza protonica basale al consumo di ossigeno può essere molto elevato, con percentuali che oscillano dal 20% al 50% in tessuti quali il fegato ed il muscolo. In particolare, tale contributo è del 20% negli epatociti attivi e del 25% negli epatociti a riposo<sup>12</sup>.

Per quanto riguarda il disaccoppiamento inducibile o conduttanza protonica indotta, in natura esistono diversi agenti disaccoppianti e tra questi vi sono gli acidi grassi. Nelle cellule intatte e nei tessuti, essi rappresentano un eccellente substrato respiratorio in quanto forniscono elettroni alla catena respiratoria. Questa funzione maschera il loro potenziale effetto disaccoppiante che diventa evidente solo in speciali condizioni fisiologiche (digiuno, esercizio eccessivo) o patologiche (diabete), caratterizzate da un inusuale accumulo di acidi grassi<sup>13</sup>. Il coinvolgimento degli acidi grassi nell'indurre una variazione dell'accoppiamento

della fosforilazione ossidativa mitocondriale è noto sin dagli anni 50. Alcuni ricercatori notarono che tali effetti venivano attenuati dalla presenza di albumina di siero bovino (BSA), una molecola che mostra un'alta capacità di legame per gli acidi grassi<sup>14-15</sup>. Successivamente si dimostrò che gli acidi grassi non esterificati a lunga catena (NEFA) erano i reali agenti disaccoppianti “naturali”, ed in particolare la loro potenzialità dipendeva dalla lunghezza della catena e dal loro grado di insaturazione<sup>16-17</sup>. La differenza fondamentale tra l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi e quello dei classici disaccoppianti sintetici, come il carbonilcianide-4-trifluorometossi-fenilidrazone (FCCP) e il dinitrofenolo, che agiscono da protonofori, è che gli acidi grassi agiscono sul potenziale di membrana e determinano una riduzione del pH nella matrice.

Una possibile spiegazione di ciò è stato suggerito da Wrigglesworth e collaboratori<sup>18</sup>. Questi ricercatori hanno evidenziato che l'oleato può catalizzare il trasporto di  $K^+$  e di  $H^+$ , attraverso il doppio strato lipidico, mediante un meccanismo secondo il quale l'acido grasso può traslocare un protone nella matrice come acido associato (AH) o come coppia ionica ( $A^- X^+$ ). La direzione del trasporto sarà determinata dalla polarità del gradiente cationico e la sua velocità dipenderà dalla natura dell'acido grasso e dal particolare catione della coppia ionica. Secondo questo meccanismo, quindi, l'effetto disaccoppiante sarebbe la conseguenza di un afflusso di  $H^+$  nella matrice mitocondriale con conseguente riduzione del potenziale di membrana; in questo modo una parte dell'energia derivata dall'incrementato flusso di elettroni, attraverso la catena respiratoria, viene dissipata. Venne proposto quindi un modello che spiegasse l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi. Tale modello prevede l'esistenza di carrier mitocondriali, capaci di legare e trasportare gli acidi grassi carichi negativamente ( $FA^-$ ) fuori dal mitocondrio. Sul lato citosolico, gli acidi grassi subiscono una protonazione, a causa della differenza di pH, e penetrano nella matrice mitocondriale tramite un meccanismo flip-flop. Nella matrice mitocondriale gli acidi grassi vengono nuovamente deprotonati, causando così il trasferimento di un protone dallo spazio intermembrana alla matrice mitocondriale (Figura 1.4).



**Fig.1.4. Effetto disaccoppiante degli acidi grassi**

Studi successivi suggerirono che gli acidi grassi erano in grado di incrementare la conduttanza protonica nei mitocondri, interagendo con alcuni componenti della membrana mitocondriale interna. Il gruppo di Skulachev, infatti, osservò che alcuni inibitori dell'ANT erano in grado di abolire parte dell'effetto disaccoppiante del palmitato<sup>19</sup>. Tali evidenze portarono gli autori ad ipotizzare che l'ANT potesse essere coinvolta nel disaccoppiamento mediato dagli acidi grassi. In particolare Schonfeld, utilizzando uno specifico inibitore del carrier ANT, quale la carbossiatrattiloside (CAT), evidenziò una correlazione tra il grado di attivazione del carrier stesso ed il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi<sup>20</sup>.

Nel tessuto adiposo bruno (BAT), ossia il tessuto specializzato nella produzione di calore, è stato provato che il disaccoppiamento è mediato da una proteina disaccoppiante, l'UCP1<sup>21</sup>. Questa proteina forma un canale capace di

aumentare il passaggio passivo di protoni, attraverso la membrana mitocondriale interna dissipando, sottoforma di calore, il gradiente protonico determinato dall'ossidazione dei substrati energetici nella catena respiratoria; offrendo così una via di rientro alternativa per i protoni rispetto a quella rappresentata dall'ATP sintetasi. Nel 1997 sono state scoperte altre due proteine, omologhe alla proteina disaccoppiante 1: l'UCP2 e l'UCP3.

La proteina UCP2 è stata trovata in tutti i tessuti dei mammiferi eccetto negli epatociti parenchimali<sup>22</sup>; la proteina UCP3 sembra essere una proteina specifica del muscolo scheletrico e del BAT<sup>23</sup>.

Altre due proteine della stessa famiglia, infine, chiamate UCP4 e UCP5, sono state ritrovate nel cervello<sup>24-25</sup>.

Sebbene inizialmente si pensasse che queste proteine disaccoppianti avessero un ruolo predominante nel disaccoppiamento mitocondriale, e quindi nella termogenesi, ulteriori studi hanno evidenziato che probabilmente il ruolo principale di queste proteine sia quello di trasportare i perossidi degli acidi grassi attraverso la membrana mitocondriale interna. È stato ipotizzato, infatti, che queste proteine disaccoppianti mitocondriali operino come trasportatori degli anioni degli acidi grassi perossidati. Tutto questo comporta l'estrusione di alcuni anioni dall'interno all'esterno della membrana mitocondriale interna, guidata dal potenziale di membrana. In questo modo la faccia interna della membrana mitocondriale si libera dai perossidi degli acidi grassi che altrimenti potrebbero formare degli ossidanti altamente aggressivi, che danneggiano il DNA mitocondriale, l'aconitasi ed altre componenti della matrice mitocondriale. Allo stato stazionario, la concentrazione dei perossidi degli acidi grassi è noto essere basso, questo potrebbe spiegare perché l'UCP 2,3,4 e 5 sono presenti in piccole quantità generalmente insufficienti a dare un grosso contributo alla conduttanza protonica della membrana mitocondriale.

### 1.3 Radicali liberi e mitocondri.

I mitocondri sono i maggiori produttori cellulari di radicali liberi e nel contempo i principali bersagli dei loro effetti dannosi.

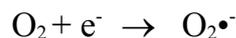
I radicali liberi ( $R\bullet$ ) sono specie chimiche capaci di esistenza indipendente e che possiedono uno o più elettroni spaiati nei loro orbitali. Si formano nelle cellule, sia in seguito alle loro reazioni metaboliche che a stimoli esterni: radiazioni ionizzanti, elevata tensione di ossigeno, sostanze chimiche, farmaci e stress.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) si suddividono in radicali e non radicali. Tra i primi abbiamo :

- Il radicale superossido  $O_2^{\bullet -}$
- Il radicale idrossile  $\bullet OH$
- Il radicale alcossile  $RO\bullet$
- Il radicale perossile  $ROO\bullet$

La specie dell'ossigeno non radicale è il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ).

Il radicale superossido ( $O_2^{\bullet -}$ ): è una specie reattiva precursore di molte altre; può essere prodotto a livello della catena di trasferimento elettronico mitocondriale per trasferimento di un elettrone dai trasportatori di elettroni direttamente all'ossigeno che quindi viene ridotto a radicale superossido:



Nelle nostre cellule questo radicale viene dismutato in acqua ossigenata ed ossigeno, attraverso una reazione nella quale una molecola di superossido si ossida diventando ossigeno e l'altra si riduce e si protona diventando acqua ossigenata.

Questa reazione è catalizzata dall'enzima superossido dismutasi



Il radicale superossido reagisce con proteine, lipidi, polisaccaridi e acidi nucleici, ma la sua reattività è piuttosto bassa, tanto che non rappresenta una

sostanza eccessivamente tossica per l'organismo. La sua azione tossica dipende in larga misura dalla produzione di acqua ossigenata e dall'interazione con essa.

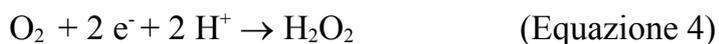
In questo modo si genera il radicale idrossile (HO•), una specie estremamente reattiva in grado di interagire molto velocemente con qualsiasi molecola, ossidandola



Il radicale ossidrile deriva anche dall'interazione del perossido di idrogeno con le forme ridotte di alcuni metallo-ioni, come il ferro bivalente o il rame monovalente, secondo la reazione di Fenton.



Il perossido d'idrogeno può essere ottenuto mediante riduzione bivalente dell'ossigeno.



Oppure indirettamente, mediante riduzione univalente dell'O<sub>2</sub> a superossido, seguita da dismutazione (equazione 1).

Nelle cellule l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si forma come prodotto primario della riduzione dell'ossigeno da parte di numerose ossidasi la maggior parte delle quali è localizzata a livello dei perossisomi. La pericolosità dell'acqua ossigenata non è dovuta ad un suo attacco diretto a livello dei componenti cellulari, bensì all'interazione con le forme ridotte di alcuni metallo-ioni e con il radicale superossido.

I radicali perossilici derivano dalla reazione dell'ossigeno con radicali centrati sul carbonio (R•)



Queste specie radicaliche hanno un ruolo molto importante nel fenomeno della perossidazione lipidica.

I radicali alcossilici sono formati mediante decadimento di radicali perossilici.

I radicali liberi in generale agiscono a livello delle membrane cellulari, portando alla perossidazione lipidica che comporta :

- Perdita di grassi polinsaturi;
- Alterazione della fluidità della membrana;
- Alterazione della permeabilità della membrana. Vengono alterati i rapporti tra i lipidi e le proteine che sono immerse nella membrana;
- Danni agli enzimi associati alla membrana;
- Alterato trasporto ionico. Molte proteine di membrana hanno la funzione di trasporto ionico.

Un esempio di proteina danneggiata dai radicali liberi è l'aconitasi, un enzima del ciclo di Krebs, dotata nel suo sito attivo di un cluster  $[4\text{Fe-4S}]$  che è il principale bersaglio dei superossidi. È stato proposto che il cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ , venga ossidato dallo ione superossido, formando il cluster inattivo  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$  a causa del rilascio reversibile del ferro<sup>26</sup>. In questa reazione si formerebbe ferro e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , perciò, l'inattivazione dell'aconitasi mitocondriale, mediata dal superossido, potrebbe incrementare la formazione del radicale idrossilico ( $\text{HO}\bullet$ ), attraverso la reazione di Fenton nei mitocondri. Questa selettiva e reversibile distruzione dei "cluster"  $[4\text{Fe-4S}]$ , può essere usata per stimare la concentrazione dei superossidi nelle cellule di mammifero<sup>27</sup>.

Nelle cellule sane, l'accumulo di proteine ossidate è impedito dalla loro eliminazione, per proteolisi. Le proteine degradate sono sostituite da altre sintetizzate "de novo", che contengono grandi quantità di aminoacidi riciclati. Se l'attacco ossidativo è forte, può essere superata la capacità proteolitica delle cellule e in tali condizioni le proteine non digerite possono formare aggregati dannosi per la cellula.

Inoltre i radicali liberi possono agire anche a livello del DNA nucleare o mitocondriale, determinando una rottura della doppia elica con formazione di legami destabilizzanti che possono sfociare in mutazioni.

Nei mitocondri i siti maggiormente coinvolti nella produzione di ROS sono localizzati a livello della catena di trasporto degli elettroni (Figura 1.2). Il

radicale superossido si genera quando una piccola frazione del flusso elettronico proveniente dai substrati, quali NADH e FADH<sub>2</sub> sfugge ai complessi della catena respiratoria e riduce una molecola di ossigeno. Il principale sito di produzione del superossido è l'ubichinone, il quale si alterna tra gli stati di chinone (completamente ossidato) e semichinone (il prodotto della riduzione monovalente); durante tale processo vi è la tendenza per un elettrone di passare direttamente all'ossigeno, invece che al carrier successivo, con conseguente formazione di superossido. La catena di trasporto mitocondriale può, quindi, cedere un elettrone all'ossigeno, mediante il radicale semichinone dell'ubichinone<sup>28-29</sup>.

Il radicale superossido che ne risulta può dare inoltre origine al perossido di idrogeno, attraverso una reazione di dismutazione catalizzata dalla superossido dismutasi (equazione 1).

Si ritiene comunemente che la generazione mitocondriale di O<sup>•</sup><sub>2</sub> rappresenti la maggior fonte intracellulare di radicali dell'ossigeno in condizioni fisiologiche.

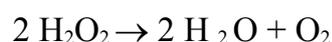
L'importanza assunta dai mitocondri nella produzione di ROS è evidenziata dagli effetti della carenza di enzimi antiossidanti, quali:

- La superossido dismutasi (SOD);
- La catalasi (CAT);
- La glutazione perossidasi (GPX);

La SOD catalizza la conversione O<sup>•</sup><sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>30</sup>, tramite l'equazione 1 in modo da prevenirne l'azione tossica sui tessuti.

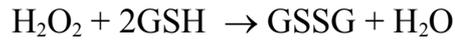
Vi sono due tipi di superossido dismutasi, una Mn-dipendente localizzata nei mitocondri; l'altra Cu- e Zn-dipendente localizzata nel citoplasma.

L' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta deve essere convertita in H<sub>2</sub>O per impedire che i complessi degli ioni metallici la convertano in •OH ; l'enzima deputato a questo è la CAT<sup>31</sup> tramite la seguente reazione:



L' attività di questo enzima aumenta all'aumentare della produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La GPX rimuove l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>31</sup> tramite il glutazione (GSH) :



La glutatione perossidasi è costituita da quattro subunità proteiche, ciascuna delle quali contiene nel sito attivo un atomo di selenio come selenocisteina<sup>32</sup>, per cui tracce di Se sono essenziali nella dieta. Questo enzima è presente in tutti i tessuti, particolarmente in quelli a basso contenuto di CAT (muscolo e regioni del cervello). Il fegato invece contiene alte concentrazioni di entrambi gli enzimi.

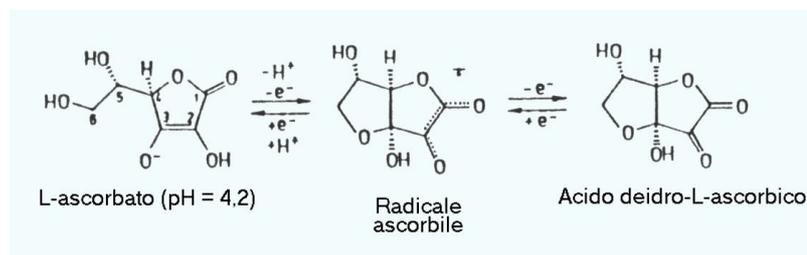
L'efficienza del sistema GPX-GSH richiede la riconversione del GSSG (glutatione ossidato) a GSH catalizzata dalla glutatione riduttasi (GR), la quale mantiene il rapporto GSH/GSSG ad un livello alto (> 10 : 1).



La reazione richiede NADPH che è prodotto nel ciclo dei pentosi-fosfato, mediante l'intervento sia della glucosio-6-fosfato deidrogenasi che della 6-fosfogluconato deidrogenasi.

Il meccanismo di difesa contro i radicali liberi può essere effettuato non solo dall'azione degli enzimi antiossidanti ma anche attraverso antiossidanti esogeni che provengono dall'alimentazione come l'acido ascorbico (o vitamina C) e tocoferolo (o vitamina E).

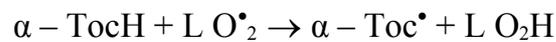
La vitamina C è il più importante antiossidante dei fluidi extracellulari. L'ascorbato (Asc) riduce  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando il radicale monodeidro-ascorbato (radicale ascorbile), la cui relativa stabilità e la dismutazione ad asorbato e deidroascorbato è alla base dell'attività antiossidante dell'acido ascorbico (Figura 1.5).



**Fig.1.5. Attività antiossidante acido ascorbico**

Esso è in grado di proteggere dall'azione dei radicali perossilici ed in vitro è stato osservato che contrasta l'ossidazione delle LDL contribuendo a mantenere bassa la pressione arteriosa.

La vitamina E è abbondante nella membrana mitocondriale e svolge un ruolo antiossidante nella prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, evento chiave nello sviluppo del processo di perossidazione lipidica, donando un elettrone ai radicali perossilipidici e rendendoli in tal modo meno reattivi. Durante questa reazione l' $\alpha$ -tocoferolo perde un elettrone formando il radicale  $\alpha$ -tocoferossile, che è relativamente stabile poiché l'elettrone spaiato è fortemente delocalizzato.



A questo punto il radicale  $\alpha$ -tocoferossilico può reagire con la vitamina C o con il glutatione riformare l' $\alpha$ -tocoferolo.

## CAPITOLO 2.

### GLI ORMONI TIROIDEI.

#### 2.1 La tiroide: biosintesi, rilascio e azione degli ormoni tiroidei.

La tiroide è una ghiandola di grandi dimensioni, posta nella regione anteriore del collo, in posizione mediana davanti alla laringe e alla trachea.

Essa è costituita da due lobi piriformi, destro e sinistro, uniti da una ristretta parte trasversale di tessuto, chiamata istmo (Figura 2.1).



**Fig. 2.1. struttura della tiroide**

La tiroide, essendo una ghiandola endocrina, produce delle sostanze, gli ormoni tiroidei, che vengono direttamente riversati nel torrente ematico. Gli ormoni tiroidei, propriamente detti, sono peptidi contenenti iodio, e sono la tiroxina (T4) e la triiodotironina (T3). Tali ormoni sono essenziali per la vita e hanno molteplici effetti sul metabolismo corporeo, sulla crescita e sullo sviluppo.

La tiroide è uno degli organi più abbondantemente vascolarizzati ed è costituita da tante piccole formazioni rotondeggianti: i follicoli. Ogni follicolo è costituito da un singolo strato di cellule epiteliali cubiche, i tireociti, che sono deputati alla produzione e secrezione ormonale.

Nella tiroide viene inoltre prodotto un altro ormone, la calcitonina, implicato nella regolazione del metabolismo del calcio e del fosforo, che viene sintetizzato da specifiche cellule, le cellule C parafollicolari.

Lo iodio è il componente principale degli ormoni tiroidei ed è essenziale per la loro produzione. Lo iodio si assume con gli alimenti e con l'acqua.

La cellula tiroidea, il tireocita, rilascia una sostanza glicoproteica, la tireoglobulina, che costituisce la forma di immagazzinamento degli ormoni tiroidei e dei loro precursori. La tireoglobulina è una proteina omodimerica di 660 KDa ad alto contenuto di residui di tirosina, che favorisce l'accumulo degli ormoni nel lume follicolare sotto forma di materiale colloidale (colloide) e che vengono, poi, liberati a seconda delle esigenze dell'organismo, per poter esplicare le diverse funzioni. Il gene responsabile della sintesi della tireoglobulina è situato sul cromosoma 8. La tireoglobulina, quindi, viene prodotta all'interno del tireocita e poi secreta sotto forma di vescicole nel follicolo dove potrà subire il processo di iodinazione.

Esistono cinque fasi nel processo di formazione delle iodotironine:

- captazione dello iodio;
- ossidazione dello iodio;
- incorporazione dello iodio nella tireoglobulina e formazione di monoiodotirosina (MIT) e diiodotironina (DIT);
- accoppiamento di MIT e DIT con formazione di T3 e T4;
- liberazione di T3 e T4 nel torrente ematico.

Il trasporto dello iodio inorganico, presente nel sangue, all'interno della tiroide è un trasporto attivo in quanto la concentrazione dello iodio plasmatico è molto inferiore a quella interna della tiroide, che contiene circa il 90% di tutto lo iodio dell'organismo; si tratta di un co-trasportatore sodio-ioduro localizzato sulla membrana basale delle cellule epiteliali tiroidee. Le cellule follicolari assorbono,

quindi, lo iodio introdotto con la dieta sottoforma di ioduro ( $I^-$ ), in un processo stimolato dal TSH (thyroid-stimulating hormone).

Una volta captato lo iodio viene ossidato e quindi incorporato nella tireoglobulina. C'è un enzima importante in queste fasi la TPO, la tireoperossidasi tiroidea, un enzima di membrana che svolge un ruolo importante sia nell'ossidazione dello iodio inorganico, sia nella sintesi delle iodotirosine: monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) (Figura 2.2).

La MIT e la DIT, non sono libere, ma fortemente comprese nella grande molecole di tireoglobulina e il loro accoppiamento produce la formazione degli ormoni tiroidei. In particolare, una molecola di MIT e una di DIT si accoppiano a formare la *3,5,3'-triiodotironina*, o T3 e la *3,5',3'-triiodotironina* o rT3, mentre due molecole di DIT si accoppiano a formare la *tetraiodotironina*, detta anche tiroxina o T4 (Figura 2.3).

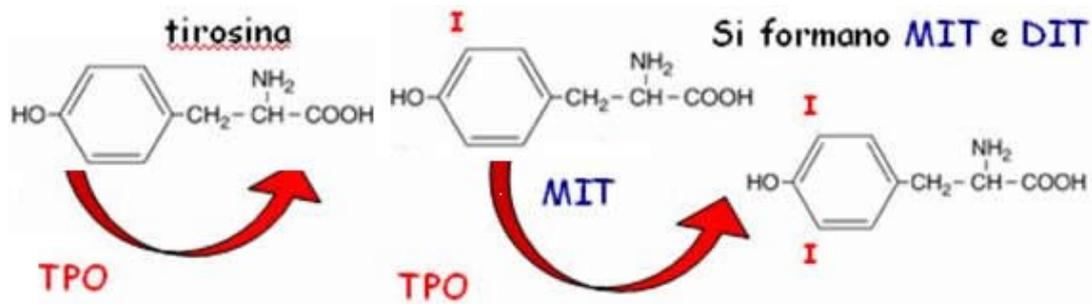


Fig. 2.2. Formazione di MIT e DIT.

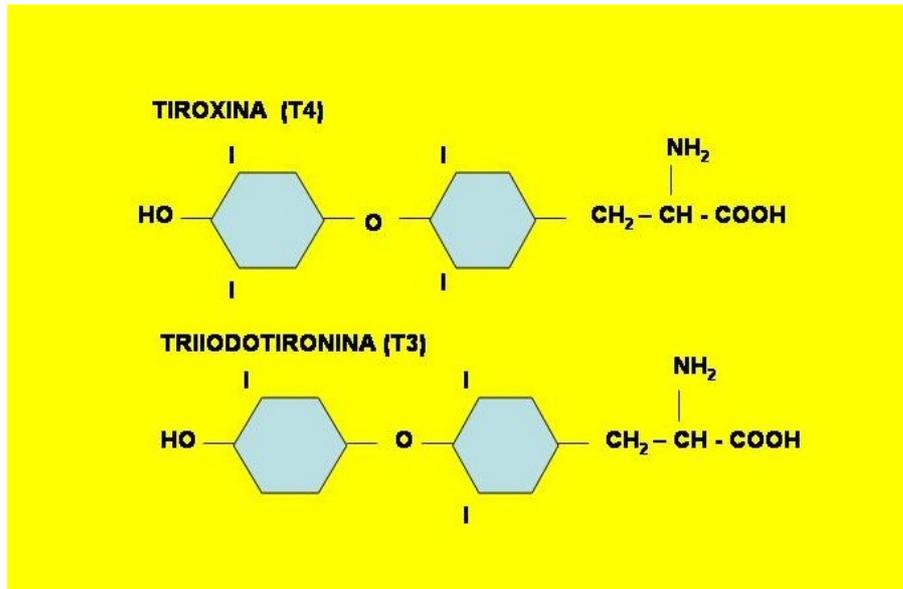


Figura. 2.3. T3 e T4

Il rilascio di T4 e T3 nel torrente ematico richiede l'idrolisi della tireoglobulina. Quest'ultima, quindi, passa dal lume del follicolo all'interno delle cellule tiroidee, mediante endocitosi della colloide. Le goccioline di colloide all'interno del citoplasma si muovono verso la parte basale e si fondono con enzimi lisosomiali che provvedono alla proteolisi della tireoglobulina con liberazione di T3 e T4 che vengono, infine, rilasciati nel circolo sanguigno. Le molecole di MIT e DIT, anch'esse liberate in seguito alla proteolisi della tireoglobulina, vengono deiodinate all'interno della cellula follicolare in modo tale da permettere il recupero dello iodio, che verrà successivamente riutilizzato nella sintesi delle iodotironine.

La solubilità plasmatica degli ormoni tiroidei è però limitata; essi sono, infatti, presenti in circolo legati a proteine: l'albumina, la prealbumina (TBPA) e la globulina (TBG). La TBPA e l'albumina presentano bassa affinità per questi ormoni, quindi, ne determinano un rapido rilascio; la globulina, al contrario, mostra elevata affinità per cui le rilascia lentamente<sup>33-34</sup>. Oltre ad essere utili per il trasporto degli ormoni tiroidei, queste proteine servono, a costituire un vero e

proprio deposito circolante di ormoni tiroidei. L'attività biologica degli ormoni tiroidei dipende, però, dalle cosiddette frazioni libere FT3 ed FT4, che ne costituiscono lo 0.03% di ormoni circolanti e quindi non legati a proteine.

In un primo momento si pensava che gli ormoni tiroidei, data la loro natura lipofila, potessero penetrare liberamente nelle cellule, ma in realtà questi ormoni vengono internalizzati nelle cellule mediante l'utilizzo di carrier specifici presenti sulla membrana plasmatica cellulare oppure tramite endocitosi mediata da proteine<sup>35</sup>. E' noto, infatti, che gli ormoni tiroidei si legano a proteine con massa molecolare compresa tra 30 e 70 KDa presenti sulla membrana plasmatica di diversi tipi cellulari<sup>36</sup>.

Recentemente è stato clonato un trasportatore appartenente alla famiglia dei carrier degli aminoacidi monocarbossilici (MCT8) che presenta elevata attività di trasporto ed alta specificità per la T3<sup>37</sup>. Inoltre, nel ratto, la captazione dell'ormone sembra essere mediata dal trasportatore degli acidi grassi: esso sarebbe in grado di trasportare sia gli acidi grassi a lunga catena che le iodotironine.

## 2.2 Regolazione della secrezione degli ormoni tiroidei: asse ipotalamo-ipofisi-tiroide.

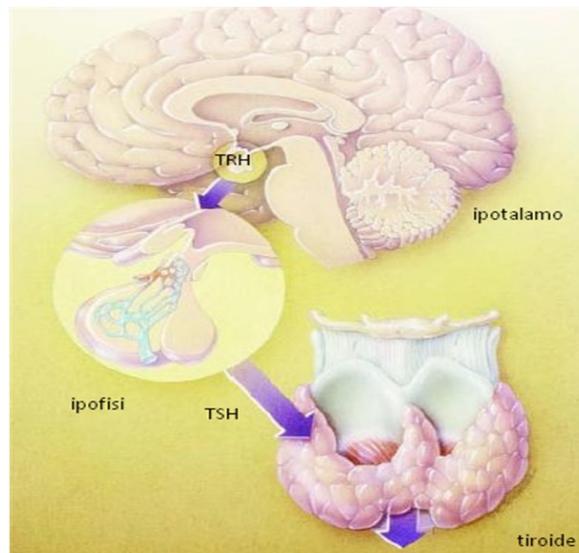
La sintesi e la secrezione degli ormoni tiroidei è regolata da un sofisticato sistema di controllo, formato dall'ipotalamo e dall'ipofisi (figura 2.4). L'**ipotalamo** e l'**ipofisi** sono due strutture anatomiche, strettamente collegate fra loro, situate alla base del cranio. Si tratta di due strutture che rappresentano la più importante area di interconnessione fra il sistema nervoso e il sistema endocrino da cui partono gli impulsi e gli stimoli ormonali che governano l'intero **sistema endocrino**. L'ipotalamo è un'area particolare posta alla base del cervello, mentre l'ipofisi è un'area più piccola, ma è un'importantissima ghiandola endocrina situata proprio sotto l'ipotalamo.

Il ruolo dell'ipotalamo è quello di secernere l'ormone di rilascio della tireotropina (TRH), il quale va a stimolare il rilascio di tireotropina (TSH) da parte dell'ipofisi.

L'ormone TSH è costituito da due subunità:

- $\alpha$  aspecifica, che si ritrova anche in altri ormoni (FSH, LH);
- $\beta$  specifica, che conferisce alla molecola la sua attività biologica;

Il TSH agisce a livello di recettori posti sulla membrana delle cellule follicolari tiroidee, attivando, tramite una proteina G, l'adenilato ciclasi, che permette la produzione di cAMP, il quale, agendo come secondo messaggero, media gli effetti stimolati dal TSH quali: la sintesi di tireoglobulina, l'intrappolamento dello iodio, l'endocitosi della colloide, la proteolisi della tireoglobulina e la liberazione degli ormoni tiroidei.



**Figura. 2.4. Asse ipotalamo-ipofisi-tiroide.**

Tra il sistema ipotalamo-ipofisi e la tiroide vi è un continuo scambio di informazioni per mantenere nei limiti della norma i livelli di ormoni tiroidei nel sangue, infatti aumentando i livelli degli ormoni circolanti si blocca la secrezione del TSH; invece quando i livelli di tali ormoni si riducono, la secrezione del TSH aumenta. Questo meccanismo di regolazione è definito “feedback negativo” (*autoregolazione*).

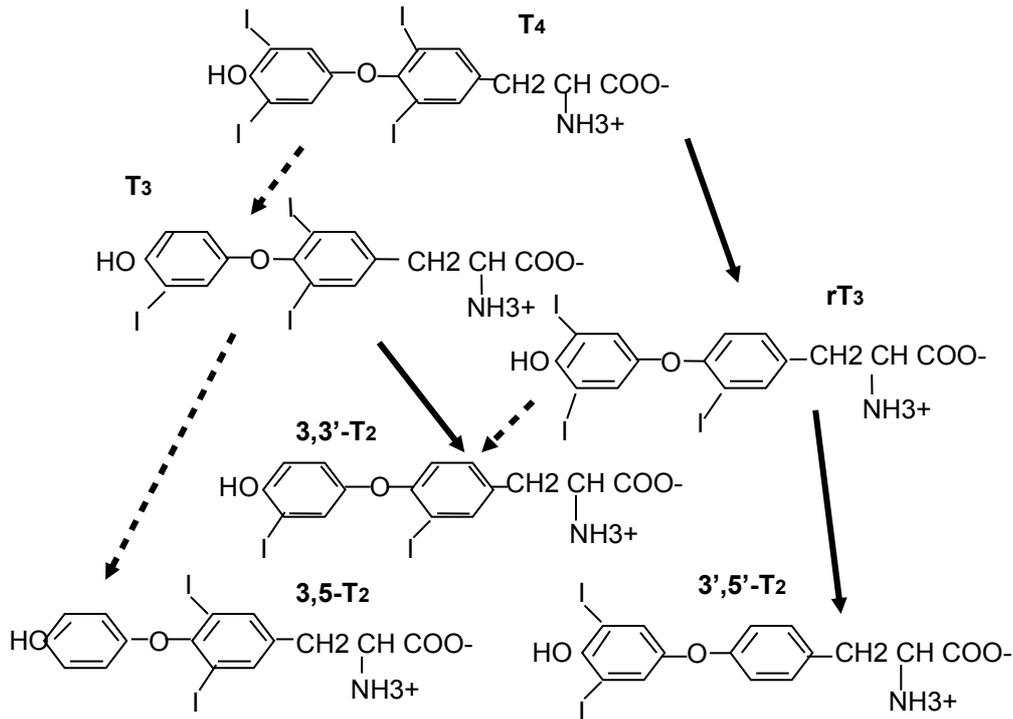
### **2.3 Metabolismo periferico degli ormoni tiroidei: la deiodinazione**

La tiroide produce per il 90% l’ormone tiroxina (T4) e solo per il 10% l’ormone triodo-L-tironina (T3).

Per anni si è ritenuto erroneamente che la T4 fosse l’ormone attivo, ma oggi è noto che la T3 è il principale mediatore dell’attività tiroidea sulle cellule bersaglio. La tiroide produce anche la 3,5,3’-triiodotironina, o T3 reverse, ma in quantità minima (5%) ed è comunque inattiva; la restante parte deriva dalla deiodinazione periferica della T4<sup>38</sup>. Nel siero, inoltre, sono presenti altre

iodotironine: si tratta di tre diiodotironine (3,3'-T2, 3,5-T2 e 3',5'-T2) e di due monoiodotironine (3'-T1 e 3-T1).

La principale via del metabolismo dell'ormone tiroideo è la *deiodinazione*<sup>39</sup> (Figura 2.5), infatti la produzione giornaliera di T3 corrisponde al 20% della sua produzione totale, mentre il restante 80% deriva dalla deiodinazione nei tessuti periferici di T4 in T3.



**Fig. 2.5. Deiodinazione periferica delle iodotironine**

(le linee tratteggiate rappresentano la deiodinazione dell'anello esterno).

Per deiodinazione dell'anello fenolico esterno, la tiroxina viene convertita in T3; la deiodinazione dell'anello tirosilico interno, invece, porta alla formazione di rT3. Entrambe le triiodotironine possono essere ulteriormente deiodinate con produzione delle diiodotironine presenti nel siero: la T3 potenzialmente produrrebbe 3,3'-T2 e 3,5-T2, mentre la rT3 produrrebbe 3,3'-T2 e 3',5'-T2.

La deiodinazione è operata da una serie di enzimi denominati iodotironine deiodinasi (ID) di cui ne sono stati individuati tre tipi.

### **Deiodinasi I (ID-I)**

La iodotironina deiodinasi di tipo I è presente nel fegato e nel rene, ed è localizzata, inoltre, nel reticolo endoplasmatico delle cellule epatiche e nella membrana plasmatica delle cellule renali e di quelle tiroidee. Questo enzima richiede tioli, quali il ditiotriolo (DTT), come cofattori in vitro ed il glutatione come cofattore in vivo<sup>39</sup>. Agisce sia sull'anello interno che su quello esterno delle iodotironine e, sebbene esibisca una preferenza per la rT3 come substrato, è importante per la produzione periferica di T3 dalla T4. L'attività della ID-1 è inibita dai tiouracili, come il propiltiouracile (PTU), e dall'acido iopanoico (IOPA). La sua espressione, inoltre, è ridotta in caso di ipotiroidismo ed è, invece, incrementata durante l'ipertiroidismo.

### **Deiodinasi II (ID-II)**

La iodotironina deiodinasi di tipo II è presente soprattutto a livello del cervello, dell'ipofisi, del BAT e della placenta. Nell'uomo si ritrova anche nella tiroide, nel cuore e nel muscolo scheletrico<sup>40</sup>; questo enzima ha esclusivamente attività deiodinasi dell'anello esterno ed è, quindi, importante per la produzione intracellulare della T3 in questi tessuti<sup>41</sup>. Inoltre mantiene un livello costante di T3 nel sistema nervoso centrale.

In caso di ipotiroidismo, tuttavia, la produzione dell'ormone, attraverso la conversione di T4, mediante ID-II, può diventare una fonte importante di T3 circolante.

La sua attività enzimatica è alta nell'ipotiroidismo e bassa nell'ipertiroidismo. La ID-II è insensibile al PTU, ma è inibita dall'acido iopanoico sia in vivo che in vitro<sup>42</sup>.

### **Deiodinasi III (ID-III)**

La iodotironina deiodinasi di tipo III, presente nel cervello, nella pelle, nella placenta ed in alcuni tessuti fetali<sup>43-44</sup>; ha soltanto attività deiodinasi dell'anello

interno e permette, quindi, la produzione della rT3 a partire dalla T4. La sua attività è inibita dallo IOPA.

## 2.4 Le funzioni degli ormoni tiroidei.

Gli ormoni tiroidei hanno molteplici funzioni che si esplicano già nelle prime fasi di sviluppo del *bambino*:

- regolano lo sviluppo cerebrale del feto e del lattante;
- sono necessari per lo sviluppo dello scheletro fetale;
- sono indispensabili per il normale accrescimento corporeo del bambino;
- la maturazione dei vari apparati.

Inoltre regolano l'attività metabolica dell'*adulto* influenzando la funzione di ogni organo e tessuto, in particolare:

-regolano il metabolismo glucidico favorendo la glicogenolisi e la gluconeogenesi, in particolare la T3 agisce sulla degradazione delle proteine per formare amminoacidi che vengono utilizzati per la gluconeogenesi. Gli ormoni tiroidei, inoltre, aumentano l'attività degli enzimi coinvolti nell'ossidazione del glucosio;

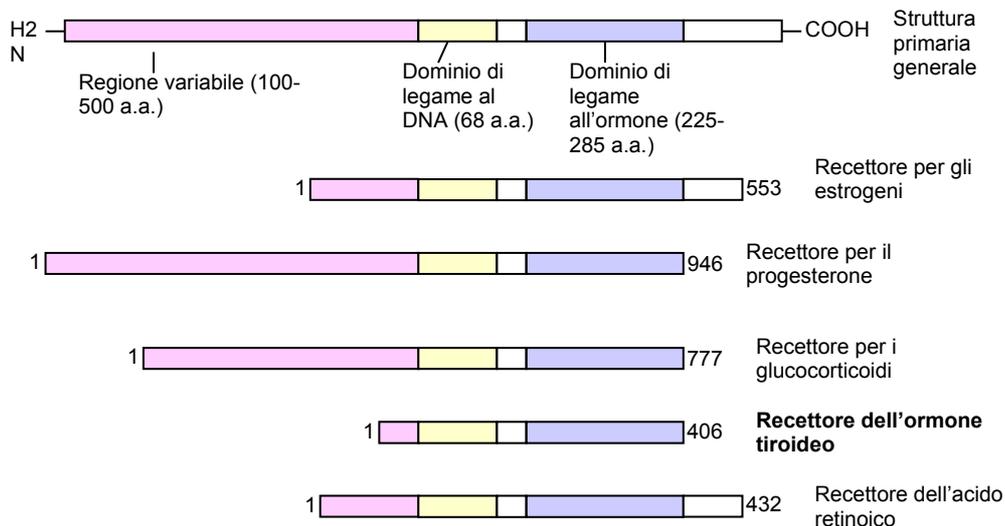
- stimolano sia la lipolisi (utilizzo di grasso a scopo energetico), sia la lipogenesi (sintesi di tessuto adiposo), con effetto prevalente sulla lipolisi;
- regolano la sintesi proteica;
- hanno effetti sul sistema cardiovascolare;
- regolano la produzione dei globuli rossi agendo sull'ormone eritropoietina;
- hanno azione termogenica.

Quest'ultima è una delle funzioni principali degli ormoni tiroidei, in quanto aumentano il consumo di ossigeno in diversi tessuti e ciò comporta una maggior produzione di calore e di conseguenza un aumento del metabolismo basale. Esperimenti compiuti nel 1960 da Tata e collaboratori<sup>45-46-47</sup> hanno, infatti, dimostrato che la somministrazione di T3 in ratti ipotiroidei induceva il

disaccoppiamento della catena di trasporto degli elettroni a livello mitocondriale e ciò stimolava il tasso metabolico basale. Tale meccanismo veniva, invece, bloccato dalla simultanea somministrazione di actinomicina D, un soppressore della sintesi proteica.

## 2.5 I recettori degli ormoni tiroidei.

All'inizio degli anni '70 Oppenheimer e collaboratori sono stati i primi a descrivere la presenza di specifici siti di legame a livello nucleare con alta affinità per T3 a livello del fegato e del rene di ratto<sup>48</sup>. In seguito tali siti sono stati trovati anche in altri tessuti e colture cellulari<sup>49</sup>. Nel 1986, due gruppi di lavoro hanno riportato l'identificazione del proto-oncogene cellulare c-erbA che codifica per il recettore dell'ormone tiroideo<sup>50</sup> (TR), appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari<sup>51</sup> che include i recettori per gli estrogeni, progesterone, glucocorticoidi, acido retinico, vitamina D3 e proliferatori perossisomiali<sup>52</sup>. Tale recettore è intimamente associato alla cromatina e lega l'ormone con un'alta affinità e specificità<sup>53</sup> (Figura 2.6).



**Fig. 2.6. Struttura di alcuni membri della superfamiglia dei recettori nucleari.**

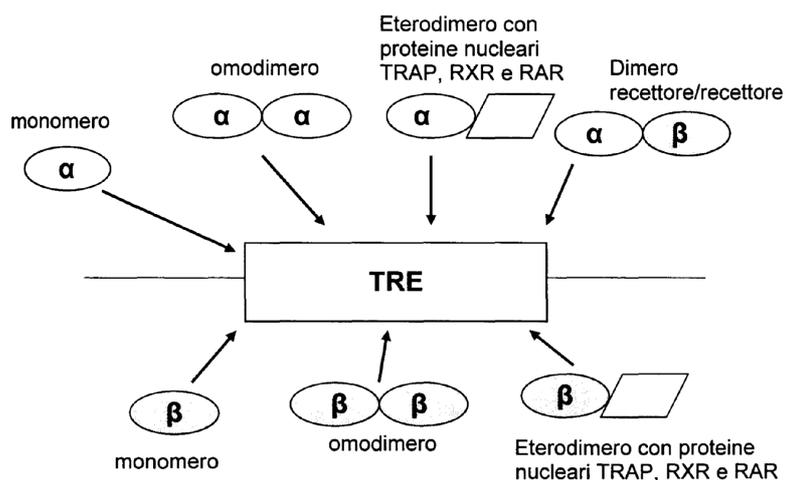
Il numero di questi recettori varia a seconda del tipo di tessuto: il fegato, l'ipofisi, il rene, il cuore, il cervello ne hanno molti; al contrario, la milza, i testicoli possiedono un numero di recettori molto più basso.

Sono stati individuati due geni, c-erbA (TR $\alpha$ ) e c-erbB (TR $\beta$ ) che codificano per differenti isoforme dei recettori per le iodotironine:  $\alpha$ , localizzato sul cromosoma 7 e  $\beta$  localizzato sul cromosoma 3. Il gene  $\alpha$  dà origine, per splicing alternativo, a tre isoforme recettoriali ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3) che differiscono per la regione C-terminale a valle del residuo aminoacidico 370. Le isoforme  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3 non sono funzionali perché non sono in grado di legare l'ormone, dato che il sito di legame risiede proprio nella regione C-terminale. Anche il trascritto primario del gene  $\beta$  va incontro a splicing alternativo con produzione delle isoforme  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2, entrambe funzionali.

La T3 entra nelle cellule e migra al nucleo, dove si lega al suo recettore; il complesso T3-recettore regola l'attività di geni bersaglio, modulandone la trascrizione e legando, in genere, siti specifici sul DNA conosciuti come elementi responsivi all'ormone tiroideo (TREs) presenti nella vicinanza dei geni bersaglio di T3. Questi elementi contengono due copie di una sequenza generale abbastanza conservata: AGGTCA.

I TR sono presenti sotto forma di monomeri, omodimeri, dimeri  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 ed eterodimeri con proteine ausiliarie (TRAP) che incrementano il legame con i TRE<sup>54-55</sup>.

I TR formano eterodimeri anche con il recettore dell'acido retinoico e con il recettore per il retinoide (RAR e RXR); l'eterodimerizzazione incrementa il legame con gli elementi responsivi (Figura 2.7).



**Fig. 2.7. I TR riconoscono i siti di legame sul DNA (TRE) in forma di monomeri, omodimeri ed eterodimeri.**

## 2.6 Effetti trascrizionali e post-trascrizionali della T3.

La T3 attiva la trascrizione dei geni codificanti per i componenti della catena respiratoria mitocondriale; questo ormone, legandosi ai propri recettori, stimola l'espressione di fattori di trascrizione, fattori respiratori nucleari (NRF), che inducono l'espressione di proteine mitocondriali, come quelle della catena di trasporto degli elettroni, stimola l'espressione delle proteine del sistema della fosforilazione ossidativa e degli enzimi coinvolti nella loro sintesi. Un altro importante fattore di trascrizione è GABP/NRF-2, un attivatore dei geni che codificano per le subunità della citocromo ossidasi<sup>56</sup>. Inoltre, la T3 influenza indirettamente l'attività dei mitocondri attraverso la regolazione dei componenti dell'apparato respiratorio codificati dal nucleo e attraverso effetti sull'espressione nucleare di specifici fattori di trascrizione mitocondriali come gli mtTFA<sup>57</sup>, incrementando l'espressione dei componenti dell'apparato respiratorio codificati dal mt-DNA. Dunque la principale modalità d'azione dell'ormone tiroideo è quella nucleare: la T3 è responsabile dell'aumento del metabolismo di riposo con un "effetto a lungo termine", mediato dalla sintesi proteica.

Gli ormoni tiroidei non influenzano, però, l'espressione genica soltanto a livello della trascrizione, ma anche a livello della formazione dell'mRNA maturo, del suo trasporto al compartimento citosolico e del suo turn-over. Inoltre, influenzano la sintesi proteica, stimolano il sistema di trasporto del calcio, (tale effetto è stato evidenziato negli eritrociti, ma anche in cellule nucleate di tessuti quali il fegato, il cuore e il rene), il quale può, in seguito, provocare effetti sul metabolismo osservati, ad esempio, al livello dell'attività dell'adenilato ciclasi<sup>58</sup>. In più, l'effetto degli ormoni tiroidei si riflette anche sul numero dei mitocondri, sul contenuto dei citocromi, sull'area della superficie interna mitocondriale e sulla velocità respiratoria.

Proprio per quanto riguarda la velocità respiratoria mitocondriale è stato dimostrato che la T3 è in grado di influenzare sia lo stato 4 (respirazione basale) che lo stato 3 (respirazione con sintesi di ATP). Influenza lo stato 3, attraverso la stimolazione dei processi che coinvolgono la fosforilazione e l'esporto dell'ATP<sup>59</sup>, grazie all'induzione dell'ANT<sup>60</sup>.

L'effetto sullo stato 4, inoltre, sembra dovuto all'incremento della perdita protonica, attraverso la membrana mitocondriale interna (proton leak)<sup>61</sup>.

L'aumento della velocità respiratoria mitocondriale è osservabile anche dopo pochi minuti dalla somministrazione di T3. Un meccanismo capace di spiegare il rapido effetto dell'ormone prevede una sua interazione diretta con recettori mitocondriali.

## **2.7 Recettori mitocondriali per la T3.**

Diversi studi hanno dimostrato che esistono, a livello mitocondriale, delle proteine che avrebbero il ruolo di recettori, in quanto in grado di legare l'ormone tiroideo.

Alcuni autori hanno isolato una proteina con massa molecolare di 28 KDa che mostra elevata affinità per la T3. Poiché l'ANT isolata da cuore bovino lega la T3 con elevata affinità e bassa capacità di legame<sup>62</sup>, fu ipotizzato che potesse

essere il recettore mitocondriale identificato da Sterling. Tuttavia la sequenza di 28 KDa relativa alla proteina che lega la T3 nella membrana interna non presenta similitudine con la sequenza dell'ANT che è di circa 30 KDa.

Goglia e coll. (1981)<sup>63</sup> hanno evidenziato ed isolato dei siti di legame per l'ormone tiroideo da mitocondri di fegato di ratto. Il legame della T3 con i mitocondri è stato evidenziato su una frazione mitocondriale arricchita di membrane mitocondriali interne. Inoltre, tali siti di legame presentano caratteristiche differenti dagli altri siti cellulari. I siti estratti dalla membrana mitocondriale interna, al contrario dei siti nucleari, non mostrano dipendenza dagli agenti riducenti e presentano una differente affinità per gli analoghi, specialmente per la 3,3'-T2, verso cui hanno una maggiore affinità.

Ricerche successive<sup>64</sup>, effettuate con tecniche autoradiografiche, hanno dimostrato che, in vivo, la T3 radioattiva si lega ai mitocondri.

Mediante western blotting, sono state identificate due bande proteiche di 48 e 55 KDa in estratti mitocondriali già identificate come recettori nucleari per T3. Gli mRNA che codificano per le suddette subunità dei recettori per l'ormone tiroideo, sono stati localizzati nella matrice citoplasmatica, non nei mitocondri, suggerendo che tali recettori, codificati dal nucleo, provengano da un pool di precursori polipeptidici citoplasmatici che potrebbero essere trasportati nel mitocondrio. Sono poi stati individuati due siti di legame per la T3 situati nella membrana interna e nella matrice dei mitocondri<sup>65</sup>. Siti di legame per la T3 sono stati identificati anche nella membrana mitocondriale esterna.

## **2.8 Recettori citosolici per T3.**

Proteine capaci di legare la T3 sono state identificate anche nel citosol di cellule costituenti diversi tessuti. L'affinità con cui queste proteine legano l'ormone tiroideo, però, è risultata essere più bassa rispetto a quella dei recettori nucleari. Probabilmente il ruolo di tali proteine è quello di creare una riserva di T3 nella cellula<sup>66</sup>. Tali proteine sono dette CTBP e alcune dipendono dalla

presenza di NADPH. È stata identificata una CTBP di 58 KDa, purificata dal rene di ratto. Quando essa lega il NADPH permette la traslocazione dell'ormone tiroideo nel mitocondrio. In vitro questa proteina inibisce il legame della T3 con il nucleo forse perché il suo ruolo è quello di trasportare T3 al mitocondrio e non al nucleo, a cui però è capace di legarsi se lega NADP e DTT<sup>67</sup>.

Un'altra CTBP è stata identificata nelle cellule astrogliali di ratto in coltura. È una proteina di 65 KDa dipendente anch'essa dalla presenza di NADPH. Quando il NADPH viene ossidato, tale proteina non lega la T3, anzi ne promuove il rilascio.

Anche nel fegato di ratto è stata evidenziata una CTBP, dipendente dal NADPH, legante due molecole di T3 su ogni sua subunità.

Nell'uomo sono state evidenziate altre proteine citoplasmatiche che legano l'ormone tiroideo. Una di queste CTBP ha una massa molecolare di 58 KDa ed è una subunità dell'enzima piruvato chinasi, indipendente dal NADPH<sup>68</sup>. Un'altra proteina umana che lega la T3, isolata dal rene dell'uomo<sup>69</sup> ha massa molecolare di 38 KDa e lega la T3 grazie al NADPH, ma non in presenza del NADP.

## CAPITOLO 3.

### LA 3,5-DIIODO-L-TIRONINA (T2).

#### 3.1 La 3,5-diiodo-l-tironina e i suoi effetti sul metabolismo energetico.

Sebbene molti degli effetti mitocondriali restino incerti e controversi, è pensabile che gli effetti nucleari ed extra-nucleari siano temporalmente coordinati e che essi possano essere mediati, oltre che dalla T3, anche da altre iodotironine.

Oggi è noto che, oltre a T3 e T4, altre iodotironine, da sempre considerate solo molecole inattive prodotte dal metabolismo periferico della T3, possono controllare il metabolismo di riposo. Tra queste emergono le diiodotironine ed, in particolare, la T2 (3,5-diiodo-L-tironina).

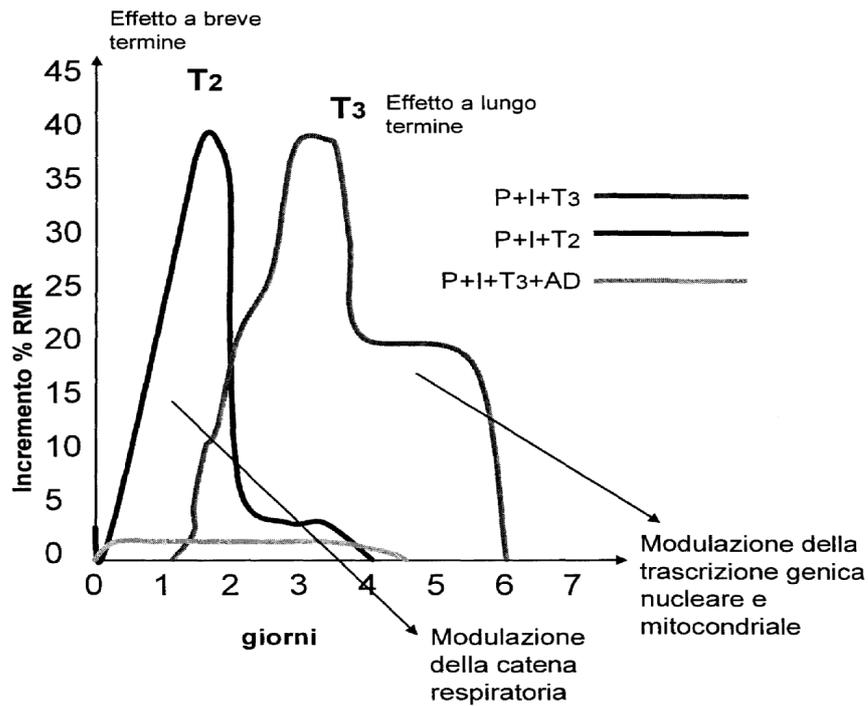
Alcuni studi hanno dimostrato che frazioni mitocondriali arricchite di membrane interne isolate da fegato presentavano siti di legame per la T3, siti che mostravano elevata affinità per la 3-5'-diiodotironina<sup>63</sup>. Circa dieci anni dopo fu evidenziato che la T2, come la T3, a concentrazione pari a 1pM, provoca una rapida stimolazione (pochi minuti) del consumo di ossigeno nel fegato perfuso ottenuto da ratti ipotiroidei<sup>70</sup>.

Tuttavia l'effetto della T3, ma non quello della T2, era abolito dalla presenza di un inibitore dell'attività della deiodinasi di tipo 1, suggerendo che gli effetti della T3 fossero il risultato della sua conversione a T2.

Successivamente furono condotti molti studi per comprendere gli effetti della T2 sul metabolismo energetico, sulla respirazione cellulare e su quella mitocondriale. La somministrazione di una singola dose di T2 ha un effetto più rapido sulla respirazione mitocondriale rispetto alla T3, in quanto l'effetto della prima è evidente già dopo un'ora, mentre quello della T3 dopo 24 ore<sup>71</sup>.

Inoltre, l'effetto della T2 è indipendente dalla sintesi proteica in quanto è evidente anche in presenza di cicloesimide<sup>72</sup>. Ciò ha suggerito che gli effetti della

T2 fossero mediati da un'interazione diretta con i mitocondri, mentre quelli della T3 fossero il risultato della sua azione a livello nucleare<sup>73</sup>. Sembra, dunque, che gli effetti della T2 sul metabolismo siano soprattutto extranucleari. L'effetto della T2 sulla velocità del consumo di ossigeno mitocondriale ha suggerito che la stessa iodotironina potesse avere un effetto sul metabolismo energetico dell'intero animale. Tale ipotesi fu confermata da risultati ottenuti da Lanni e collaboratori (1997)<sup>74</sup>. Tali autori iniettarono una singola dose di diiodotironina a ratti ipotiroidei che presentavano l'attività degli enzimi deiodinasi bloccata ed esaminarono i cambiamenti nella velocità del metabolismo di riposo (RMR). In effetti, l'RMR degli animali ipotiroidei, che era significativamente ridotto rispetto a quello degli animali eutiroidei, rispondeva in maniera differente in seguito alla somministrazione di T3 o T2 (entrambe alla dose di 25 µg / 100 g pc). La T3, infatti, induceva un incremento nell'RMR di quasi il 35% che iniziava 25-30 ore dopo la somministrazione della iodotironina, raggiungeva un massimo valore a 50-75 ore e si prolungava fino a 5-6 giorni dopo la somministrazione. L'iniezione della T2 alla stessa dose induceva una risposta diversa con incremento dell'RMR (di quasi il 40%) che iniziava tra 6 e 12 ore dopo la somministrazione, raggiungendo un picco a 24-30 ore e terminando quasi dopo 48 ore. Inoltre, se le iodotironine venivano somministrate simultaneamente all'actinomicina D, la stimolazione dell'RMR da parte di T3 era quasi completamente abolita, mentre quella indotta dalla T2 non causava alcuna attenuazione della stimolazione rilevata dalla T2<sup>75</sup>. Tali dati sostengono l'ipotesi di un meccanismo d'azione della T2 indipendente dal nucleo (Figura 3.1).



**Fig. 3.1.** Descrizione dei meccanismi proposti per gli effetti di T3 e T2 sull'RMR. Sono stati misurati gli effetti sull'RMR di una singola iniezione di T2 o T3 in animali resi ipotiroidici in seguito al trattamento con PTU e IOPA (P+I). In queste condizioni la T2 e la T3 incrementano l'RMR sebbene i loro effetti differiscano in termini di time course e di dipendenza dalla sintesi proteica. La T3 agisce tramite un pathway mediato dal nucleo: il suo massimo effetto si rileva dopo 2-3 giorni e viene completamente bloccato dalla simultanea somministrazione di actinomicina D. Al contrario, la T2 stimola l'RMR in modo rapido: il suo massimo effetto si rileva già dopo un giorno ed è insensibile all'actinomicina D.

La rapida capacità eccito-metabolica della T2, indipendente dalla trascrizione, ha suggerito che essa potesse essere coinvolta in situazioni in cui è richiesta una rapida produzione di calore, quale ad esempio, l'esposizione al freddo, ma attraverso differenti meccanismi<sup>76</sup>. In ratti ipotiroidici esposti ad una temperatura di 4°C, sia la T3 che la T2 (somministrate cronicamente) aumentano la spesa energetica dell'animale e stimolano l'attività della citocromo ossidasi (COX) di tessuti metabolicamente molto attivi come il cuore, il muscolo scheletrico, il fegato ed il BAT.

Un importante esperimento sull'effetto metabolico esercitato in vivo dalla T2 fu condotto da Cimmino e collaboratori (1996)<sup>77</sup> che monitorarono la spesa energetica giornaliera, attraverso la misura del consumo di ossigeno e la produzione di biossido di carbonio, dell'animale in toto. Tali autori evidenziarono che la somministrazione di T3 o di T2 a ratti ipotiroidei ripristinava il valore della spesa energetica caratteristica degli animali. Lo stesso studio indicava che la T2 è in grado di stimolare significativamente la  $\beta$ -ossidazione lipidica.

Nonostante gli effetti in vivo della T2 su animali ipotiroidei siano chiari e riproducibili, la somministrazione della stessa a ratti eutiroidei non provoca alcun cambiamento nell'RMR. Più fenomeni potrebbero essere alla base del mancato effetto della T2 negli animali eutiroidei:

- la T2 viene velocemente metabolizzata;
- la diiodotironina non entra adeguatamente nelle cellule;
- per raggiungere i bersagli cellulari la diiodotironina ha bisogno di un precursore come la T3.

Lo stato metabolico degli animali (composizione della dieta) può avere un ruolo nel permettere agli effetti metabolici di T2 di essere rilevati.

Moreno e collaboratori<sup>78</sup> hanno esaminato il cambiamento nell'RMR dopo somministrazione di T3 a ratti eutiroidei ed hanno comparato i risultati con quelli ottenuti dopo iniezione acuta della stessa iodotironina in ratti resi ipotiroidei, che presentavano le deiodinasi bloccate, e in ratti eutiroidei che presentavano un'inibizione delle deiodinasi.

I risultati hanno evidenziato che :

- l'iniezione acuta della T3 a ratti eutiroidei ha un evidente effetto sull'RMR che precede di circa 25 ore l'effetto osservato nei ratti ipotiroidei;
- la simultanea somministrazione di actinomicina D inibiva completamente l'ultima parte dell'effetto indotto da T3 sull'RMR di animali eutiroidei, ma non ne aboliva l'effetto precoce;

- la somministrazione di T3 e di actinomicina D ad animali ipotiroidei con le deiodinasi bloccate confermava la completa perdita dell'effetto della T3 già osservato in precedenza dagli stessi autori<sup>78</sup>;
- in ratti eutiroidei l'inibizione acuta delle deiodinasi, che avveniva ore prima della somministrazione della T3, risultava in una riduzione della parte precoce dell'effetto della T3 (che era anche indipendente dall'actinomicina D), indicando che la deiodinazione della T3 era una tappa metabolica necessaria per produrre il suo effetto;
- il massimo incremento nell'RMR che, risultava essere actinomicina D insensibile, coincideva con il massimo della concentrazione epatica di T2, fenomeno che si verificava circa 25 ore dopo l'iniezione di T3 a ratti eutiroidei.

Questi risultati indicano che:

- parte dell'iniziale cambiamento nell'RMR dopo somministrazione di T3 in ratti eutiroidei è dovuto alla sua conversione in T2 che è noto essere indipendente dall'actinomicina D;
- la T3 è il precursore, in vivo, della T2.

### **3.2 I bersagli cellulari della T2.**

L'idea dell'esistenza di una proteina citoplasmatica di legame (CTPB) che potesse mediare l'effetto della diiodotironina fu avanzata in seguito alla scoperta, attraverso marcatura per fotoaffinità, di siti di legame per la T2 nel citosol di cellule di fegato di ratto. Furono identificate tre proteine: una di 86, una di 66 e la terza di 38kDa<sup>79</sup>. Quest'ultima mostrava una maggiore affinità per la T2, legandola in assenza di NADPH, mentre la stessa proteina era anche in grado di legare la T3 ma solo in presenza di NADPH. Siti specifici di legame per la T2 sono stati anche evidenziati nei mitocondri di fegato di ratto. Essi mostrano un'alta affinità (dell'ordine di  $10^8 M^{-1}$ ) ed una bassa capacità di legame (0,4-0,6 pmoli/mg proteine)<sup>80</sup>.

Le analisi di competizione hanno mostrato che i suddetti siti sono altamente specifici per la T2 e che altre iodotironine, quali 3,3'-T2, T3 e T4, sono in grado di competere significativamente soltanto quando sono presenti ad un'elevata concentrazione.

Per comprendere meglio la natura biochimica di questi siti mitocondriali, Lombardi e collaboratori (1998)<sup>75</sup> hanno effettuato studi nei quali la "top down elasticity analysis" era applicata ai mitocondri isolati da ratti in cui era iniettata la diiodotironina in maniera acuta. I risultati hanno mostrato che, un'ora dopo la sua somministrazione, la T2 ha effetto sulle cinetiche di reazioni coinvolte nell'ossidazione dei substrati<sup>75</sup>. La diiodotironina agisce su due blocchi di reazioni della catena respiratoria: il complesso IV (COX) ed il blocco delle reazioni coinvolte nella riduzione dei citocromo C. La scoperta che l'aggiunta di T2 al complesso della COX, isolato dai mitocondri di cuore bovino, stimolava la sua attività indica che tale complesso può essere uno dei bersagli della T2.

Arnold e collaboratori (1998)<sup>81</sup>, usando procedure di marcatura per fotoaffinità, identificarono la subunità Va del complesso COX come sito di legame per la T2. La natura specifica del legame è stata confermata utilizzando un anticorpo monoclonale contro la subunità Va, in presenza del quale veniva impedito il legame della diiodotironina alla subunità stessa<sup>81</sup>. Altre azioni indirettamente coinvolgenti i mitocondri potrebbero costituire parte dell'effetto biologico della T2. Infatti, Hummerich e collaboratori (1989)<sup>82</sup> hanno suggerito un'influenza della diiodotironina sull'attività mitocondriale che potrebbe essere mediata da un incremento nella captazione di calcio che si traduce in un'incrementata attività dei mitocondri dovuta all'aumento dell'attività delle deidrogenasi mitocondriali<sup>81</sup>. Questo dovrebbe portare ad un incremento nella quantità di substrati ridotti disponibili per la catena respiratoria.

E' stato evidenziato che la T2 è in grado di agire su alcuni importanti enzimi bersaglio dell'ormone tiroideo come quelli lipogenici (enzima malico e glucosio 6-fosfato deidrogenasi). La T2 è 3-5 volte più potente della T3 nello stimolare l'attività della glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PD); il suo effetto non è né

influenzato da inibitori della sintesi proteica, né induce cambiamenti nell'espressione dell'mRNA di G6PD.

### **3.3 La T2 riduce l'adiposità nei ratti.**

L'obesità, definita come aumento della massa del tessuto adiposo, comporta un più alto rischio di incorrere in malattie cardiovascolari e metaboliche come diabete, steatosi epatica, dislipidemia e malattie coronariche. Fino ad ora ci sono stati pochi trattamenti per curare l'obesità e le sue relative complicazioni.

Gli ormoni tiroidei causano riduzione di peso attraverso un'incrementata velocità metabolica ed una riduzione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) tramite sia un'up-regolazione dei recettori delle LDL che un incremento nel metabolismo del colesterolo. Nonostante ciò, la concomitante induzione di uno stato tireotossico (incremento della massa della tiroide e del cuore, tachicardia, fibrillazione atriale, riduzione della massa muscolare) ha limitato l'utilizzo degli ormoni tiroidei e/o dei loro agonisti come agenti con attività anti-obesità. I tentativi per eliminare gli effetti collaterali (soprattutto quelli cardiovascolari), mediante la somministrazione dei bloccanti  $\beta$ -adrenergici, non prevenivano l'eccessivo decremento nella massa corporea magra.

L'utilizzo di analoghi (essendo privi di effetti tireotossici) dovrebbe rappresentare un progresso terapeutico potenzialmente valido. La T2 può indurre inefficienza metabolica, stimolando la perdita di energia mediante meccanismi che coinvolgono l'apparato mitocondriale piuttosto che i recettori nucleari per la T3. Una tale azione potrebbe risultare nella riduzione dell'adiposità e del peso corporeo senza indurre una sindrome clinica relazionata allo stato tireotossico.

Recenti ricerche suggeriscono che la somministrazione della T2 a ratti che ricevono una dieta iperlipidica è in grado di ridurre l'adiposità ed il peso corporeo senza indurre cambiamenti nei livelli serici di T3 e T4<sup>83</sup>.

## CAPITOLO 4.

### NAFLD: Steatosi epatica non alcolica.

#### 4.1 NAFLD: Definizione, caratteristiche e cause della steatosi epatica non alcolica.

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) consiste in un accumulo di grasso, principalmente sotto forma di trigliceridi, in una quantità superiore al 5% del peso del fegato<sup>84</sup>.

La NAFLD, dal punto di vista anatomopatologico, presenta somiglianza con i quadri epatici indotti dall'abuso di alcol, ma si sviluppa in soggetti con consumo modesto o nullo di alcolici.

La steatosi epatica si caratterizza per una varietà di quadri istologici che vanno dalla semplice steatosi (accumulo di grasso all'interno dell'epatocita) alla steatoepatite non alcolica NASH (accumulo di grasso accompagnato a flogosi), alla fibrosi ed infine alla cirrosi. In effetti, una percentuale variabile dal 5 al 10% delle steatosi epatiche, possono evolvere negli anni verso la steatoepatite, la fibrosi, la cirrosi e persino l'epatocarcinoma<sup>85-86</sup>.

La formazione di steatosi è strettamente legata al ruolo rivestito dal fegato nel metabolismo lipidico e deriva da uno squilibrio tra l'apporto di acidi grassi al fegato ed il loro smaltimento, con conseguente accumulo di trigliceridi negli epatociti sotto forma di piccole gocce, *steatosi microvescicolare*, o di un'unica grossa goccia, *steatosi macrovescicolare*. Tale processo si verifica in presenza di fattori che nell'insieme favoriscono la lipogenesi, piuttosto che la lipolisi: fra questi, l'aumentata captazione e la sintesi intraepatica di acidi grassi e la loro ridotta eliminazione.

Nella patogenesi della NAFLD entrano in gioco diversi fattori: l'alterazione di ormoni importanti nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico (leptina e adiponectina), l'aumento di alcune citochine (TNF- $\alpha$ , interleuchine),

l'iperglicemia, il diabete di tipo 2 e l'ipertrigliceridemia. Risulta molto forte l'associazione tra la sindrome metabolica e la NAFLD<sup>87</sup>.

Inizialmente si pensava che la steatosi epatica non alcolica fosse esclusivamente una malattia degli adulti, invece, oggi si osserva che risulta essere notevolmente aumentata in tutta la popolazione (20-35%) e interessa anche i bambini (2,6%), raggiungendo il 53% nei bambini obesi<sup>88</sup>.

Sono stati ipotizzati diversi meccanismi che potrebbero portare a questo stato patologico tra cui un aumentato trasporto o disponibilità di acidi grassi provenienti dalla dieta o mobilizzati dal tessuto adiposo, mediante lipolisi. Un aumentato volume degli adipociti, come si osserva nel soggetto obeso, ed un aumento dell'idrolisi dei trigliceridi, causata dall'iperattività della lipasi ormone sensibile (LPS), contribuiscono ad innalzare i livelli plasmatici degli acidi grassi liberi<sup>89</sup> (FFA). La velocità di uptake degli FFA negli epatociti è direttamente proporzionale alla loro concentrazione nel plasma; in questa condizione il loro ingresso non regolato nel fegato causerà steatosi.

Altre cause responsabili della steatosi sono l'iperinsulinemia e l'iperglicemia che promuovono la lipogenesi de novo, mediante un'up-regolazione del fattore di trascrizione lipogenico "proteina 1c che lega gli elementi regolativi degli steroli" (SREBP-1c), la cui attivazione insulino-mediata determina l'attivazione della trascrizione di tutti i geni richiesti per la lipogenesi. L'overespressione di SREBP-1C nel fegato porta allo sviluppo del fegato grasso. La proteina SREBP-1C attiva anche l'acetil-CoA carbossilasi 2 (ACC2) che produce malonil-CoA. L'aumento della concentrazione di malonil-CoA ha come risultato il decremento dell'ossidazione degli acidi grassi, attraverso l'inibizione della carnitina-palmitoil trasferasi 1 (CPT1), la quale trasporta gli acidi grassi nei mitocondri, favorendo l'accumulo epatico di trigliceridi<sup>90</sup>. In più, la ridotta fuoriuscita di acidi grassi dal fegato, dovuta ad una difettiva incorporazione dei trigliceridi nell'apolipoproteina B o ad una ridotta sintesi della stessa, potrebbe contribuire all'instaurarsi di questa patologia.

Un secondo fattore di trascrizione che partecipa allo sviluppo della steatosi epatica nei roditori è il recettore  $\gamma$  attivato da proliferatori perossisomiali, (PPAR-

$\gamma$ ) richiesto per il normale differenziamento dell'adipocita<sup>91</sup>. In condizioni normali PPAR- $\gamma$  è espresso a livelli molto bassi nel fegato, mentre, si è visto, che in modelli animali insulino-resistenti e con fegato grasso, la sua espressione è marcatamente incrementata<sup>92</sup>. Il meccanismo molecolare attraverso cui PPAR- $\gamma$  promuove la deposizione di trigliceridi nel fegato non è stato ancora pienamente compreso.

Recenti lavori suggeriscono che i mitocondri svolgono un'azione importante nella patogenesi della NASH. Quindi lo studio dell'effetto di molecole bioattive sulla funzionalità mitocondriale può essere utile nella ricerca di possibili farmaci per il trattamento della steatosi e della NASH.

#### **4.2 Le alterazioni mitocondriali nella NAFLD.**

Diverse prove sperimentali indicano che la disfunzione epatica mitocondriale gioca un ruolo centrale nella patogenesi della NAFLD<sup>4</sup>. Le anomalie mitocondriali associate con la NAFLD includono lesioni ultrastrutturali, diminuzione del DNA mitocondriale (mtDNA) che codifica per proteine importanti nella catena di trasporto degli elettroni, diminuzione dell'attività dei complessi della catena respiratoria I, III, IV, V<sup>93</sup>, alterata  $\beta$ -ossidazione.

Sono stati osservati anche anomali cambiamenti morfologici epatici in pazienti e modelli animali con NASH<sup>94</sup>, infatti, la microscopia elettronica rivela che i mitocondri sono grandi e gonfi, scarsi di numero e che la matrice possiede delle inclusioni paracrystalline.

Queste lesioni sono state trovate in biopsie epatiche di pazienti trattati con 4,4'-dietilamminoetossiestrolo, un farmaco che inibisce l'attività della catena respiratoria mitocondriale e la  $\beta$ -ossidazione<sup>95</sup>. Il trattamento prolungato con questo farmaco è associato a steatosi epatica e steatoepatiti.

Diversi meccanismi possono essere considerati per spiegare la disfunzione mitocondriale che si ritrova nei pazienti e nei modelli animali con NAFLD tra cui:

- Eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)
- Aumentata espressione del TNF- $\alpha$  ,

Sappiamo che gli acidi grassi costituiscono una delle principali fonti di energia per gli organi periferici di un organismo e nel fegato possono subire due destini:

- essere degradati a livello mitocondriale
- essere convertiti in triacilglicerolo o fosfolipidi da parte di enzimi presenti nel citosol.

Il processo mediante il quale vengono degradati prende il nome di  $\beta$ -ossidazione. Esso è un processo biochimico sottoposto a regolazione, che si realizza a livello mitocondriale (Figura 4.1).

Gli acidi grassi presenti nel citosol possono essere a corta, media e lunga catena. I primi entrano liberamente nei mitocondri, mentre quelli a lunga catena non possono transitare passivamente attraverso le due membrane mitocondriali, pertanto subiscono una preventiva serie di tre reazioni enzimatiche<sup>96</sup>.

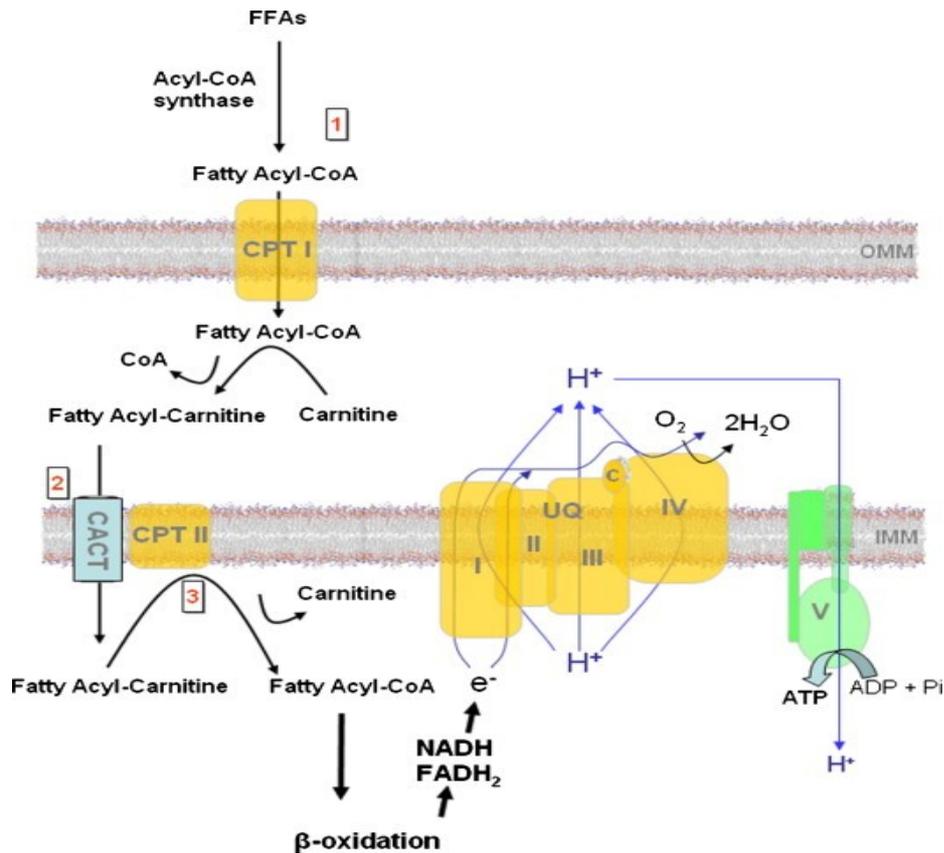


Fig.4.1 Trasporto degli acidi grassi all'interno dei mitocondri

La prima reazione è catalizzata da una famiglia di isozimi presenti nella membrana mitocondriale esterna, le acil-CoA sintetasi che catalizzano la formazione di un legame tioestere tra il gruppo carbossilico dell'acido grasso e il gruppo tiolico del coenzima A, formando un acil-CoA. Quest'ultimo non può attraversare la membrana mitocondriale interna, per questo il gruppo acilico deve essere trasferito alla carnitina per azione della CPT1 (Carnitina-palmitoil transferasi I) localizzata sulla membrana mitocondriale esterna. Sulla membrana interna del mitocondrio, invece, è localizzato l'enzima CPTII (Carnitina-palmitoil transferasi II) che catalizza la reazione di transesterificazione degli acidi grassi con CoA mitocondriale, rilasciando carnitina libera. A questo punto l'acil-CoA può andare incontro alla  $\beta$ -ossidazione, una via metabolica formata da

diverse reazioni che consente di degradare l'acil-CoA con produzione di Acetil-CoA, il quale viene ossidato completamente a CO<sub>2</sub> nel ciclo dell'acido citrico.

Gli elettroni, liberati durante l'ossidazione degli acidi grassi, attraversano la catena respiratoria dei mitocondri e giungono all'ossigeno, con la contemporanea fosforilazione di ADP ad ATP.

Il trasporto degli acidi grassi, mediato dalla carnitina, è un processo finemente regolato e dipende dallo stato fisiologico in cui si trova l'organismo, infatti, a seconda della richiesta energetica della cellula, gli acidi grassi possono essere trasportati nei mitocondri per essere metabolizzati o essere immagazzinati nel citoplasma, come trigliceridi. Questo processo è principalmente regolato dal malonil-CoA, un acido grasso che è generato dall'Acetil-CoA carbossilasi (ACC). Il malonil-CoA inibisce il trasporto degli acidi grassi nei mitocondri, inibendo la reazione catalizzata da CPT1. A seconda quindi, dei diversi stati fisiologici in cui si trova l'organismo, quali possono essere digiuno, deficienza dell'insulina, ipo ed ipertiroidismo, variano le concentrazioni di malonil-CoA e di conseguenza l'attività di CPT1. In condizioni di bisogno energetico viene attivata l'AMP chinasi (AMPK) che fosforila l'ACC, inattivandola. L'ACC fosforilata non è più in grado di sintetizzare il malonil-CoA, che a sua volta a basse concentrazioni non inibisce la CPT1, spostando l'equilibrio verso l'ossidazione degli acidi grassi e non verso le loro sintesi.

Una disfunzione della catena respiratoria mitocondriale può direttamente portare alla produzione di ROS<sup>97</sup>.

L'aumento della produzione di ROS, dovuto all'eccesso di acidi grassi liberi, è stata convalidata in modelli animali affetti da NASH<sup>98</sup> e successivamente confermata anche in fegati umani, fornendo una ulteriore prova che in tali circostanze<sup>99</sup> si ha un aumento dello stress ossidativo.

In pazienti con NASH, gli epatociti sono sovraccaricati di acidi grassi liberi e diversi studi hanno evidenziato che durante questa epatopatia vi è un incremento dell'ossidazione lipidica da parte dei mitocondri, infatti si verifica un aumento dell'attività della CPT1, il trasportatore di acidi grassi nella matrice mitocondriale<sup>100</sup> e in aggiunta, PPAR- $\alpha$  attivato da un aumento di FFA, può

attivare l'espressione della stessa CPT1. Nella NASH, l'aumento del flusso degli acidi grassi liberi determina un'incrementata ossidazione da parte dei mitocondri, quindi, una maggior produzione di donatori di elettroni (NADH e FADH<sub>2</sub>) nella catena di trasporto degli elettroni, pertanto, il gradiente di voltaggio, attraverso la membrana mitocondriale, aumenta fino a raggiungere una soglia limite. Il trasferimento degli elettroni all'interno del complesso III viene bloccato<sup>101</sup>, provocando il ritorno degli elettroni, al coenzima Q, il quale cede uno per volta gli elettroni all'ossigeno molecolare, generando quindi superossido.

I radicali liberi, dal punto di vista biochimico, sono molecole particolarmente instabili, in quanto possiedono un solo elettrone anziché due. Questo li porta a ricercare un equilibrio appropriandosi dell'elettrone delle altre molecole con le quali vengono a contatto. Queste ultime diventano instabili e a loro volta ricercano un elettrone innescando un meccanismo di instabilità a catena.

I ROS, inoltre, possono attaccare gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), presenti anche a livello mitocondriale, e un iperafflusso di acidi grassi al fegato che eccede la capacità fisiologica del loro metabolismo (esterificazione e  $\beta$ -ossidazione) può innescare fenomeni di perossidazione lipidica nelle cellule con formazione di sottoprodotti aldeidici malonildialdeide e 4-idrossienonenale<sup>102-103</sup> che, generano i processi infiammatori e di fibrogenesi. In più, la perossidazione dei PUFA attenua la secrezione di VLDL nei roditori<sup>104</sup>, contribuendo ad un ulteriore accumulo di trigliceridi nel fegato e all'aggravarsi della steatosi epatica. In aggiunta, l'aumento dei ROS indotto dagli FFA attiva le stesse vie responsabili del danno tissutale, infatti i ROS attivano il fattore-Kb che induce la sintesi della citochina proinfiammatoria TNF $\alpha$ <sup>105</sup>.

E' noto che la catena respiratoria mitocondriale genera ROS anche in mitocondri sani, ma in condizioni fisiologiche, essi sono neutralizzati chimicamente dagli antiossidanti che li convertono in acqua, e solo una piccola quantità persiste come radicale libero.

In pazienti con NASH il danno ossidativo è invece maggiore perché si verifica anche una ridotta attività degli enzimi antiossidanti<sup>106</sup>.

Possiamo concludere affermando che la disfunzione mitocondriale svolge un ruolo centrale nella patogenesi della NASH, pertanto trovare degli agenti bioattivi che riescano ad agire a livello mitocondriale può essere utile per la prevenzione della steatosi. In virtù di ciò, in questa tesi, l'interesse è stato rivolto agli ormoni tiroidei, in particolare la 3,5 diiodo-L-Tironina (T<sub>2</sub>) che ha come bersaglio cellulare i mitocondri.

## CAPITOLO 5.

### INSULINA ED INSULINO-RESISTENZA.

#### 5.1 Biosintesi, struttura e azioni dell'insulina.

L'insulina è un ormone peptidico, la cui azione è finalizzata a sottrarre il glucosio dal sangue aumentando la sua assunzione da parte delle cellule e favorendone l'utilizzo intracellulare.

L'insulina è sintetizzata nel pancreas endocrino, in particolare, nelle isole di Langerhans che costituiscono il 2% della massa totale del pancreas contenente tre tipi principali di cellule, ciascuno specializzato nella sintesi di un ormone diverso: cellule A/ $\alpha$  che secernono glucagone, cellule B/ $\beta$  che secernono insulina, cellule D/ $\delta$  che secernono somatostatina e le cellule F che rilasciano il polipeptide pancreatico (Figura 5.1).

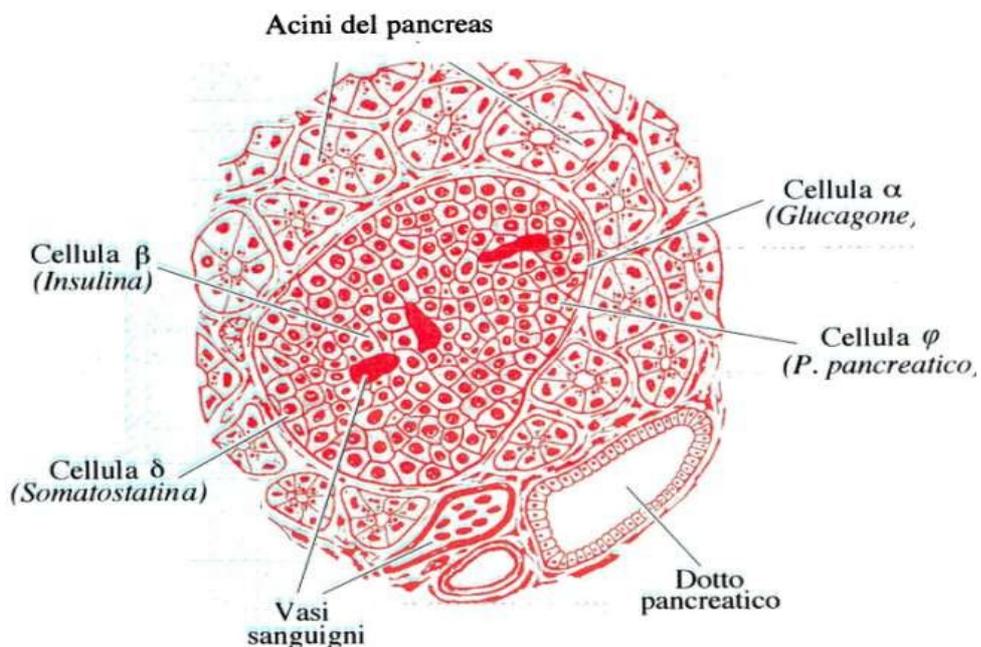


Fig. 5.1. Schematizzazione di una sezione di pancreas dove sono evidenziate le isole di Langerhans le cui cellule  $\beta$  producono l'insulina.

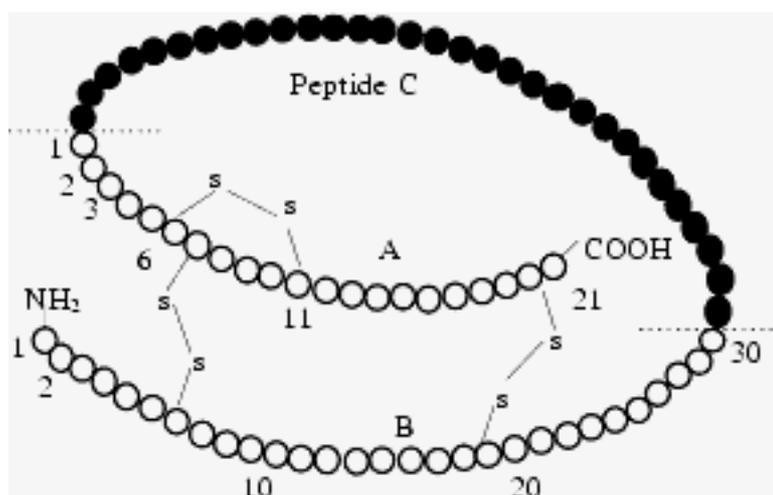
Come tutti gli ormoni peptidici, viene sintetizzata come precursore inattivo e convertito in ormone attivo grazie a maturazione proteolitica.

L'insulina è una piccola proteina (peso molecolare di 5734) la cui struttura non è abbastanza stabile da favorire un corretto avvolgimento su se stessa. Per questo motivo essa viene sintetizzata a partire da un precursore chiamato **pre-proinsulina**, costituito da 109 amminoacidi, in grado di avvolgersi correttamente su se stesso. La pre-proinsulina è costituita da **proinsulina** (costituita dalla catena A, dalla catena B e dal peptide C, peptide connecting) con una sequenza amminoacidica supplementare chiamata sequenza **pre**, che durante la sintesi si stacca, lasciando la proinsulina. Gli enzimi pro-ormone convertasi, PC1 e PC2 distaccano il peptide C, mentre, una carbossipeptidasi E rimuove 2 Arg a livello dell'estremità C-ter della catena B e 1 Arg e 1 Lys a livello dell'estremità C-ter del peptide C per formare la definitiva struttura dell'insulina, che viene prodotta nell'apparto del Golgi.

La struttura definitiva dell'insulina è costituita:

- **da una catena polipeptidica A**, formata da 21 amminoacidi.
- **da una catena polipeptidica B**, formata da 30 amminoacidi.

La struttura proteica è, quindi, maggiormente stabilizzata e resa attiva grazie alla presenza di tre ponti disolfuro, due che si trovano tra le due catene A e B ed uno che si trova all'interno della catena A<sup>107</sup> (Figura 5.2). La concentrazione ematica di peptide C viene dosata ed usata come indice di secrezione dell'insulina endogena nei soggetti diabetici ai quali viene somministrata insulina (esogena).



**Fig. 5.2. Insulina: peptide di 51amminoacidi a 2 catene: 21 nella A e 30 nella B con 2+1 ponti disolfurici**

L'insulina viene sintetizzata sotto forma di vescicole o granuli che, al momento opportuno, vengono esocitate. Le cellule  $\beta$  pancreatiche contengono sempre una certa quantità di granuli, ciò significa che la sintesi dell'ormone non è regolata da fattori, bensì è continua. È l'esocitosi, invece, ad essere controllata perché se, normalmente, l'insulina serve a far diminuire le concentrazioni di glucosio nel sangue durante la fase di digiuno, quando, invece, la glicemia deve aumentare, con un rilascio non controllato di insulina si potrebbe andare incontro ad ipoglicemie.

L'insulina è l'ormone anabolico per eccellenza, infatti tramite la sua azione:

- facilita il passaggio del glucosio dal sangue alle cellule ed ha pertanto azione ipoglicemizzante (abbassa la glicemia.) Favorisce l'accumulo di glucosio sotto forma di glicogeno (glicogenosintesi) a livello epatico ed inibisce la degradazione di glicogeno a glucosio (glicogenolisi).
- Facilita il passaggio degli amminoacidi dal sangue alle cellule, ha funzione anabolizzante perché stimola la sintesi proteica e inibisce la

gluconeogenesi (formazione di glucosio a partire da alcuni amminoacidi).

- Facilita il passaggio degli acidi grassi dal sangue alle cellule, stimola la sintesi di acidi grassi a partire da glucosio e amminoacidi in eccesso ed inibisce la lipolisi (utilizzo degli acidi grassi a scopo energetico).
- Facilita il passaggio di potassio all'interno delle cellule.
- Stimola la proliferazione cellulare.
- Stimola l'uso del glucosio per la produzione di energia.
- Stimola la produzione endogena di colesterolo.
- Stimola la proliferazione cellulare.

Il principale stimolo al rilascio di insulina è, quindi, l'aumento della glicemia, e quest'ultima dipende dalla quantità di carboidrati che si assumono, e soprattutto dal loro indice glicemico. Quando si assumono carboidrati a basso indice glicemico: la glicemia si innalza gradualmente, viene secreta una quantità normale di insulina che riporta gradualmente la glicemia ai livelli precedenti, il cervello è ben nutrito per molte ore e non richiede altro cibo. A seguito, invece, dell'ingestione di carboidrati ad alto indice glicemico, la glicemia subisce un brusco innalzamento; viene secreta una notevole quantità di insulina che causa un'altrettanto brusca diminuzione della glicemia. In questo caso il cervello va in crisi e richiede altro cibo.

Le molecole di glucosio entrate nelle cellule  $\beta$  del pancreas vengono demolite, mediante ossidazione con produzione di ATP, che induce la chiusura di particolari canali  $K^+$  (ATP sensibili) cui consegue una depolarizzazione ed apertura dei canali ionici Calcio voltaggio-dipendenti. A questo segue la liberazione dell'ormone.

Quando la concentrazione di glucosio nel sangue è alta, come dopo un pasto, il pancreas secerne insulina che stimola il fegato a prelevare il glucosio dal sangue per immagazzinarlo.

Siccome, la capacità del fegato di immagazzinare glucosio è piuttosto limitata (circa 70 grammi), i carboidrati in eccesso vengono convertiti in grassi e depositati nel tessuto adiposo.

Sebbene l'insulina sia un ormone peptidico, non utilizza alcuna proteina di trasporto per mantenere i livelli nel sistema circolatorio: il suo trasporto avviene in forma libera.

Antagonista dell'insulina è il glucagone, un ormone iperglicemizzante secreto dalle cellule  $\alpha$  del pancreas che coadiuva l'aumento della concentrazione del glucosio nel flusso ematico. L'organo bersaglio principale del glucagone è il fegato.

Il principale effetto operato dal glucagone è l'aumento della glicogenolisi che di fatti, determina una maggiore presenza di glucosio 6-fosfato endocellulare che una volta defosforilato può entrare nel torrente sanguigno, nonché un aumento della gluconeogenesi. Inoltre stimola la degradazione delle proteine e il trasporto degli amminoacidi, substrati necessari per la gluconeogenesi epatica.

Il glucagone, inoltre, spinge le cellule all' utilizzo di grassi e proteine come fonte energetica: in questo modo si predispone tutto l' organismo al risparmio del glucosio.

Lo stimolo principale per il rilascio del glucagone è rappresentato dalla concentrazione plasmatica di glucosio: quando questa scende sotto i 100mg/dL, la secrezione di ormone aumenta notevolmente. Con concentrazioni plasmatiche di glucosio superiori a 100mg/dL, quando è secreta insulina, la secrezione di glucagone è inibita e resta a livelli bassi ma sempre relativamente costanti.

Insulina e glucagone, dunque, agiscono in antagonismo per mantenere le concentrazioni plasmatiche del glucosio a livelli accettabili. Entrambi gli ormoni sono sempre presenti nel circolo sistemico ed è il loro rapporto che determina quale ormone sarà dominante.

Nello stato di sazietà, quando l' organismo assorbe nutrienti, l' insulina è dominante e nell' organismo predominano i processi anabolici.

In condizioni di digiuno, si ha la situazione inversa: domina il glucagone e i processi metabolici da esso innescati (Figura 5.3).

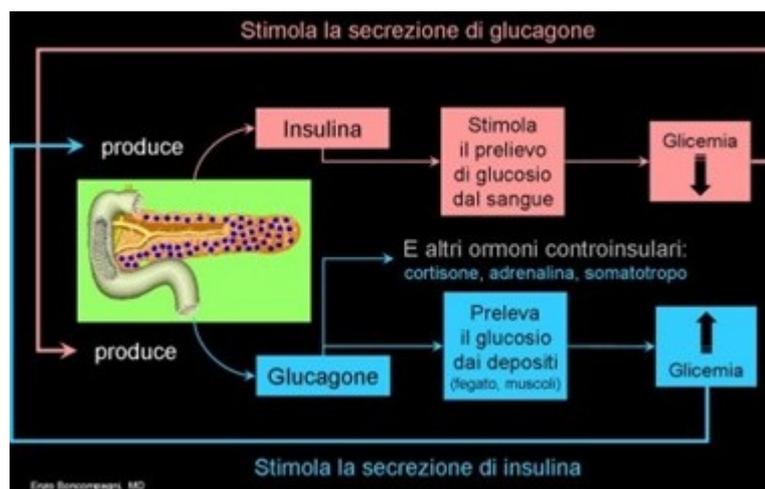
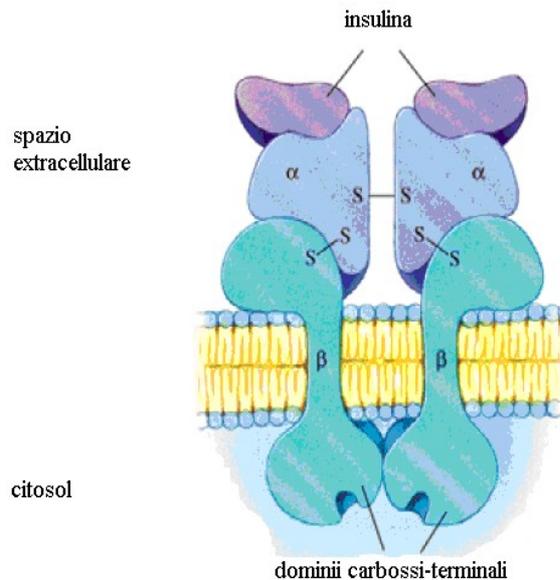


Fig.5.3 azione di insulina e glucagone

## 5.2 Le vie di segnalazione dell'insulina.

L'insulina è una molecola ad alto peso molecolare che necessita di specifici recettori presenti sulla membrana cellulare, per svolgere il suo ruolo nella cellula. Tali recettori sono glicoproteine costituite da due catene polipeptidiche  $\alpha$  che costituiscono il *dominio di legame* insulinico, in quanto si affacciano sulla superficie esterna della membrana plasmatica, e da due subunità  $\beta$  transmembrana che si estendono nel citosol della cellula e costituiscono il *sito di autofosforilazione tirosinichinasico*<sup>108</sup> (Figura 5.4).



**Fig.5.4. recettore insulina.**

Quando l'insulina si lega al recettore, si verifica l'autofosforilazione dei residui di tirosina presenti nel dominio citosolico delle subunità  $\beta$ , che in questo modo si attiva. L'attivazione del dominio tirosina chinasi catalizza la fosforilazione di altre proteine bersaglio aventi residui di tirosina.

A livello periferico si ha, quindi, l'attivazione di due vie di trasduzione del segnale: da un lato la via Grb2-Sos-Ras-MAPK e dall'altra la via PI-3K-PKB (**Akt**). (Figura 5.5):

- il recettore attivato fosforila IRS-1 (substrato 1 del recettore dell'insulina) a livello di residui di tirosina i quali diventano dei siti di legame specifici per proteine che contengono domini SH2<sup>109</sup> come GRB2 (Growth factor Receptor Binding 2). GRB2 attivato lega il fattore di scambio di nucleotidi guaninici (SOS o GEF) il quale a sua volta, in seguito a tale interazione, viene portato dal citoplasma alla membrana e lega la proteina Ras che passa dalla forma inattiva (Ras-GDP) a quella attiva (Ras-GTP). Ras attivata è capace di legare e attivare Raf-1 (una delle prime proteine chinasi attivate) che a sua volta fosforila la chinasi MEK su due residui di serina, attivandola. MEK fosforila MAPK su un residuo di treonina e su uno di tirosina, attivandola. MAPK entra nel nucleo e

fosforila fattori di trascrizione nucleari come Elk-1, attivandoli e tali fattori, a loro volta, determinano la trascrizione e la traduzione di geni necessari al differenziamento, alla sopravvivenza e alla divisione cellulare;

- IRS-1 fosforilata dal recettore dell'insulina, oltre a GRB2 può attivare un'altra proteina con dominio SH2 come PI3K (fosfatidilinositolo-3 chinasi). Quest'ultima è capace di convertire il lipide di membrana PIP<sub>2</sub> (fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato) in PIP<sub>3</sub> (fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato). Il PIP<sub>3</sub> può agire come secondo messaggero legandosi a particolari domini di certe proteine ad attività ser/thr chinasi, come la chinasi dipendente da fosfolipidi (PDK)<sup>110</sup>, la quale attiva la proteina chinasi B (PKB), una chinasi serina/treonina, anche conosciuta come Akt, la quale viene fosforilata a livello del residuo di treonina 308 ed attivata dalla PDK<sup>111-112</sup>.

L'Akt è una proteina di 57kDa di cui esistono tre isoforme  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , (Akt1, Akt2, Akt3, rispettivamente)<sup>113</sup>, è localizzata in diversi compartimenti subcellulari, incluso il Golgi, il reticolo endoplasmatico, i mitocondri e il nucleo<sup>114</sup>. La sua azione più importante è quella che si evidenzia in seguito alla sua attivazione da parte dell'insulina. L'ormone, infatti, attiva PKB $\alpha$  nel muscolo scheletrico e PKB $\beta$  negli adipociti<sup>115</sup>, la quale fosforila una delle sue proteine bersaglio, la glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3).

Nella sua forma attiva, cioè, nello stato non fosforilato, l'enzima GSK3 fosforila la glicogeno sintasi, inattivandola e bloccando la sintesi del glicogeno. Quando GSK3 viene fosforilata dall' Akt, è convertita nella forma inattiva<sup>116</sup>, quindi, impedendo l'inattivazione della glicogeno sintasi, la cascata di fosforilazione di proteine indotta dall'insulina stimola la sintesi del glicogeno.

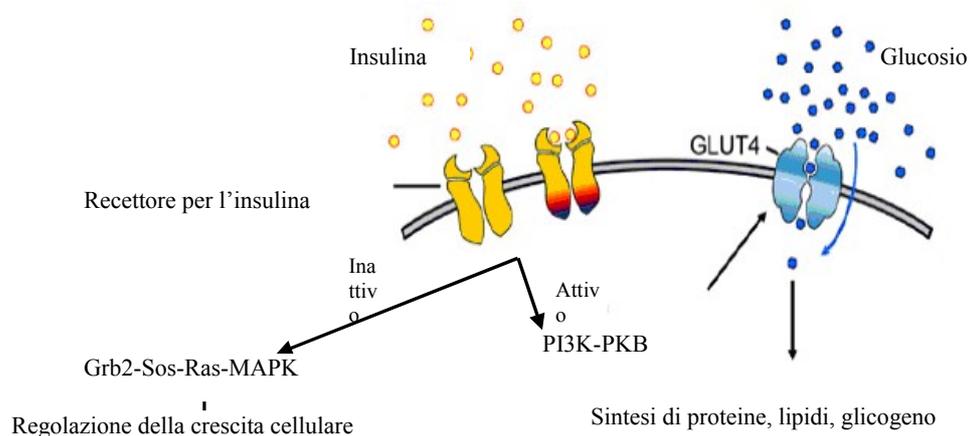
Come già detto un'importante risposta al segnale dell'insulina è la stimolazione del trasporto del glucosio nelle cellule, trasporto effettuato dal trasportatore 4 del glucosio (Glut4) che proprio per azione dell'insulina trasloca dal suo pool di riserva intracellulare alla membrana plasmatica<sup>117</sup> favorendo l'assunzione di glucosio dal sangue che viene conservato sotto forma di glicogeno da parte del muscolo cardiaco e scheletrico e di triacilgliceroli da parte degli adipociti.

Si pensa che Akt sia anche coinvolta nel reclutamento di Glut4 alla membrana come dimostrato da numerosi studi. Si è visto, infatti, che l'over-espressione di PKB in cellule muscolari di ratto L6<sup>118-119</sup> determina un incremento dell'attività basale di PKB accompagnato da una significativa stimolazione dell'uptake di glucosio, dovuto al reclutamento di Glut4 ad un livello paragonabile a quella suscitata normalmente dall'insulina in cellule di controllo e da un concomitante aumento della sintesi del glicogeno e delle proteine.

L'Akt fosforila le sue proteine bersaglio su residui di serina e treonina tra cui il "substrato 40 dell'Akt ricco in prolina" (PRAS40). Interessanti studi, che hanno avuto come oggetto questa proteina substrato, hanno dimostrato che la sua fosforilazione è indotta in risposta alla stimolazione con insulina in vivo in diversi tessuti bersaglio ed è, invece, marcatamente ridotta in uno stato di insulino-resistenza, indotta da una dieta iperlipidica<sup>120</sup>. L'Akt determina la fosforilazione e l'attivazione di diverse proteine che sono coinvolte nella proliferazione cellulare, come il fattore nucleare quale "la proteina legante l'elemento responsivo all'AMPc" (CREB)<sup>121</sup> che, fosforilato da PKB, promuove la sopravvivenza cellulare ed inoltre inibisce l'apoptosi, inibendo l'attività di proteine che sono coinvolte in questo processo, come i fattori pro-apoptotici, NF-kB e la caspasi 9.

Infatti, è stato dimostrato che l'espressione costitutiva di PKB $\alpha$  nelle cellule della ghiandola mammaria di topi transgenici, porta all'inibizione della morte cellulare<sup>122</sup>. Inoltre, PKB fosforilando la caspasi 9 sul residuo di serina 196, porta all'inattivazione dello stesso fattore pro-apoptotico<sup>123</sup>.

Questa chinasi esercita, inoltre, anche un effetto neuroprotettivo contro il danno cerebrale nel topo geneticamente modificato che esprime una forma attiva della PKB nelle cellule neuronali<sup>124</sup>.



**Fig.5.5 Rappresentazione schematica del segnale insulinico e dei suoi effetti all'interno della cellula.**

### 5.3 La resistenza all'insulina.

L'insulino-resistenza è uno dei principali meccanismi associati all'obesità<sup>125</sup>. L'insulina è l'unico ormone in grado di abbassare i livelli di glucosio nel sangue favorendone l'accumulo nei tessuti sottoforma di glicogeno. Quando l'effetto biologico dell'insulina è inferiore a quello atteso, ovvero è necessaria una quantità di insulina superiore al normale per bilanciare i livelli di glucosio, si parla di insulino-resistenza.

La malattia può instaurarsi in seguito a :

- Difetti molecolari in sede recettoriale, per cui è ridotto il legame dell'ormone al suo recettore e/o la trasmissione transmembrana del segnale ormonale. Questo fa sì che le cellule non riescono a recepire il messaggio portato dall'insulina;
- Difetti molecolari in sede post-recettoriale, per cui esiste un'anomalia a livello dei trasportatori di membrana e di tutti quelli che sono gli effettori del messaggio;

- Iperglicemia;
- Aumento dei trigliceridi plasmatici totali o della quantità di trigliceridi nelle VLDL;
- Aumento dei livelli di glucagone e/o ormone della crescita;
- Aumento della concentrazione ematica di acidi grassi liberi che provocano una diminuzione della fosforilazione ossidativa.

A tale proposito va detto che l'aumento degli acidi grassi plasmatici negli umani inibisce l'attivazione della PI-3K da parte dell'insulina e questo fenomeno condiziona il trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico<sup>126</sup> da parte del Glut4 (trasportatore 4 del glucosio)<sup>127</sup>.

Da studi eseguiti sui ratti si è visto che la proteina chinasi C isoforma teta (PKC- $\theta$ ) viene attivata in seguito all'infusione di metaboliti lipidici e blocca la fosforilazione della tirosina di IRS-1 da parte dell'insulina. Ciò determina una riduzione del 50% dell'attività della PI-3K<sup>128</sup>. Inoltre, ratti con la PKC- $\theta$  disattivata sono protetti dall'insulino-resistenza nel muscolo scheletrico causata dai lipidi<sup>129</sup>.

Questi studi hanno portato alla conclusione che il contenuto intracellulare di metaboliti lipidici è un meccanismo di controllo della malattia, infatti un aumento di tali metaboliti nel fegato attiva una cascata che coinvolge anche la PKC- $\epsilon$ , determinando una diminuzione della fosforilazione della tirosina di IRS-2, un mediatore dell'azione dell'insulina a livello epatico<sup>130-131</sup>. Tra i metaboliti che possono determinare questo processo c'è il diacilglicerolo<sup>132</sup>.

Da questi studi si è giunti alla conclusione che l'obesità di per sé non è causa di insulino-resistenza, ma è l'accumulo intracellulare di metaboliti lipidici che porta a tale patologia. Questo fenomeno prende il nome di "lipotossicità".

In questa situazione l'insulina non riesce a favorire il deposito di glucosio nel muscolo, in maniera efficiente, inoltre non è in grado di bloccare la scissione del glicogeno da parte del fegato e quindi l'immissione in circolo di altro glucosio. Pertanto viene prodotta una quantità di insulina superiore alla norma da parte del

pancreas e nonostante questo si va incontro ad una severa iperglicemia che aggrava ulteriormente la situazione di resistenza all'insulina.

Una situazione di questo tipo, prolungata negli anni, può portare all'incapacità totale del pancreas di produrre insulina e quindi ad una totale mancanza di controllo della glicemia.

Esistono varie condizioni cliniche associate all'insulino-resistenza :

◆ *diabete di tipo I* caratterizzato da una scarsa sintesi di insulina dovuta alla distruzione delle cellule beta di Langerhans, attraverso un meccanismo autoimmune, cioè si formano anticorpi contro le cellule pancreatiche. Viene detto "diabete insulino dipendente"<sup>133-134</sup> in quanto si manifesta con bassi livelli di insulina in presenza di iperglicemia. È più frequente durante l'infanzia e l'adolescenza.

◆ *diabete di tipo II*<sup>135</sup>, detto "diabete insulino indipendente", è un disturbo dell'età adulta, ma con l'aumentare dei casi di obesità, spesso molti adolescenti hanno sviluppato questo disturbo. La malattia si manifesta quando l'insulina, pur essendo presente, non riesce ad agire, provocando iperglicemia cronica la quale, in mancanza di cure, può portare al coma diabetico ed anche alla morte. I meccanismi molecolari alla base del fenomeno dell'insulino resistenza nel diabete tipo II possono essere collegati a vari fattori: una riduzione del numero di recettori insulinici sulla cellula; una minore attività dell'enzima proteinchinasico recettoriale che trasmette il segnale ormonale dentro la cellula; un ridotto trasporto transmembrana del glucosio; una minore attività di uno o più enzimi chiave dell'utilizzazione intracellulare del glucosio. Nei soggetti non obesi sono molto comuni le alterazioni di tipo post-recettoriale che in parte sono geneticamente determinate e in parte sono determinate da: iperglicemia, la quale sembra essere in grado di determinare insulino-resistenza a livello post-recettoriale; iperinsulinemia, che sembra essere in grado di indurre insulino-resistenza sia a livello recettoriale che post-recettoriale; aumento di acidi grassi, che determina una ridotta utilizzazione glucidica a livello muscolare;

◆ *obesità*, in quanto la maggioranza dei soggetti obesi è insulino resistente. È interessante notare che l'insulino-resistenza dell'obesità ha caratteristiche

qualitative e quantitative molto simili a quelle dell'insulino-resistenza del diabete tipo II. Appare quindi logico ipotizzare che proprio l'insulino resistenza costituisca l'elemento fisiopatologico che mette in relazione il diabete con l'obesità. A tale proposito è stato dimostrato che gli obesi diabetici sono più insulino resistenti degli obesi non diabetici. Tale diversità nella sensibilità insulinica probabilmente è dovuta al fatto che l'insulino resistenza sembra avere una spiccata componente genetica<sup>136</sup>. A sostegno di tale ipotesi è anche la recente osservazione che i soggetti con più severa insulino resistenza (sia fra gli obesi che fra i non obesi) sviluppano più facilmente il diabete<sup>125</sup>;

◆ *fattori di rischio vascolare* come l'ipertensione, la dislipidemia, l'iperuricemia e la trombofilia, lieve aumento di colesterolo LDL ed abbassamento di quello HDL.

È da ipotizzare che gran parte di queste patologie associate all'insulino resistenza, sia da attribuire all'iperinsulinemia che scaturisce per compensare i ridotti effetti biologici dell'insulina. Al momento attuale, comunque, non è chiaro se la relazione causa-effetto, ammesso che essa esista realmente, sia quella riscontrata tra insulino-resistenza e fattori di rischio vascolare o quella rilevata tra tali fattori e l'iperinsulinemia<sup>137</sup>.

## **CAPITOLO 6.**

### **SCOPO DELLA TESI.**

La T3 è stata utilizzata, per molto tempo, come farmaco per combattere l'obesità data la sua capacità di incrementare la spesa energetica.

Infatti una delle funzioni svolte dalla T3, principale ormone tiroideo, è la sua azione termogenica, in quanto tale ormone è in grado di aumentare il consumo di ossigeno nei tessuti, quindi permette una maggiore produzione di calore e di conseguenza porta ad un aumento del metabolismo basale, cioè della spesa energetica minima necessaria per mantenere l'organismo in vita.

Tuttavia è stato riscontrato che la T3 induce una serie di fenomeni indesiderati (quali aumento della frequenza cardiaca, ipertrofia cardiaca, riduzione della massa magra, alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide), il suo uso nella suddetta patologia è stato notevolmente ridotto.

Negli ultimi anni, un numero crescente di prove sperimentali ha messo in evidenza che la 3,5-diiodo-l-tironina (T2), una iodotironina naturalmente prodotta dalla tiroide, possiede attività biologiche intrinseche; in particolare le sue azioni mimano quelle della T3, aumentando l'ossidazione lipidica e il metabolismo basale ma si esplicano attraverso dei meccanismi indipendenti da quelli attuati da quest'ultima<sup>138</sup>.

Tale capacità rende la T2 un potenziale farmaco utilizzabile nella cura dell'obesità e delle patologie ad essa correlate tra cui, appunto l'insulino-resistenza, diabete e steatosi epatica.

Partendo da questo presupposto, lo scopo della mia tesi è stato quello di valutare l'effetto della T2 sia nel prevenire che nel ridurre lo sviluppo dell'obesità e della steatosi epatica in ratti alimentati con dieta iperlipidica. Tenendo presente che la T2 ha come bersaglio principale i mitocondri e che la disfunzione mitocondriale sembra svolgere un ruolo importante nello sviluppo

della steatosi epatica, nel corso della mia attività di ricerca mi sono soprattutto focalizzato sulla analisi della funzionalità ed efficienza mitocondriale.

In particolare, ho valutato l'effetto della T2 sull'accumulo del grasso epatico, analizzando dal punto di vista istologico sezioni di fegato e andando a valutare alcuni parametri mitocondriali per cercare di chiarire i meccanismi attraverso i quali la T2 potrebbe diminuire l'accumulo ectopico di acidi grassi epatici agendo sulla funzionalità mitocondriale. Tra i parametri mitocondriali da valutare, ho preso in considerazione la velocità di ossidazione degli acidi grassi ( $\beta$ -ossidazione), l'efficienza mitocondriale e l'attività dell'enzima mitocondriale aconitasi, un parametro indice di stress ossidativo. L'aumento dello stress ossidativo a livello mitocondriale svolge, infatti, un ruolo importante nello sviluppo della steatosi epatica.

Nel corso dell'attività di ricerca ho ritenuto interessante valutare l'effetto della T2 in due diversi disegni sperimentali volti ad analizzare rispettivamente l'effetto preventivo e terapeutico di tale ormone sullo sviluppo dell'obesità e della steatosi epatica.

In un primo disegno sperimentale ho analizzato l'effetto della somministrazione della T2 ai ratti alimentati contemporaneamente con dieta iperlipidica per quattro settimane, sullo sviluppo dell'obesità, della steatosi epatica e della insulino resistenza per verificare se tale somministrazione della T2 fosse in grado di prevenire lo sviluppo di tali patologie rispetto a ratti sottoposti solo a trattamento con la stessa dieta iperlipidica per lo stesso periodo di tempo. Come già detto in precedenza, l'attività di ricerca si è focalizzata sulla funzionalità mitocondriale per collegarla con il grado di sviluppo della steatosi epatica.

Un ulteriore scopo della tesi è stato poi quello di verificare, in un secondo disegno sperimentale, se la T2, somministrata contemporaneamente ad una dieta ad alto contenuto di grassi, fosse anche in grado di migliorare, nei ratti, la steatosi epatica, indotta precedentemente dalla sola somministrazione di dieta iperlipidica.

Per promuovere un potenziale uso farmacologico della T2, infatti sono necessari studi che dimostrino la sua capacità sia nel prevenire lo sviluppo di malattie associate all'obesità sia nel ridurle o eliminarle una volta che si siano sviluppate.

Per tale motivo nel secondo disegno sperimentale ho prima trattato per un lungo periodo i ratti con dieta iperlipidica, inducendo steatosi epatica; in seguito ho somministrato la T2 in modo da constatare un eventuale effetto terapeutico di questo ormone sul grado di steatosi epatica indotta da un lungo trattamento con dieta ad alto contenuto di grassi. Anche in questo secondo disegno sperimentale particolare attenzione ho rivolto alle modifiche della funzionalità mitocondriale ed allo stress ossidativo, parametri importanti nello sviluppo della steatosi epatica.

## **CAPITOLO 7.**

### **PARTE SPERIMENTALE.**

#### **DISEGNI SPERIMENTALI**

Negli esperimenti condotti in questa tesi sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Wistar, ottenuti dalla Charles River (Calco, Como, Italia). Sono stati utilizzati ratti di età differente in modo da poter effettuare due disegni sperimentali.

Gli animali sono stati stabulati singolarmente ad una temperatura di  $28^{\circ}\text{C}\pm 1$ , sono stati sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce-buio (12 ore di luce/ 12 ore di buio) ed è stato consentito libero accesso a cibo ed acqua.

Alcuni animali sono stati alimentati con una dieta controllo costituita da mangime standard di laboratorio ed altri con una dieta iperlipidica.

La dieta iperlipidica è stata ottenuta aggiungendo al mangime standard del burro, al fine di aumentare il contenuto lipidico e calorico della dieta. La dieta iperlipidica contiene anche carne liofilizzata utilizzata sia per controllare il contenuto proteico della dieta sia perché sembra essere un alimento molto gradito ai ratti<sup>139</sup>. La composizione in micronutrienti della dieta è stata mantenuta costante dall'aggiunta di un misto di minerali e vitamine.

<b>ELEMENTI</b>	<b>DIETA DI CONTROLLO</b>	<b>DIETA IPERLIPIDICA</b>
<b>Mangime standard<sup>1</sup>,g</b>	1000	280
<b>Carne liofilizzata<sup>2</sup>,g</b>	...	395
<b>Burro<sup>3</sup>,g</b>	...	178
<b>Alphacel,g</b>	...	120
<b>AIN 76 Mineral mix<sup>4</sup>,g</b>	...	20
<b>AIN 76 Vitamin mix<sup>5</sup>,g</b>	...	7
<b>Contenuto energetico lordo(kJ/g)<sup>6</sup></b>	15,88	19,85
<b>ENERGIA (J/100J) da</b>		
<b>Proteine %</b>	29	29
<b>Lipidi %</b>	10,6	50
<b>Carboidrati %</b>	60,4	21

<sup>1</sup> 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese, Milano, Italy

<sup>2</sup> Liomellin, Star s.p.a., Milano, Italy, contiene (in 10g): proteine g 5,8 (Nx 6,25), lipidi 1,2 g, carboidrati 2,57 g, minerali 0,2 g, acqua 0,2 g

<sup>3</sup> Lurpak, Danimarca, acquistato in loco, contenente 10% di acqua

<sup>4</sup> American Institute of Nutrition (1977)

<sup>5</sup> American Institute of Nutrition (1980)

<sup>6</sup> Misurato con la bomba calorimetria

Trattamento, stabulazione e sacrificio degli animali sono stati eseguiti in conformità alle linee guida del Ministero della Sanità Italiano.

### **Disegno sperimentale 1**

Nel primo disegno sperimentale ho utilizzato ratti di 60 giorni di età. All'inizio del periodo sperimentale, dopo 5-7 giorni di acclimatazione a 28°C (giorno zero), i ratti sono stati divisi in tre gruppi. Il gruppo N è stato alimentato con una dieta

standard di laboratorio, il gruppo D è stato alimentato con una dieta ad alto contenuto di grasso e il gruppo DT è stato alimentato con dieta iperlipidica ed ha ricevuto giornalmente un'iniezione intraperitoneale di T2 (25 µg /100 g di peso corporeo). Oltre al trattamento dietetico i ratti dei gruppi N e D hanno giornalmente ricevuto un'iniezione intraperitoneale di soluzione fisiologica. Peso corporeo ed assunzione di cibo sono stati monitorati ogni giorno per permettere il calcolo del guadagno di peso corporeo e dell'energia assunta sottoforma di cibo.

Tale trattamento è stato ripetuto in quattro diverse serie sperimentali allo scopo di rendere possibile l'effettuazione di differenti misure.

In una prima serie sperimentale è stata effettuata una valutazione del bilancio energetico dell'animale. Per tale motivo alcuni ratti sono stati sacrificati all'inizio del trattamento (N0). In seguito al sacrificio dei ratti le carcasse sono state pesate ed autoclavate per 90 minuti, tagliate in piccoli pezzi ed infine omogenizzate con acqua (volume finale uguale a due volte il peso della carcassa), mediante l'utilizzo di un omogenizzatore Politron. Successivamente aliquote dell'omogenato sono state utilizzate per analizzare la composizione corporea, misurando:

- il contenuto lipidico, secondo il metodo di Folch<sup>140</sup>;
- il contenuto di acqua, con un processo di essiccamento della carcassa;
- il contenuto energetico, con l'uso di una bomba calorimetria;

Il contenuto proteico è stato ottenuto dalla differenza tra il contenuto energetico totale corporeo e il contenuto energetico dei lipidi corporeo.

Si è valutato il bilancio energetico totale, focalizzando l'attenzione soprattutto sul guadagno energetico e sul metabolismo basale.

Su tale serie sperimentale sono state inoltre effettuate anche delle misure dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi, ALT (alanino ammino transferasi) e TSH da campioni di sangue che sono stati prelevati durante il sacrificio dalla vena cava inferiore dei ratti.

Una seconda serie sperimentale è stata utilizzata per effettuare una valutazione della funzionalità mitocondriale epatica, in termini di  $\beta$ -ossidazione degli acidi

grassi ed attività dell'enzima aconitasi, sullo sviluppo della steatosi e per le analisi istologiche di tale organo. In questo caso tutti i ratti sono stati sacrificati allo stato alimentato.

Una terza serie è stata utilizzata per valutare la tolleranza al glucosio. In questo caso i ratti sono stati sottoposti ad un digiuno di 16 ore al fine di misurare, poi, la glicemia e l'insulinemia in seguito ad un carico orale di glucosio;

Su una quarta serie è stata determinato il grado di insulino resistenza, mediante valutazione dell'Akt. I ratti di questa serie sono stati, ulteriormente, suddivisi in due gruppi. Un gruppo ha ricevuto una iniezione di insulina dopo sei ore di digiuno (10 U/kg di peso corporeo)<sup>141</sup> denominati Ni, Di, DTi; un secondo gruppo, invece, ha ricevuto una iniezione di soluzione fisiologica dopo tale digiuno. Dopo trenta minuti dall'iniezione, i ratti sono stati anestetizzati e sacrificati. Il muscolo gastrocnemio è stato, quindi, immediatamente, prelevato, congelato in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi, tramite Western Blot, dell'Akt.

## **Disegno sperimentale 2**

Nel secondo disegno sperimentale ho utilizzato ratti maschi di 180 giorni di età. Anche in questo caso dopo 5-7 giorni di acclimatazione a 28 °C (giorno zero), i ratti sono stati suddivisi in tre gruppi : N, D e DT, di cui il gruppo N è stato alimentato con una dieta standard di laboratorio, mentre D e DT con una dieta ad alto contenuto di grasso per 6 settimane. Alla fine del trattamento dietetico di 6 settimane, i ratti N e D hanno ricevuto una iniezione giornaliera di soluzione salina, mentre il gruppo DT ha ricevuto una iniezione di T2 (25µg/100g di peso corporeo) per 4 settimane. Durante queste 4 settimane ciascun gruppo continuava ad essere alimentato con la stessa dieta utilizzata nelle 6 settimane precedenti. Il peso corporeo e l'assunzione di cibo sono stati monitorati per l'intero periodo sperimentale in modo da ottenere delle informazioni generali sul bilancio energetico. Su questo disegno sperimentale l'interesse è stato prevalentemente rivolto allo studio della steatosi epatica; questo mediante analisi istologica di sezioni di fegato, mediante la misura dei

livelli serici di colesterolo, trigliceridi TSH e ALT ed attraverso una valutazione della funzionalità mitocondriale epatica in termini di  $\beta$ -ossidazione, efficienza e danno ossidativo; questo ultimo è stato determinato, misurando l'attività degli enzimi aconitasi e superossido dismutasi e il rilascio mitocondriale di  $H_2O_2$ . In questo disegno sperimentale tutti i ratti sono stati sacrificati allo stato alimentato.

## **METODICHE UTILIZZATE NEI DISEGNI SPERIMENTALI MISURE A LIVELLO CORPOREO.**

### **7.1 Metodiche utilizzate per determinare la composizione corporea e il bilancio energetico.**

#### **7.1.1 Misura del bilancio energetico dell'organismo.**

Durante tutto il periodo del trattamento dietetico è stato giornalmente controllato sia il peso corporeo sia la quantità di cibo introdotta dai ratti, per poter così calcolare l'energia introdotta sottoforma di cibo durante l'intero periodo sperimentale, cioè l'introito calorico lordo, considerando il valore energetico della dieta standard di laboratorio (15,88KJ/g) e quello della dieta iperlipidica (19,85 kJ/g) con cui sono stati nutriti gli animali. Tali valori sono stati ottenuti mediante l'utilizzo della bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico di Parr). L'utilizzo di tale strumento ha consentito la determinazione del contenuto energetico anche delle feci, raccolte durante l'intero periodo sperimentale, e della carcassa. Infatti da aliquote di omogenato dell'animale essiccato in stufa 60°C per 48 ore, è stato possibile determinare il contenuto energetico della carcassa.

Partendo da queste misure sono stati calcolati:

- ◆ il *guadagno di peso corporeo*, per differenza tra il peso corporeo misurato alla fine del trattamento e quello misurato all'inizio del periodo sperimentale ;
- ◆ il *guadagno lipidico*, per differenza tra il contenuto lipidico calcolato alla fine del trattamento, mediante il metodo di Folch, e quello calcolato all'inizio;
- ◆ il *guadagno proteico*, per differenza tra il contenuto proteico calcolato alla fine del trattamento e quello calcolato all'inizio;
- ◆ il *guadagno energetico* ottenuto dalla differenza tra il contenuto energetico corporeo finale e il contenuto energetico corporeo iniziale;

- ◆ l'*energia metabolizzabile (ME)* introdotta, calcolata sottraendo all'introito calorico lordo sia il contenuto energetico delle feci che l'energia persa con le urine (circa il 4%);
- ◆ l'*efficienza energetica*, calcolata come rapporto percentuale tra il guadagno di peso espresso in grammi e l'energia metabolizzabile assunta.
- ◆ l'*efficienza di deposito dei lipidi*, ottenuta dal rapporto tra guadagno lipidico/energia metabolizzabile.
  - ◆ il *metabolismo basale*, inteso come la minima spesa energetica necessaria per mantenere l'organismo in vita. Per questa misura è stato utilizzato un metabolimetro a circuito aperto.

### **7.1.2 Determinazione del metabolismo corporeo.**

Alla fine del periodo sperimentale la velocità metabolica a riposo (RMR) è stata misurata ai tre gruppi di ratti tra le 11:00 e le 11:30 di mattina, con un metabolimetro a circuito aperto, in una camera a 24°C. Ai ratti è stato permesso di adattarsi nella gabbia di misura per circa un'ora, e si è passati poi alla misura del metabolismo per almeno 10 minuti accertandosi che in tale periodo il ratto non si muovesse. Le misure di RMR sono state effettuate dopo 16 ore di digiuno, per eliminare l'effetto termico del cibo.

### **7.1.3 Misura del contenuto di acqua della carcassa.**

Il contenuto di acqua della carcassa è stato ottenuto distribuendo aliquote di omogenato in apposite vaschette; queste sono state pesate, poste in una stufa e fatte essiccare per 48 ore a 60°C. Una volta essiccate è stata calcolata la differenza del peso della vaschetta contenente l'omogenato prima e dopo l'essiccamento, e quindi si è calcolata la percentuale di acqua corporea.

#### **7.1.4 Misura del contenuto lipidico della carcassa.**

Il contenuto lipidico è stato calcolato mediante il metodo di Folch<sup>140</sup>, da aliquote di omogenato di carcassa, diluito 20 volte in una miscela cloroformio/metanolo (2:1), seguito da filtrazione; al filtrato ottenuto vengono aggiunti 0,2 volumi di NaCl 0,29% e dopo una agitazione vigorosa di 30 minuti e una centrifugazione a 1000 g per 20 minuti (21°C), si osserva la separazione di una fase acquosa superiore ed una fase lipidica inferiore. A questo punto la fase acquosa viene aspirata e l'interfaccia con la fase lipidica viene lavata con una soluzione contenente cloroformio/metanolo/NaCl (3:48:47), allo scopo di eliminare i contaminanti non lipidici dall'estratto. Successivamente, mediante l'utilizzo dell'evaporatore rotante di Heidolph è stato possibile ottenere il peso dei lipidi per grammo di carcassa e considerando il coefficiente 39,2kJ/g conoscere il contenuto lipidico in kJ di energia corporea depositata sotto forma di lipidi.

#### **7.1.5 Misure del contenuto energetico della carcassa.**

Il contenuto energetico della carcassa è stato ottenuto, grazie all'utilizzo della bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico Parr), da campioni dell'omogenato essiccato ridotti in polvere e pressati in modo da ottenere delle pasticche di peso 200mg. Per la misura ogni pasticca è posta su un piattello di platino, a contatto con un filo di nichel agganciato a due uncini di platino, attraverso cui è fatta passare corrente elettrica. Questo sistema è posto in un recipiente di acciaio (vaso di Dewar) circondato da un volume noto di acqua distillata, il tutto completamente separato dall'esterno da una intercapedine di materiale isolante. Nel recipiente di acciaio è compresso ossigeno alla pressione di 35 atm, per rendere possibile la combustione del campione. Il calore fornito dall'ossidazione dei substrati presenti nel campione fa innalzare la temperatura di un volume di acqua distillata noto, che circonda il recipiente di acciaio. Ogni misura può essere suddivisa in tre fasi:

1. una prima fase in cui viene dato alle varie parti del calorimetro il tempo di raggiungere l'equilibrio termico ( $T_i$ );
2. una seconda fase in cui il campione è ossidato e nel sistema si ha una variazione di temperatura ( $T_f$ );
3. una terza fase in cui il calorimetro raggiunge nuovamente l'equilibrio termico.

Attraverso il registratore della temperatura collegato al termometro immerso in acqua, viene misurato l'innalzamento termico ( $\Delta T$ ), come differenza tra la temperatura massima alla fine della combustione ( $T_f$ ) e quella prima della combustione ( $T_i$ ). La capacità termica  $C$  dell'apparecchio è stata determinata utilizzando come standard l'acido benzoico. La variazione di calore ( $Q$ ) viene calcolata moltiplicando la variazione di temperatura ( $\Delta T$ ) per la capacità termica ( $C$ ) della bomba calorimetrica,  $Q = \Delta T \times C$ , così è stato possibile poi calcolare il calore di combustione del campione  $\Delta H$  espresso in calorie per grammo, il  $\Delta H = (Q-f)/m$  dove,  $m$  = massa del campione di carcassa in esame,  $f$  = correzione per il filo fusibile in calorie.

Il valore del contenuto energetico della carcassa essiccata così ottenuto viene poi corretto per il contenuto di acqua della carcassa, per ottenere il valore effettivo per grammo di carcassa.

#### **7.1.6 Misure del contenuto proteico della carcassa.**

Infine il contenuto proteico della carcassa è stato ottenuto sottraendo il contenuto energetico dei lipidi dal contenuto energetico corporeo totale, utilizzando il coefficiente di 23.5 KJ/g, cioè sapendo che un grammo di proteine libera 23,5 kJ di energia, è stato possibile determinare i grammi di proteine per grammi di carcassa.

## **7.2 Determinazione dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi ALT e TSH**

Durante il sacrificio degli animali sono stati prelevati dei campioni di sangue dalla vena cava inferiore; tali campioni posti in apposite provette sono stati centrifugati alla velocità di 5000 rpm per 10 minuti e alla temperatura di 20°C, per poter separare il siero (surnatante) dalla parte corpuscolata del sangue (pellet). In seguito i campioni di siero sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse. In particolare si è effettuata la misura dei livelli serici di trigliceridi, colesterolo, ALT e TSH, utilizzando dei kit colorimetrici commerciali.

### **ANALISI RELATIVE ALLO SVILUPPO DELL'INSULINO RESISTENZA**

## **7.3 Test di risposta della glicemia ed insulinemia ad un carico orale di glucosio.**

Per poter costruire la curva da carico del glucosio, i ratti sono stati sottoposti ad un digiuno per 16 ore, avendo, però, libero accesso all'acqua.

Il glucosio (3g/Kg di peso corporeo)<sup>142</sup> è stato somministrato per via orale sottoforma di soluzione acquosa, mediante una siringa sprovvista di ago.

Il prelievo del sangue, e quindi, la determinazione della glicemia e dell'insulinemia (a digiuno), è stato effettuato al tempo zero, per valutare il valore basale di questi due parametri, e successivamente ad intervalli regolari di 30 minuti per tre ore, dopo aver somministrato il carico orale di glucosio.

In questo modo è stato possibile osservare la variazione della concentrazione ematica di glucosio e di insulina nel tempo.

Il prelievo del sangue viene fatto eseguendo un piccolo taglio all'apice della coda dell'animale e la concentrazione ematica di glucosio viene determinata mediante l'utilizzo di un glucometro.

Il sangue, poi, è stato raccolto e centrifugato alla velocità di 1500 rpm per 15 minuti al fine di separare il siero, rappresentato dal surnatante, dalla parte corpuscolata del sangue, cioè, il pellet. I campioni di siero sono stati in seguito utilizzati per la determinazione dei livelli serici di insulina.

### **7.3.1 Dosaggio del glucosio: principio e metodo utilizzati.**

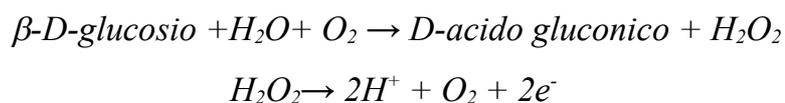
Il dosaggio del glucosio è stato effettuato utilizzando il glucometro ASCENSIA BRIO, con il quale sono stati forniti le strisce reattive per la misurazione della glicemia ed un chip di programmazione, nonché una striscia di controllo che consente di effettuare, in qualunque momento, un test per verificare il corretto funzionamento dello strumento. In seguito all'inserimento della striscia reattiva e all'applicazione della goccia di sangue sull'area di applicazione del campione, compare il valore della glicemia sul display in mg/dL.

Il test si basa sulla misurazione della corrente elettrica generata dalla reazione del glucosio con i reagenti presenti sull'elettrodo della striscia reattiva. Ogni cm<sup>2</sup> di reagente contiene i componenti nelle concentrazioni di seguito elencate:

- ∞ Glucosio ossidasi            4.2%
- ∞ Trasportatore di elettroni   29.5%
- ∞ Protettore di enzimi        4.6%
- ∞ Ingredienti non reattivi    61.7%

Il sangue penetra all'interno dell'area di applicazione del campione della striscia reattiva per azione capillare. Il campione reagisce con la glucosio ossidasi, stimolando l'ossidazione del glucosio nel sangue. L'enzima glucosio ossidasi è specifico per il glucosio e non reagisce con altri zuccheri, come il maltosio ed il galattosio, eventualmente presenti nel sangue. L'ossidazione del glucosio, catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi produce perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Il perossido di idrogeno liberato, si ossida in corrispondenza dell'elettrodo e produce una corrente di elettroni proporzionale alla concentrazione di glucosio nel campione.

La reazione catalizzata dell'enzima in questione è la seguente:



### 7.3.2 Dosaggio dell'insulina: ELISA.

L'insulina è stata dosata utilizzando il dosaggio immunoenzimatico ELISA a sandwich, (KIT commerciale Mercodia Rat Insulin ELISA).

Il kit è costituito da: una micropiastra di 96 pozzetti con un anticorpo anti-insulina ancorato sulla parete interna di ogni pozzetto, standards di insulina a differenti concentrazioni, una soluzione concentrata di anticorpo anti-insulina coniugato con perossidasi di rafano, una soluzione cromogeno di tetrametilbenzidina (TMB, substrato dell'enzima coniugato) in buffer citrato con perossido idrogeno (22 ml), una soluzione di lavaggio e da una soluzione per fermare la reazione, contenente acido solforico 0.5M.

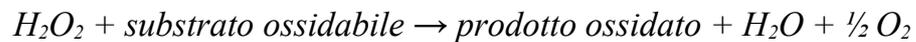
### 7.3.3 Procedura sperimentale del dosaggio dell'insulina.

Sono stati portati a temperatura ambiente tutti i campioni. Sono stati innanzitutto pipettati 25  $\mu\text{l}$  degli standards, dei controlli e dei campioni negli appropriati pozzetti, ciascuno in duplicato. E in seguito sono stati aggiunti 50  $\mu\text{l}$  di soluzione dell'anticorpo anti-insulina coniugato all'enzima perossidasi di rafano. terminate tali operazioni, la piastra è stata incubata a 25°C per 2 ore per consentire la formazione del complesso antigene-anticorpo.

L'antigene (insulina) si lega durante tale periodo con uno dei suoi epitopi all'anticorpo immobilizzato sulle pareti del pozzetto e con un altro epitopo all'anticorpo marcato e coniugato all'enzima.

Dopodiché, per eliminare i residui di antigene e di anticorpo non legato, è stata aspirata completamente la soluzione da ogni pozzetto contenente l'antigene e gli anticorpi marcati che non hanno formato il complesso antigene-anticorpo. Sono stati effettuati 5 lavaggi in modo da evitare una sovrastima della misura a causa della presenza in eccesso dell'anticorpo. A questo punto sono stati pipettati in ogni pozzetto 200 µl della soluzione contenente il cromogeno TMB ed è stata incubata la piastra per 15 minuti a temperatura ambiente. Durante l'incubazione, l'enzima provvisto del suo substrato ha potuto catalizzare la reazione di ossidazione della tetrametilbenzidina con formazione di un composto colorato.

La reazione catalizzata dall'enzima in questione è la seguente:



L'aggiunta nei pozzetti della soluzione contenente il substrato dell'enzima coniugato all'anticorpo marcato ha come scopo quello di andare a dosare l'enzima mediante l'assorbanza del suo prodotto e di ricavare indirettamente da tale dosaggio la concentrazione dell'anticorpo marcato e, quindi, quello dell'antigene.

Trascorsi i 15 minuti di incubazione, sono stati aggiunti 50 µl della soluzione di acido solforico ad ogni pozzetto in modo da far variare il pH e bloccare la reazione.

Bloccata la reazione della perossidasi, la piastra è stata posta in uno spettrofotometro e sono stati letti i valori di assorbanza a 450 nm.

## **Calcoli.**

Il dosaggio dell'enzima da cui si può indirettamente ricavare la concentrazione dell'insulina nei sieri, richiede la costruzione di una retta di taratura. E' stata calcolata la media dell'assorbanza per ogni standard e campione. E' stata costruita una retta di taratura, plottando il logaritmo della media dell'assorbanza sull'asse delle x in funzione del logaritmo della concentrazione degli standards sull'asse delle y, applicando una regressione lineare.

Sono state calcolate le concentrazioni di insulina dei campioni in esame in base alla loro assorbanza riportata sulla retta di taratura.

## **7.4 Analisi delle proteine mediante Western Blot.**

Il Western blot, o immunorivelazione, è una tecnica immunochimica che permette di valutare l'espressione quantitativa di una determinata proteina e la sua localizzazione in una miscela di proteine precedentemente sottoposte ad una elettroforesi su gel di poliacrilammide che è stata eseguita secondo il metodo di Laemmli per la realizzazione di gel discontinui<sup>143</sup>.

Questa metodica prevede la preparazione di due tipi di gel:

- stacking gel (per il caricamento dei campioni);
- separating gel (per la separazione delle proteine).

La preparazione dello stacking gel è eseguita utilizzando:

- TRIS 0.125 M
- SDS 0,1 % pH 6.8
- miscela di acrilammide 4%, TEMED 0,1%, ammonio persolfato 0.05%.

Il separating gel è preparato utilizzando:

- TRIS 0.375 M

- SDS 0,1 % pH 8.8
- miscela di acrilammide 13%, TEMED 0,1%, ammonio persolfato 0.05%.

La preparazione di questi gel prevede che venga versata prima la miscela di separating gel per la separazione delle proteine, e, dopo la sua polimerizzazione, si effettua il versamento della miscela di stacking gel per il caricamento dei campioni.

I campioni proteici (costituiti da 30 µg di lisato mitocondriale) che sono caricati nei pozzetti, sono stati precedentemente diluiti nella soluzione costituita da:

- TRIS 50 mM
- DTT 10 mM
- Glicerolo 10%
- SDS 2 %
- Blu di bromofenolo 0.001% pH 6.8

Prima di essere caricati sul gel i campioni sono riscaldati a 95° C per 5 minuti.

La corsa è effettuata a 200V per 1h, utilizzando come tampone una soluzione costituita da:

- TRIS 25 mM
- Glicina 192 mM
- SDS 0.1 % pH 8.6

Dopo la corsa elettroforetica, il materiale proteico è stato trasferito su una membrana di nitrocellulosa in un tampone di trasferimento contenente: TRIS 16.5mM, glicina 150 mM pH 8.3, metanolo 20% utilizzando un voltaggio di 100 V per 45 minuti. Al termine del trasferimento, la membrana è stata asciugata all'aria per 15 minuti al fine di rimuovere il metanolo.

La membrana viene, in seguito, lavata per 5 minuti nel tampone TBS-tween composto da PBS 1x, %. (che si ottiene diluendo 1:10 il PBS 10X: NaCl 1.37M, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18mM), tween 20.

Per ottenere il blocco di siti aspecifici tra la nitrocellulosa e le proteine, la membrana viene incubata a temperatura ambiente per 1 ora in una soluzione di TBS-tween e agente bloccante (latte 5%). Successivamente il filtro viene incubato tutta la notte a 4°C con 1µg/ml di anticorpo primario (anticorpo policlonale rabbi tanti-Human Akt; Chemicon International, Inc) nel tampone che contiene TBS-tween-latte 2% per la forma totale e BSA al 5% per la forma fosforilata. In seguito per allontanare l'anticorpo legato in modo aspecifico, la membrana viene sottoposta a 4 lavaggi di 15 minuti ognuno per rilevare la proteina totale, mentre 3 lavaggi di 5 minuti ognuno per rilevare la forma fosforilata della proteina stessa col tampone TBS-tween. Terminati i lavaggi, il filtro viene incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario appropriato (Goat anti-rabbit), coniugato con l'enzima perossidasi (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) diluito 1:4000 in TBS-tween e latte al 7% per la forma fosforilata e latte al 2% per la forma totale. Anche questa volta, per allontanare l'anticorpo secondario legato in modo aspecifico, vengono effettuati gli stessi lavaggi.

Per rilevare il segnale della proteina viene utilizzata la reazione di chemiluminescenza effettuata con un mix di incubazione composto da 5 ml di luminolo 1,25 mM, 50 µl di acido cumarico 6.8.mM, 15 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%.

La membrana viene, quindi, incubata con questo mix per 1 minuto e successivamente viene esposta con una lastra per autoradiografia in cassette radiografiche a temperatura ambiente per 45-50 minuti. Dopodichè è possibile sviluppare la lastra sulla quale si osservano delle bande corrispondenti alla proteina di interesse che viene quantizzata mediante un software di densitometria. (Quantify one SW Analyzer GS800 Densytomer, Biorad)

## ANALISI A LIVELLO EPATICO

### **7.5 Determinazione del contenuto epatico di trigliceridi**

L'estrazione dei lipidi dal fegato è stata effettuata in accordo con il metodo di Folch<sup>140</sup>, precedentemente descritto.

I trigliceridi sono stati determinati nell'estratto lipidico del fegato, mediante l'utilizzo di un Kit commerciale colorimetrico.

### **7.6 Analisi istologica**

Il fegato è stato analizzato istochimicamente per valutare il contenuto di grasso. Al momento del sacrificio sezioni di fegato sono state fissate in Tissue Tek e congelate. Successivamente sezioni di 10 µm sono state inviate ad un laboratorio di analisi istologiche dove sono state colorate con il Sudan Black per la rilevazione del grasso.

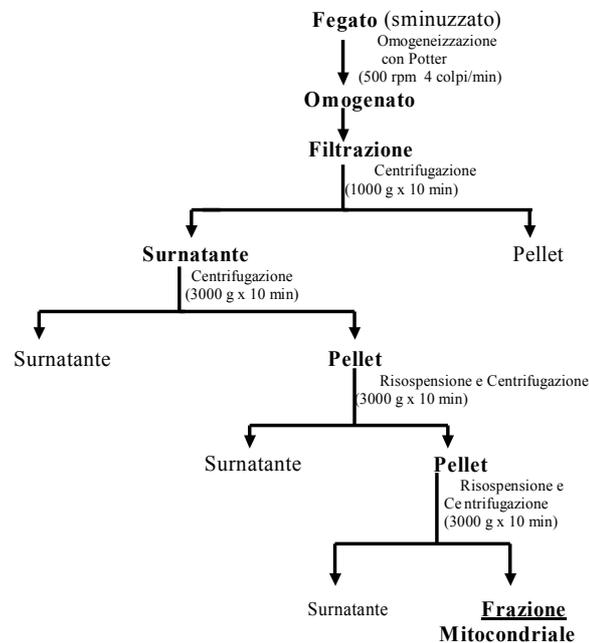
## ANALISI DEI PARAMETRI MITOCONDRIALI

### **7.7 Preparazione dei mitocondri.**

Subito dopo il sacrificio, il fegato è stato prelevato, finemente sminuzzato ed omogeneizzato in una soluzione contenente mannitolo 220mM, saccarosio 70 mM, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM e 0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi (BSA) a pH 7.4 (diluizione 1:10), in un omogenizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) settato a 500 rpm (4 colpi/min). L'omogenato è stato, poi, filtrato attraverso delle garze sterili e privato di cellule intatte e nuclei attraverso una centrifugazione a 1000g per 10 minuti; i surnatanti ottenuti sono stati di nuovo centrifugati a 3000g per 10 minuti. Il pellet mitocondriale così ottenuto è stato lavato due volte ed infine

risospeso in un tampone contenente LiCl 80 mM, HEPES 50 mM, Tris P 5 mM, EGTA 1 mM, 0,1% (peso/volume) di albumina di siero bovina libera da acidi grassi a pH 7.0. Caratterizzazioni microscopiche ed enzimatiche hanno mostrato che la nostra procedura di isolamento (centrifugazione a 3000 g per 10 minuti) fornisce una frazione cellulare che è costituita essenzialmente da mitocondri<sup>144</sup>. I mitocondri isolati sono stati usati per misurare la velocità dell'ossidazione degli acidi grassi, l'efficienza mitocondriale e il danno ossidativo, quest'ultimo mediante il dosaggio dell'attività dell'aconitasi, un enzima sensibile al danno da radicali liberi e, per tale, utilizzato come indice di stress ossidativo.

### Metodica di isolamento dei mitocondri di fegato



#### **7.7.1 Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati.**

I mitocondri epatici sono stati utilizzati per valutare il consumo d'ossigeno polarograficamente, mediante l'utilizzo dell'elettrodo di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Oh, USA).

Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e da un anodo d'argento, entrambi immersi in una soluzione di KCl (0,1 M) e separati dalla soluzione in

esame, tramite una membrana. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. In tal modo, l'ossigeno al catodo si riduce e origina una corrente proporzionale all'attività dell'ossigeno presente in soluzione, nel momento in cui è applicato agli elettrodi un voltaggio di 0.5 – 0.8 volts. All'anodo, infatti, sono prodotti quattro elettroni a loro volta utilizzati per ridurre una molecola di ossigeno al catodo. La tensione di ossigeno al catodo, quindi, tende ad azzerarsi promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo.

L'elettrodo di Clark consente, quindi, di misurare i rapidi cambiamenti che si riscontrano nell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari.

Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando, per il fegato, un mezzo di incubazione contenente KCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, PH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA.

Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri sono indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori per la  $\beta$ -ossidazione, quali la palmitoil-carnitina (40 $\mu$ M) e malato (2,5 mM).

Le misure sono state effettuate in assenza (Stato 4 o stato non fosforilante della respirazione) o in presenza (Stato 3 o stato fosforilante della respirazione) di 0,6 mM di ADP. In tal modo è stato possibile misurare il Rapporto del Controllo Respiratorio (RCR, velocità dello stato3 diviso velocità stato 4) in accordo con il metodo di Estabrook<sup>145</sup>, e pertanto verificare l'integrità dei mitocondri isolati.

Il consumo di ossigeno è espresso in ng di atomi di O al minuto per mg di proteine mitocondriali.

### 7.7.2 Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato utilizzando la lettura spettrofotometrica, ottenuta mediante uno spettrofotometro (JASCO) a doppia lunghezza d'onda, della safranina, un colorante che in virtù della sua carica elettrica si lega alla membrana mitocondriale in maniera proporzionale al potenziale<sup>146</sup>. Lo spettrofotometro adoperato è programmato in modo tale che la lunghezza d'onda di riferimento (533 nm) coincida con il punto isobestico della safranina, cioè quel punto dello spettro di assorbimento in cui la molecola di colorante mostra la stessa assorbanza sia nello stato legato che in quello non legato alla membrana mitocondriale. La lunghezza d'onda di lettura è invece 511 nm. Per risalire al potenziale di membrana dai valori dell'assorbanza, si effettuano misure dell'assorbanza della safranina in presenza di valinomicina 3  $\mu\text{M}$ , un trasportatore specifico del potassio, e di quantità crescenti di KCl necessarie ad alterare la concentrazione esterna di potassio nel range 0.1 - 20 mM. A questo punto si costruisce una retta di taratura che mette in relazione le variazioni di assorbanza al logaritmo della concentrazione di potassio esterna, e che, quindi, consente di risalire alla concentrazione extra ed intramitocondriale di tale ione.

Per estrapolazione da tale retta, infatti, si ricava la concentrazione interna di potassio, considerando che quando la variazione di assorbanza della safranina è nulla anche il potenziale di membrana è pari a zero e quindi, in base all'equazione di Nernst, le concentrazioni di potassio esterna ed interna si equivalgono. Ottenute le concentrazioni di potassio esterna ed interna alla membrana mitocondriale, mediante l'equazione di Nernst ( $\Delta\Psi = 61 \text{ mV} \times \log ([\text{K}^+]_{\text{in}} / [\text{K}^+]_{\text{out}})$ ), si può calcolare il potenziale di membrana dei mitocondri e realizzare un grafico per mettere in relazione i valori di potenziale di membrana con l'assorbanza della safranina. A questo punto dalla curva si potranno ottenere i valori del potenziale di membrana mitocondriale nelle varie condizioni sperimentali utilizzate.

### 7.7.3 Misura della conduttanza protonica basale.

L'applicazione del metodo di Brand<sup>10</sup> ha consentito la valutazione della conduttanza protonica basale dei mitocondri isolati. Questa metodica consiste in una titolazione della respirazione con il succinato a partire dallo Stato 4 della respirazione, in presenza di oligomicina, con quantità crescenti di malonato, un inibitore competitivo del secondo complesso della catena respiratoria, la succinico deidrogenasi, e permette di determinare le variazioni del potenziale di membrana associate alle variazioni del consumo di ossigeno ottenute in queste condizioni.

Per poter determinare sperimentalmente la conduttanza protonica basale si adopera l'oligomicina, un antibiotico capace di abolire il flusso di protoni attraverso l'ATP sintetasi, prevenendo il passaggio dei protoni attraverso la subunità Fo. In questo modo si fa sì che il flusso protonico valutato dipenda solo dalla conduttanza protonica basale.

Per una determinazione accurata della conduttanza protonica basale può essere valutata la risposta cinetica del potenziale di membrana mitocondriale a variazioni del consumo di ossigeno, ottenute diminuendo progressivamente le reazioni di ossidazione del succinato del mitocondrio nello Stato 4 con un inibitore della catena di trasporto degli elettroni, quale il malonato. Al diminuire della velocità di ossidazione del substrato diminuisce la velocità di pompaggio di protoni all'esterno e quindi anche il valore del potenziale di membrana. La variazione del consumo di ossigeno in funzione del potenziale di membrana, in mitocondri che respirano in assenza di fosforilazione, ci permette di valutare la variazione cinetica della conduttanza protonica in funzione del potenziale di membrana. Infatti le curve di titolazione così ottenute sono una misura indiretta della conduttanza protonica perché, in stato stazionario, la velocità del consumo di ossigeno (cioè il flusso protonico in uscita) nei mitocondri in assenza di fosforilazione equivale al flusso protonico in entrata dovuto alla conduttanza protonica. In effetti il potenziale di membrana ( $\Delta p$ ) è costituito da due componenti:

∞ la differenza di potenziale elettrico ai capi della membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi$ );

∞ la differenza di potenziale chimico protonico ( $\Delta\text{pH}$ ).

Sperimentalmente è possibile abolire il  $\Delta\text{pH}$  facendo in modo che il  $\Delta\text{p}$  □risulti uguale al  $\Delta\Psi$  a questo scopo si utilizza la nigericina, uno scambiatore  $\text{H}^+/\text{K}^+$ , in grado di annullare la differenza di pH a livello della membrana mitocondriale interna, e di conseguenza abolire la differenza di potenziale chimico, trasformandola in differenza di potenziale elettrico. Le misure sono state effettuate a 30°C in una soluzione contenente per il fegato LiCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, Tris- $\text{PO}_4$  5 mM, pH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA libera da acidi grassi. Per ogni misura a questa soluzione è stato aggiunto succinato 10 mM, rotenone 3.75  $\mu\text{M}$ , oligomicina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , safranina (83.3 nmol/mg) e nigericina (80 ng/ml).

La titolazione dello Stato 4 della respirazione è stata eseguita mediante sequenziali aggiunte di malonato a concentrazioni crescenti fino a 5 mM.

#### **7.7.4 Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi.**

Per avere informazioni sul disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stata anche effettuata la determinazione della cinetica della *conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi* in analogia a quella effettuata per la conduttanza protonica basale. Tale determinazione è stata ottenuta titolando la respirazione ed il potenziale di membrana in presenza di oligomicina, succinato e palmitato con quantità crescenti di malonato fino a 0.6 mM per i mitocondri epatici. Le concentrazioni di palmitato da aggiungere sono state calcolate tenendo conto dell'interazione tra gli acidi a lunga catena e l'albumina<sup>147</sup>. Le concentrazioni di acido grasso che effettivamente si aggiungono nella camera di misura sono di 85  $\mu\text{M}$  per le misure effettuate sui mitocondri di fegato.

### **7.7.5 Determinazione dell'attività totale della Carnitina-palmitoil-transferasi.**

L'attività totale della Carnitina-Palmitoil-Transferasi (CPT) è stata misurata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 412 nm, seguendo la cinetica della produzione di CoA-SH carnitina-dipendente in presenza di acido 5,5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB) usando palmitoil-CoA come substrato.

Il metodo spettrofotometrico è basato sul rilascio di CoA dai tioesteri dell'Acil-CoA. Ciò induce la riduzione del DTNB ad acido 5-tio-2-nitrobenzoico che determinerà lo sviluppo di un colore giallo. La reazione è stata misurata seguendo la metodica di Alexon e Nedergard <sup>148</sup>, incubando i mitocondri in: 75 mM di HEPES (pH 7.5), 10 mM di EDTA, 10 mg/ml di BSA, 2.5 ml di Palmitoil-CoA, 3 mM di DTNB. Tutte le provette contenenti le soluzioni sono state incubate per 3 minuti a 35°C prima di aggiungere Palmitoil-CoA e carnitina. La concentrazione dei tioli rilasciati è stata calcolata dal coefficiente di estinzione molare,  $E_{412nm} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  dopo aver corretto per la reazione aspecifica dei gruppi sulfidrilici dell'enzima con DTNB e per l'idrolisi non specifica della Palmitoil-CoA.

### **7.7.6 Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale.**

Il dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare “in vivo” i danni prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche<sup>149</sup>. Infatti l'aconitasi è un enzima particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali dell'ossigeno<sup>150-151</sup>, per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi nel suo sito attivo, un cluster [4Fe-4S], che è il principale bersaglio dei radicali liberi. Il meccanismo di inattivazione dell'aconitasi da parte dei radicali liberi è il rilascio di ferro dal

cluster [4Fe-4S]. L'aconitasi è un enzima del ciclo di Krebs, che catalizza la conversione reversibile di acido citrico in isocitrico, che viene poi ossidato dalla isocitrico deidrogenasi ad  $\alpha$ -chetoglutarato, con formazione di NADP ridotto (NADPH).

Il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm dovuto alla formazione di NADPH. I campioni sono stati incubati a 25°C in un buffer costituito da Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 e MnCl<sub>2</sub> 0,6 mM, NADP<sup>+</sup> 0,2 mM, sodio-citrato 30 mM e 2 U/ml di isocitrico deidrogenasi e la formazione di NADPH è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm a 25°C.

La misura è stata realizzata in presenza di Triton 1%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare.

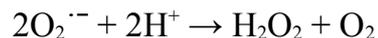
L'attività dell'aconitasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  del NADPH,  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Il livello dell'attività di questo enzima, misurata nell'estratto mitocondriale, eguaglia l'aconitasi attiva (livello basale).

L'aconitasi inibita dai ROS è stata riattivata affinché l'attività totale potesse essere misurata mediante l'incubazione degli estratti mitocondriali in un mezzo contenente ditiotreitolo (DTT) 50 mM, Na<sub>2</sub>S 0,2 mM e solfato ammonio ferroso 0,2 mM.

#### **7.7.7 Determinazione dell'attività della superossido dismutasi.**

La superossido dismutasi è un enzima che catalizza la reazione:



Quindi ha il compito di ripulire la cellula dai radicali liberi e mantiene la concentrazione dei radicali ossigeno ad un livello straordinariamente basso in diverse cellule e organelli<sup>152</sup>. Il dosaggio della superossido dismutasi si realizza spettrofotometricamente andando a monitorare la velocità di riduzione del

citocromo C, utilizzando il sistema xantina-xantina ossidasi come produttore di  $O_2^{\cdot-}$ .

La superossido dismutasi, competendo con i radicali  $O_2^{\cdot-}$  che determinano la riduzione del citocromo C, provoca una diminuzione della velocità di riduzione del citocromo C.

Il dosaggio si effettua utilizzando il metodo descritto da Flohè ed Ötting<sup>153</sup>. L'attività specifica della SOD è stata misurata utilizzando un buffer costituito da  $KH_2PO_4$  50 mM, EDTA 0,1 mM, KCN 2 mM, xantina 0,1 mM, NaOH 0,1 mM, citocromo C 20 mM e 0,0033 U/ml di xantina ossidasi.

Le misure sono state effettuate spettrofotometricamente (550 nm) a 25°C monitorando il decremento nella velocità di riduzione del citocromo C da parte dei radicali liberi generati dal sistema xantina/xantina ossidasi<sup>154</sup>. L'attività della SOD, espressa come Unità/mg di proteine, viene calcolata tenendo presente che una Unità di superossido dismutasi è definita come la quantità di enzima che inibisce del 50% la riduzione del citocromo C.

#### **7.7.8 Determinazione del rilascio mitocondriale di $H_2O_2$ .**

È stato considerato come indicativo della produzione mitocondriale di ROS il rilascio di  $H_2O_2$ , che si forma dalla trasformazione dei radicali liberi dell'ossigeno ad opera della SOD. La velocità del rilascio mitocondriale di  $H_2O_2$  è stata determinata misurando l'incremento della fluorescenza (eccitazione a 312 nm, emissione a 420 nm) provocato dall'ossidazione dell'acido omovanillinico ad opera dell'  $H_2O_2$  in presenza della perossidasi di rafano. Il buffer di incubazione, pH 7.4, è composto da: KCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM,  $K_2HPO_4$  5 mM,  $MgCl_2$  2 mM, BSA 0,3% a 37°C in un volume totale di 1,5 ml.

In tale buffer sono state incubate:

- Proteine mitocondriali 0,25 mg/ml
- Perossidasi di rafano 12 U/ml
- Acido omovanillinico 0,1 mM

- SOD 50 U/ml

Dopo 10 secondi dall'incubazione sono stati aggiunti 20 $\mu$ l di succinato.

La fluorescenza è stata letta al fluorimetro, dotato di una cella termostaticamente controllata ed interfacciato con un PC IBM-compatible. La curva standard è stata ottenuta aggiungendo quantità note di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per tarare lo strumento in presenza di acido omovanillinico e perossidasi di rafano.

### **7.8. ANALISI STATISTICHE.**

I dati ottenuti sono stati riportati come le medie  $\pm$  errore standard delle medie (ES) di cinque differenti ratti. Le analisi statistiche sono state compiute usando l'analisi della varianza ANOVA. Il confronto tra i singoli gruppi è stato fatto tramite il Newmann-Keuls. Il livello minimo di significatività scelto è stato  $P < 0,05$ .

Tutte le analisi sono state compiute usando il programma Graphpad Prism (Graphpad software inc., San Diego, CA,USA).

## **CAPITOLO 8.**

### **RISULTATI.**

#### **DISEGNO SPERIMENTALE 1**

#### **BILANCIO ENERGETICO CORPOREO E LIVELLI SERICI DI METABOLITI DI INTERESSE**

I dati sul guadagno di peso corporeo e sull'energia assunta sottoforma di cibo sono riportati in tabella 1. Dalla tabella si osserva che dopo quattro settimane di trattamento i ratti alimentati con dieta iperlipidica, gruppo D mostrano un guadagno di peso corporeo significativamente maggiore del 23% rispetto ai ratti alimentati con dieta standard di laboratorio, gruppo N; mentre i ratti alimentati con dieta iperlipidica e che ricevono una iniezione di T2, ovvero il gruppo DT, hanno un guadagno di peso corporeo simile a quello degli N.

La quantità di energia introdotta non varia, invece, in maniera significativa nei tre gruppi di ratti.

Per quanto riguarda l'efficienza energetica, calcolata come percentuale del rapporto tra il guadagno di peso corporeo e l'energia introdotta, si nota che essa aumenta significativamente nei ratti D rispetto ai ratti N del 33%, mentre nei ratti DT questa risulta significativamente ridotta del 19%, rispetto ai D ed è molto simile a quella degli N.

Questi risultati mettono in evidenza che i ratti D hanno una maggiore tendenza ad accumulare energia, rispetto ai ratti trattati con T2, nei quali la maggior parte dell'energia viene invece spesa. Dall'analisi della composizione corporea, tabella 2, si evidenzia che i ratti D e DT hanno un aumento significativo del contenuto lipidico e del contenuto energetico rispetto ai ratti N, mentre il contenuto di acqua e di proteine rimane invariato nei tre i gruppi di ratti.

Per quanto riguarda invece il guadagno lipidico corporeo nei ratti D è significativamente aumentato rispetto agli N, dell'80%, mentre risulta ridotto del

21% nei ratti DT se confrontati ai D. Non è stata riscontrata una significativa differenza nei tre gruppi di ratti per quanto riguarda invece il guadagno proteico. Infine ho calcolato il rapporto tra il guadagno di lipidi e l'energia introdotta, tale rapporto è risultato più alto del 67% nei ratti D, rispetto agli N, mentre diminuisce del 18% nei ratti DT rispetto ai ratti D.

I risultati derivati dalla misura del metabolismo basale, riportati in tabella 3, mettono in evidenza un significativo aumento del consumo di ossigeno, della produzione di anidride carbonica e della spesa energetica nei ratti DT rispetto agli N e ai D; il quoziente respiratorio è significativamente diminuito nei ratti D e DT rispetto agli N, indice di una maggiore ossidazione lipidica in tali animali.

Da questi primi risultati si può dunque concludere che la somministrazione di T2 in ratti trattati con dieta iperlipidica porta ad un minore guadagno di peso corporeo, guadagno lipidico ed efficienza corporea ed una maggiore spesa energetica rispetto al solo trattamento con dieta iperlipidica.

Nella tabella 4 sono riportati i valori dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi ALT ed i dati mettono in evidenza che i livelli serici di questi tre parametri nei ratti D sono significativamente più elevati rispetto a quelli degli N e che nei ratti DT tali valori risultano significativamente minori se confrontati ai ratti D. In particolare i livelli serici di colesterolo sono più alti nei D rispetto agli N, ma ridotti significativamente del 19% nei DT, se confrontati ai D. I livelli serici di trigliceridi nei ratti D sono il 135% più alti rispetto agli N, la somministrazione di T2 riduce significativamente i trigliceridi ad un valore simile a quello degli N. I valori serici di ALT sono significativamente più alti del 38% nei ratti D, se confrontati agli N, indice dunque di un danno epatico in tali ratti; mentre la somministrazione di T2 riduce il valore di tale parametro ad un valore non significativamente differente da quello degli N. Non si osserva nessuna significativa variazione dei livelli serici di TSH nei tre gruppi di ratti. Questi risultati indicano che la somministrazione di T2 porta a livelli serici di colesterolo, di trigliceridi e ALT minori rispetto ai ratti trattati solo con dieta iperlipidica senza influenzare l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide.

## ANALISI RELATIVE ALLO SVILUPPO DI INSULINO RESISTENZA

In figura 1 è riportato il test di risposta della glicemia ed dell'insulinemia in seguito ad un carico orale di glucosio. Dalle curve glicemiche è possibile notare che i ratti D se paragonati ai ratti N, mostrano un valore AUC (area sottesa la curva) significativamente maggiore, mentre tale valore risulta minore nei ratti DT se confrontati ai ratti D.

Le curve dell'insulina nei tre gruppi di ratti considerati, mostrano, invece, che nei ratti D e DT, rispetto ai ratti N, le aree sottese sono significativamente maggiori rispettivamente del 67% e del 57%.

Da questi risultati si evince, quindi, che la T2 migliora la tolleranza al glucosio e la sensibilità all'insulina come indicato anche dai risultati ottenuti sulla fosforilazione dell'Akt nel muscolo scheletrico.

In figura 2, sono, infatti, riportati i livelli di fosforilazione dall'Akt a livello del muscolo scheletrico. La fosforilazione dell'Akt insulino-indotta è minore nei ratti D e DT rispetto ai ratti N, tuttavia nei ratti DT è maggiore rispetto ai ratti D.

## ANALISI A LIVELLO EPATICO: ACCUMULO DI LIPIDI E FUNZIONALITA' MITOCONDRIALE

In figura 3a sono riportate le foto dei fegati prelevati dai ratti al momento del sacrificio con le rispettive immagini delle analisi istologiche delle sezioni di fegato. Dalle foto dei fegati si evince che i ratti alimentati con dieta iperlipidica (D), sia rispetto ai ratti alimentati con la dieta standard di laboratorio (N) che a quelli che hanno ricevuto iniezione di T2, hanno un maggiore accumulo di grasso nel fegato. Il loro fegato, infatti, ha un colore più chiaro rispetto a quello degli altri due gruppi. Questi dati confermano che la somministrazione di T2 contemporaneamente al trattamento con dieta iperlipidica è in grado di prevenire l'accumulo di lipidi epatici. Tali osservazioni sono avvalorate dai risultati ottenuti dall'analisi istologica delle sezioni di fegato, infatti tali sezioni colorate

con il Sudan black mostrano la presenza di un maggior numero di goccioline lipidiche nei ratti D rispetto agli N, mentre le sezioni del fegato dei ratti DT mostrano un numero di goccioline lipidiche ridotto rispetto ai ratti D.

In figura 3b sono riportati i livelli epatici di trigliceridi. I dati mettono in evidenza che nei ratti D si ha un aumento significativo di tale valore rispetto agli N del 106%; mentre nei ratti DT si osserva una significativa riduzione dei trigliceridi epatici se confrontati ai D del 42%.

Questi dati confermano che la somministrazione di T2 contemporaneamente al trattamento con dieta iperlipidica è in grado di portare ad un minore accumulo di grassi a livello epatico rispetto ai ratti trattati solo con dieta iperlipidica.

In figura 4a è riportata la velocità di *ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri epatici*. I risultati mettono in evidenza che la velocità respiratoria mitocondriale, in presenza di palmitoil-carnitina come substrato, è più alta nei ratti D e DT se paragonati ai ratti N rispettivamente del 30% e del 84%. Questi risultati indicano che la T2 aumenta la capacità dei mitocondri di ossidare gli acidi grassi.

In figura 4b sono riportati i valori relativi all'attività della CPT. Tale valore è aumentato significativamente nei ratti D rispetto agli N del 38% ed è ulteriormente aumentato nei ratti DT rispetto ai D del 52%. Questi dati mettono in evidenza che la somministrazione di T2 incrementa non solo l'ossidazione ma anche il trasporto degli acidi grassi nei mitocondri epatici.

Ho valutato anche l'efficienza energetica mitocondriale, misurando la conduttanza protonica basale. In figura 5 sono riportati i risultati della conduttanza protonica basale, come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni del consumo di ossigeno nei mitocondri dei ratti N, D e DT. La curva risultante dalla titolazione dello Stato 4 della respirazione in funzione del potenziale di membrana in assenza di fosforilazione ossidativa nei mitocondri isolati di fegato è una misura indiretta della conduttanza protonica, ossia della perdita protonica mitocondriale. I dati mostrano che nei ratti DT la conduttanza protonica basale è maggiore rispetto ai ratti D ed N. Questo significa che per mantenere un certo potenziale di

membrana, i mitocondri dei ratti DT consumano più ossigeno, rispetto agli altri due gruppi di ratti. Dunque la somministrazione di T2 porta ad una maggiore conduttanza protonica basale e quindi ad una maggiore dissipazione di energia sotto forma di calore. Considerando, che, come già detto, lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella patogenesi della steatosi, ho voluto misurare anche un parametro dello stress ossidativo, quale è, appunto, l'aconitasi, enzima del ciclo di Krebs, sensibile alle specie reattive dell'ossigeno.

In figura 6 viene riportata, quindi, la misura del rapporto tra aconitasi basale/aconitasi totale, il cui decremento è direttamente proporzionale all'aumento della produzione di ROS. I risultati presentati in figura 6 indicano che la dieta ad alto contenuto di grasso induce stress ossidativo a livello mitocondriale, comportando una maggiore produzione di ROS. Infatti, quando paragonati ai ratti N, i ratti D mostrano una maggiore inibizione dell'attività dell'enzima aconitasi, come indicato dalla significativa riduzione del rapporto aconitasi basale/aconitasi totale, nei ratti DT tale valore è significativamente minore rispetto ai ratti N, ma è maggiore rispetto ai ratti D. Questi dati indicano che la somministrazione di T2 a ratti alimentati con una dieta iperlipidica riduce lo stress ossidativo epatico mitocondriale.

## DATI RELATIVI AL PRIMO DISEGNO SPERIMENTALE

TABELLA 1

Guadagno corporeo, energia introdotta ed efficienza energetica nei ratti N,  
D e DT

	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>DT</b>
<b>Guadagno di peso corporeo, g</b>	78,0 ± 4,0	95,2 ± 4,0*	79,4 ± 3,0#
<b>Energia totale introdotta, kJ</b>	7394±182	8111±159	7764±182
<b>Efficienza energetica, %</b>	1,05±0,02	1,17±0,02*	1,02±0,01#

I valori sono le medie ± ES di 5 differenti esperimenti

\* P < 0,05 rispetto a N, #P < 0,05 rispetto a D

**TABELLA 2****Contenuto lipidico, proteico ed energetico nei ratti N, D e DT**

	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>DT</b>
<b>Contenuto lipidico %</b>	12,2±0,73	14,9±0,37*	14,2±0,52*
<b>Contenuto di H<sub>2</sub>O %</b>	61,1±0,90	57,1±1,82	59,8±0,26
<b>Contenuto di proteine %</b>	17,8±0,71	17±0,65	17,2±0,83
<b>Energia, kJ</b>	9±0,03	9,8±0,08*	9,6±0,09*
<b>Guadagno lipidico, g</b>	12,9±1,2	23,2±1,0*	18,4±1,4*#
<b>Guadagno lipidico, kJ</b>	506,3±65	911±54*	722,9±61*#
<b>Guadagno proteico, g</b>	14,6±3,3	15,7±3	13,7±2,2
<b>Guadagno proteico, kJ</b>	343,7±77,22	369,8±71,28	322±50,76
<b>Guadagno lipidico/energia introdotta</b>	6,7±0,2	11,2±0,55*	9,2±0,3*#

**I valori sono le medie ± ES di 5 differenti esperimenti****\* P < 0,05 rispetto a N, # P < 0,05 rispetto a D**

**TABELLA 3**

**Consumo di ossigeno, produzione di anidride carbonica, quoziente respiratorio e spesa energetica nei ratti N, D e DT**

	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>DT</b>
<b>VO<sub>2</sub>(ml/min/kg<sup>0,75</sup>)</b>	<b>8,0±0,4</b>	<b>7,62±0,4</b>	<b>10±0,5*#</b>
<b>VCO<sub>2</sub>(ml/min/kg<sup>0,75</sup>)</b>	<b>7,76±0,3</b>	<b>6,76±0,2*</b>	<b>8,5±0,2*#</b>
<b>RQ</b>	<b>0,97±0,02</b>	<b>0,89±0,01*</b>	<b>0,85±0,02*</b>
<b>EE(kcal/day/kg<sup>0,75</sup>)</b>	<b>59,9±3,0</b>	<b>55±2,3</b>	<b>72±3,6*#</b>

VO<sub>2</sub>= consumo di ossigeno

VCO<sub>2</sub>= produzione di anidride carbonica

RQ= quoziente respiratorio

EE= spesa energetica

**I valori sono le medie ± ES di 5 differenti esperimenti**

**\* P < 0,05 rispetto a N, # P < 0,05 rispetto a D**

#### TABELLA 4

**Livelli serici di colesterolo, trigliceridi, ALT e TSH  
nei ratti N, D e DT.**

	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>DT</b>
<b>Colesterolo, mg/dl</b>	<b>40±0,5</b>	<b>68±0,5*</b>	<b>55±0,5*#</b>
<b>Trigliceridi, mg/dl</b>	<b>98±8</b>	<b>230±20*</b>	<b>120±18#</b>
<b>ALT, U/l</b>	<b>20±1</b>	<b>29±2*</b>	<b>18±1,1#</b>
<b>TSH, ng/ml</b>	<b>0,60±0,12</b>	<b>0,59±0,07</b>	<b>0,63±0,05</b>

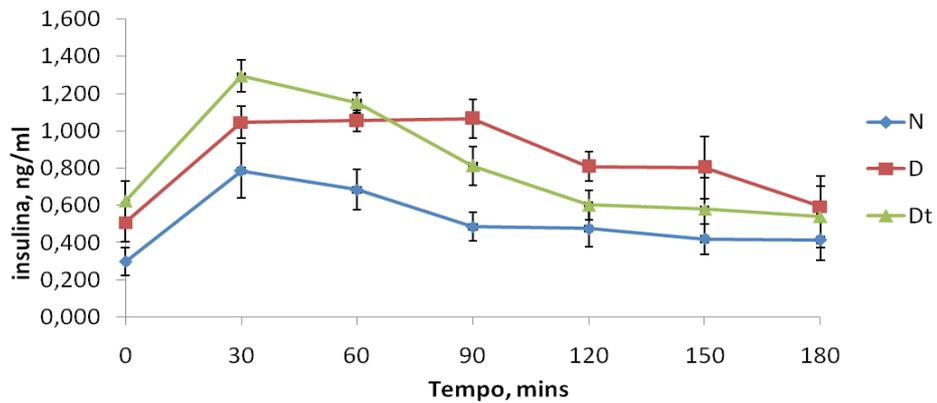
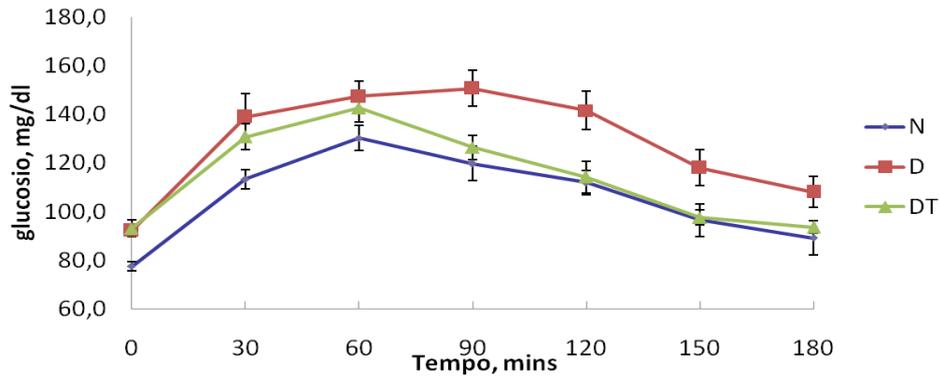
ALT= alanine ammino transferasi  
TSH= ormone stimolante la tiroide

**I valori sono le medie ± ES di 5 differenti esperimenti**

**\* P < 0,05 rispetto a N, # P < 0,05 rispetto a D**

**FIGURA 1**

**Risposta del glucosio e dell'insulina ad un test da carico orale di glucosio (OGTT) nei ratti N, D e DT.**



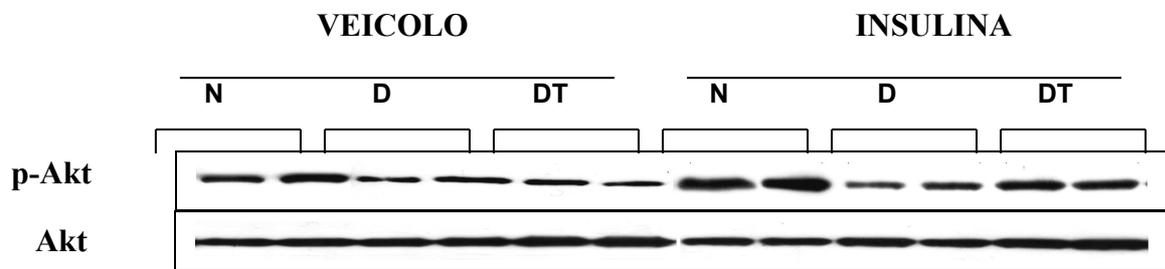
	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>DT</b>
AUC glucosio	19653 ± 704	23899 ± 995*	20107 ± 1212 <sup>#</sup>
AUC insulina	96 ± 13	160 ± 10*	151 ± 16*

AUC = area sottesa alla curva  
I valori sono le medie ± ES di 6 differenti esperimenti.

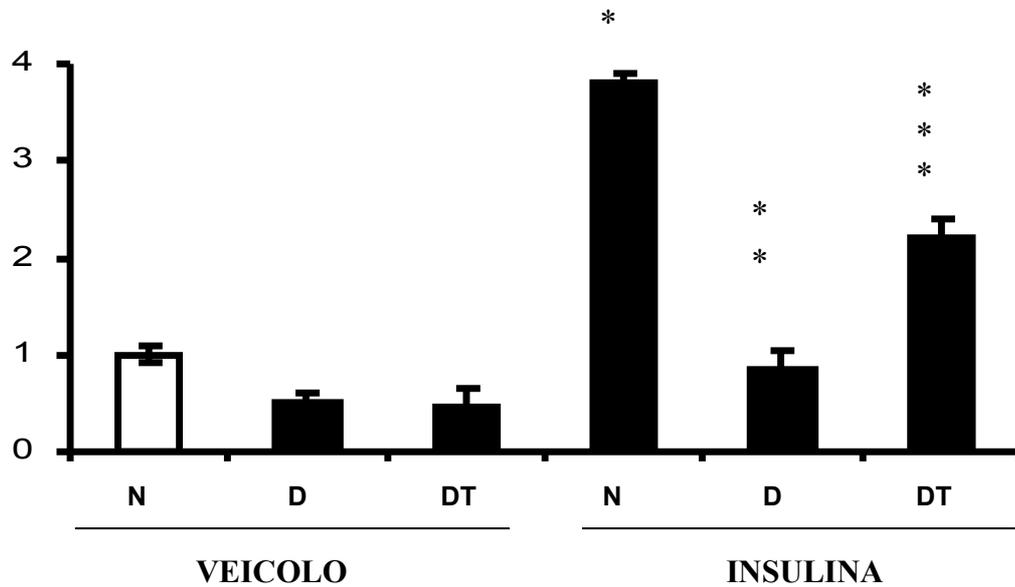
\* P < 0,05 rispetto a N, <sup>#</sup> P < 0,05 rispetto a D

**FIGURA 2**

**Fosforilazione dell'Akt indotta dall'insulina a livello muscolare  
nei ratti N, D e DT.**



**LIVELLI RELATIVI DI P-AKT**

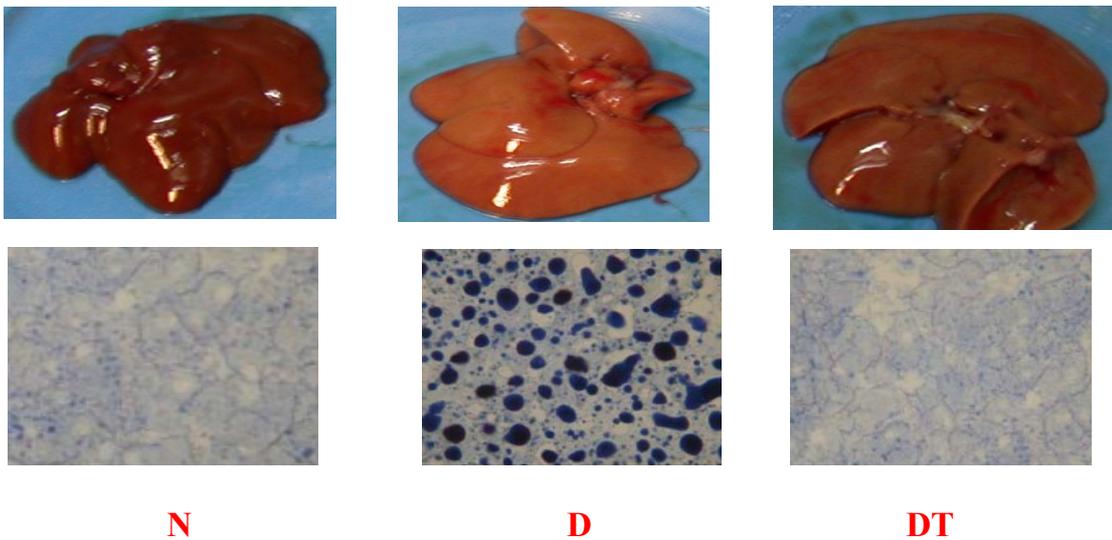


I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti.

\* P < 0,05 rispetto a N, \*\* P < 0,05 rispetto a D ed Ni, \*\*\* P < 0,05 rispetto a DT, Ni e Di

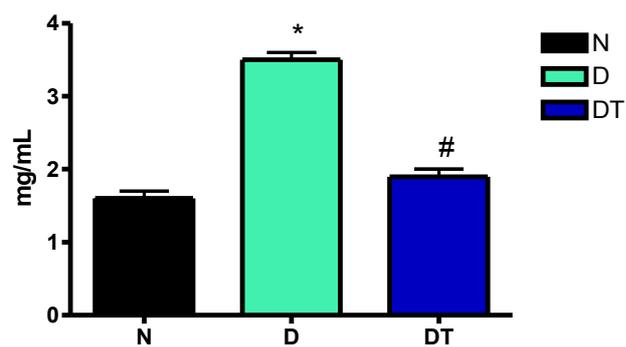
**FIGURA 3a**

**Effetto della T2 sull'accumulo di grasso in sezioni epatiche  
Dei ratti N, D e DT**



**FIGURA 3b**

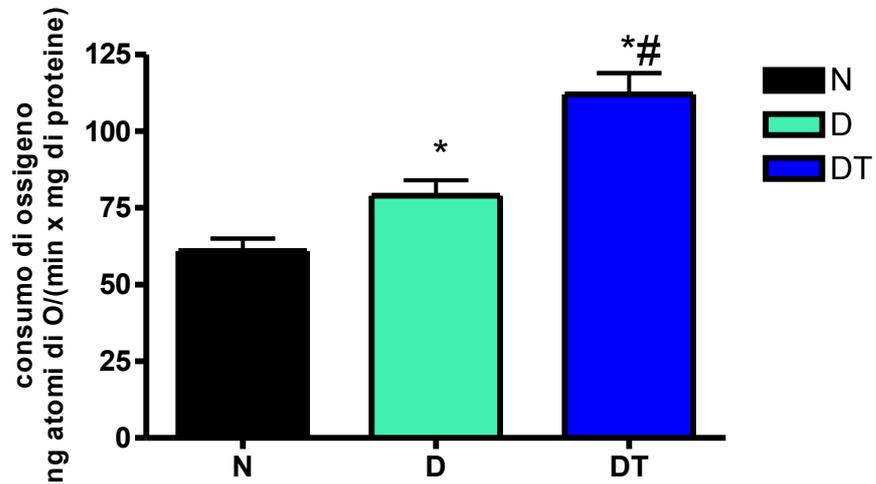
**Livelli dei trigliceridi epatici dei ratti N, D, DT**



**I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti  
\*  $P < 0,05$  rispetto a N, #  $P < 0,05$  rispetto a D**

**FIGURA 4a**

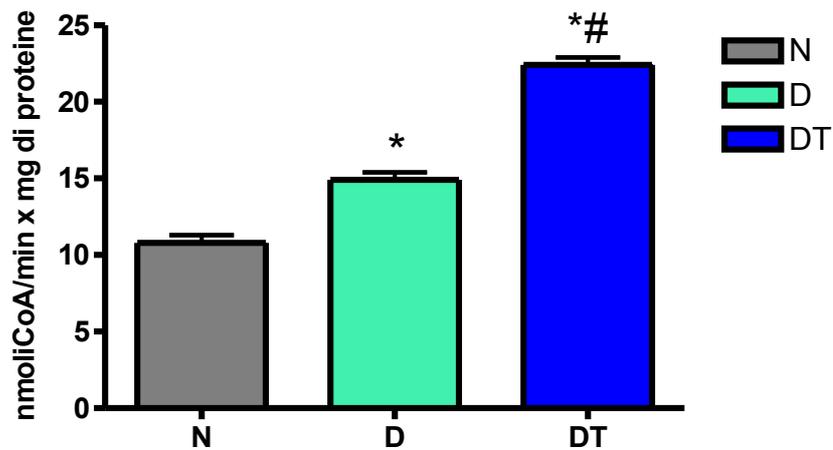
**Ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri epatici  
dei ratti N, D, DT**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti  
\* P < 0,05 rispetto a N, #P < 0,05 rispetto a D

**FIGURA 4b**

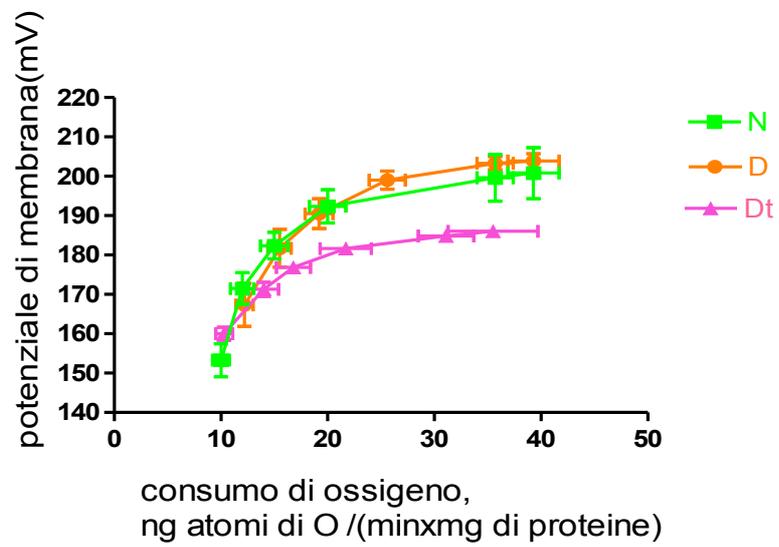
**Attività della CPT nei mitocondri isolati di fegato  
nei ratti N, D e DT**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti  
\* P < 0,05 rispetto a N, #P < 0,05 rispetto a D

**FIGURA 5**

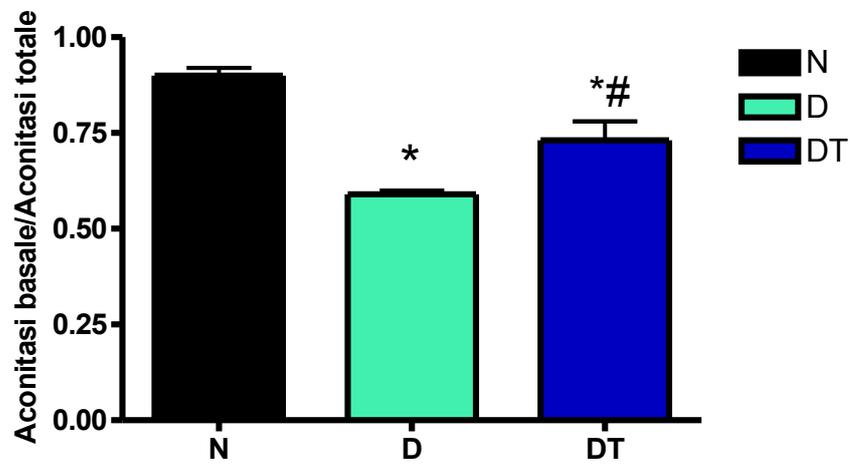
**Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri isolati dal fegato  
dei ratti N, D, DT**



**I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti**

## FIGURA 6

Misura dell'attività dell'aconitasi nei mitocondri isolati dal fegato dei ratti N, D, DT.



I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti  
\* P < 0,05 rispetto a N, # P < 0,05 rispetto a D

## DISEGNO SPERIMENTALE 2

### ANALISI A LIVELLO CORPOREO TOTALE

Per quanto riguarda il secondo disegno sperimentale dopo le prime sei settimane di trattamento, i ratti alimentati con dieta iperlipidica (D) mostrano un aumento del guadagno di peso, dell'energia introdotta e dell'efficienza energetica, rispettivamente del 60%, del 20% e del 35%, se confrontati ai ratti N (dati non riportati).

Inoltre, come si osserva dalla tabella 5, nei ratti alimentati con dieta iperlipidica nelle successive quattro settimane, il guadagno di peso è significativamente maggiore rispetto ai ratti N del 27%, mentre nei DT (cioè nei ratti trattati nelle successive quattro settimane sia con dieta iperlipidica che con somministrazione di T2) il guadagno di peso corporeo è del 37% minore rispetto a quello dei D. Non ci sono differenze nell'energia totale introdotta nei tre gruppi di ratti in queste successive 4 settimane di trattamento. Per quanto riguarda l'efficienza energetica, calcolata come percentuale del rapporto tra guadagno di peso ed energia introdotta, questa aumenta in maniera significativa nei ratti D rispetto ai ratti N del 44%, mentre nei DT non è significativamente diversa rispetto ai ratti N. Quindi i risultati sul calcolo dell'efficienza energetica anche in questo secondo disegno sperimentale, mettono in evidenza che i ratti D hanno una maggiore tendenza ad accumulare energia, rispetto ai ratti trattati con T2 nei quali la maggior parte dell'energia viene invece probabilmente spesa.

In tabella 6 sono riportati i valori dei livelli serici di colesterolo trigliceridi, ALT e TSH. I risultati mettono in evidenza un aumento dei primi tre parametri nei ratti D rispetto agli N ed una diminuzione nei ratti DT se confrontati ai ratti D. In particolare i livelli serici di colesterolo sono più alti nei D rispetto agli N del 73%, ma ridotti significativamente del 20% nei DT, se confrontati ai D. I livelli serici di trigliceridi nei ratti D sono il 139% più alti rispetto a quelli degli

N, la somministrazione di T2 riduce significativamente i trigliceridi ad un valore simile a quello degli N. I valori serici di ALT sono significativamente più alti del 52% nei ratti D, se confrontati agli N, indice dunque di un danno epatico in tali ratti; mentre la somministrazione di T2 riduce il valore di tale parametro ad un valore non significativamente differente da quello degli N. Invece, i livelli serici del TSH non sono significativamente differenti nei tre gruppi di ratti.

#### ANALISI A LIVELLO EPATICO: ACCUMULO LIPIDICO E FUNZIONALITA' MITOCONDRIALE

In figura 7a sono riportate le foto dei fegati prelevati dai ratti al momento del sacrificio con le rispettive immagini delle analisi istologiche delle sezioni di fegato. Dalle foto dei fegati si osserva che i ratti alimentati con dieta iperlipidica (D), rispetto agli altri due gruppi di ratti hanno un maggior accumulo di grasso, in quanto il loro fegato appare più chiaro. Contrariamente i ratti ai quali è stata somministrata T2 presentano un minor accumulo di lipidi epatici, in quanto il fegato risulta essere più scuro di quello dei ratti D, e molto più simile a quello degli N, ciò indica che la somministrazione di T2 è anche in grado di far regredire l'accumulo di lipidi nel fegato. Dato confermato dall'analisi istologica delle sezioni di fegato e dalla misura dei livelli epatici di trigliceridi. Le sezioni di fegato colorate con il Sudan black per l'analisi istologica indicano, infatti la presenza di un maggior numero di goccioline lipidiche nei ratti D rispetto agli N, mentre le sezioni di fegato dei ratti DT mostrano un numero di goccioline lipidiche ridotto rispetto ai ratti D.

In figura 7b sono riportati i livelli epatici di trigliceridi. I dati mettono in evidenza che nei ratti D si ha un significativo aumento di tale valore rispetto agli N del 104%; mentre nei ratti DT si osserva invece una significativa riduzione dei trigliceridi epatici se confrontati ai ratti D del 43%. Questi dati confermano che la somministrazione di T2 è in grado di ridurre tale accumulo di lipidi in ratti resi precedentemente steatotici con un trattamento prolungato con dieta iperlipidica.

In figura 8a è riportata la velocità di *ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri epatici*. I risultati mettono in evidenza che la velocità di ossidazione degli acidi grassi è il 79 % più alta nei ratti D rispetto agli N, ed è ulteriormente aumentata nei ratti DT più del 120% rispetto ai ratti N.

In figura 8b sono riportati i valori relativi all'attività del sistema enzimatico della palmitoil carnitina transferasi (CPT). Tale valore è aumentato significativamente nei ratti D rispetto agli N ed è ulteriormente aumentato nei ratti DT. In particolare nei ratti D e DT l'attività di questo enzima rispetto agli N è aumentata progressivamente del 31% e del 64%. Questi dati mettono in evidenza che la somministrazione di T2 incrementa non solo l'ossidazione ma anche il trasporto degli acidi grassi nei mitocondri epatici.

Ho valutato anche l'efficienza energetica mitocondriale misurando sia la conduttanza protonica basale che indotta.

In figura 9a sono riportati i risultati della conduttanza protonica basale, come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni del consumo di ossigeno nei mitocondri dei ratti N, D e DT. I dati mostrano che nei ratti DT la conduttanza protonica basale è maggiore rispetto ai ratti D ed N. Nessuna variazione si osserva tra i ratti N e D.

In figura 9b sono riportati i risultati della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi espressi sempre come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni del consumo di ossigeno, nei mitocondri dei ratti N, D e DT. I ratti D presentano una minore conduttanza protonica indotta rispetto agli N, infatti per un dato valore di consumo di ossigeno hanno un potenziale di membrana maggiore, nei ratti DT si osserva una conduttanza protonica indotta maggiore rispetto ai D e agli N. Questo significa che per mantenere un certo potenziale di membrana, i mitocondri dei ratti DT consumano più ossigeno, rispetto ai ratti N e D. Dunque la somministrazione di T2 determina un aumento della conduttanza protonica sia basale che indotta da acidi grassi, e quindi una maggiore dissipazione di energia sottoforma di calore.

In figura 10a sono riportati i risultati della misura dell'attività dell'aconitasi, indice di danno ossidativo mitocondriale. I dati mostrano che i ratti D hanno una

diminuzione del rapporto aconitasi basale/aconitasi totale rispetto ai ratti N del 19%; mentre i ratti DT se paragonati ai D, mostrano un rapporto più elevato del 18%. Tali risultati indicano che la dieta ad alto contenuto di grasso induce stress ossidativo a livello mitocondriale, comportando una maggiore produzione di ROS. Infatti, quando paragonati ai ratti N, i ratti D mostrano una maggiore inibizione dell'attività dell'enzima aconitasi, come indicato dal diminuito rapporto aconitasi basale/aconitasi totale, il quale nei ratti DT è, comunque, diminuito rispetto ai ratti N, ma è aumentato rispetto ai ratti D.

Questi dati indicano che la somministrazione di T2 a ratti alimentati con una dieta iperlipidica riduce lo stress ossidativo epatico mitocondriale indotto dalla dieta iperlipidica.

Nella figura 10b è riportata la misura dell'attività specifica dell'enzima superossido dismutasi (SOD), enzima che catalizza la dismutazione dello ione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ) ad  $H_2O_2$  e  $O_2$  che viene ulteriormente convertito a  $H_2O$  per azione della catalasi e della glutazione perossidasi, i risultati mettono in evidenza che l'attività di tale enzima nei ratti D è notevolmente diminuita rispetto agli N del 31%, mentre nei DT è aumentata rispetto ai D del 25%.

Nella figura 10c sono riportati i risultati del rilascio mitocondriale di perossido di idrogeno, nei ratti N, D e DT. La misura del perossido di idrogeno ci permette di valutare indirettamente la produzione di superossido a livello mitocondriale a causa dello stress ossidativo. I dati mostrano che nei ratti D si verifica un aumento del rilascio mitocondriale di  $H_2O_2$  rispetto agli N del 18%, mentre nei DT il rilascio mitocondriale di  $H_2O_2$  è minore rispetto ai D del 24%.

## DATI RELATIVI AL SECONDO DISEGNO SPERIMENTALE

### TABELLA 5

**Guadagno corporeo, energia introdotta ed efficienza energetica  
nei ratti N, D e DT**

	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>DT</b>
<b>Guadagno di peso corporeo, g</b>	15± 1	19± 1*	12 ± 1 <sup>#</sup>
<b>Energia totale introdotta, kJ</b>	9348±455	8178±386	9614±402
<b>Efficienza energetica, %</b>	0.16±0.01	0.23±0.02*	0.12±0.01 <sup>#</sup>

**I valori sono le medie ± ES di 5 differenti esperimenti**

**\* P < 0,05 rispetto a N, <sup>#</sup> P < 0,05 rispetto a D**

## TABELLA 6

**Livelli serici di colesterolo, trigliceridi, ALT e TSH  
nei ratti N, D e DT**

	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>DT</b>
<b>Colesterolo, mg/dl</b>	45,5±0,6	78,5±0,6*	62,5±0,5*#
<b>Trigliceridi, mg/dl</b>	105±8,0	250,0±22,5*	140,0±18,0#
<b>ALT, U/l</b>	23±1,0	35,0±2,0*	20,0±2,0#
<b>TSH, ng/ml</b>	0,64±0,07	0,73±0,05	0,76±0,06

ALT= alanino amminotransferasi

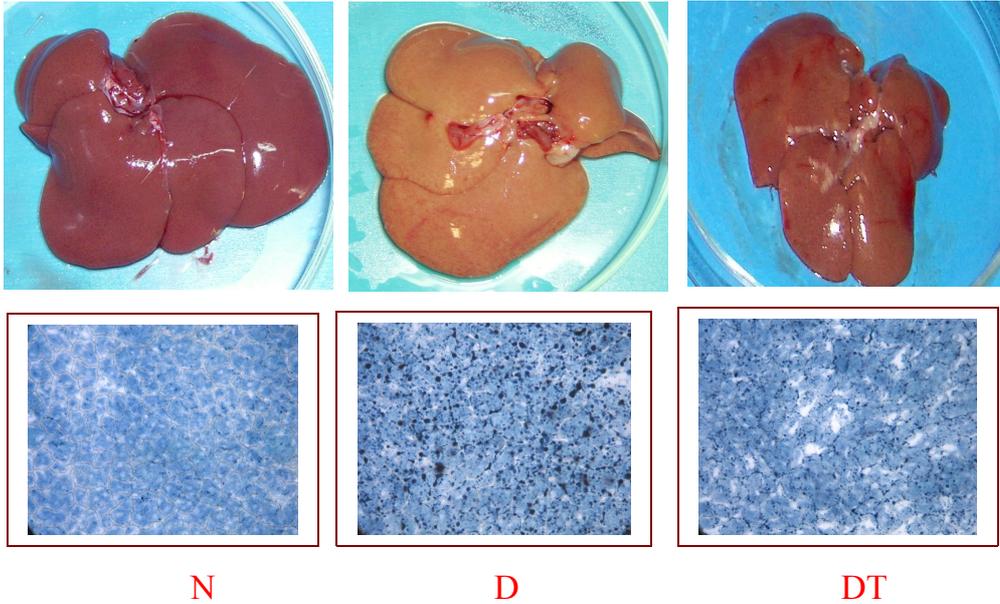
TSH= ormone stimolante la tiroide

**I valori sono le medie ± ES di 5 differenti esperimenti**

**\* P < 0,05 rispetto a N, # P < 0,05 rispetto a D**

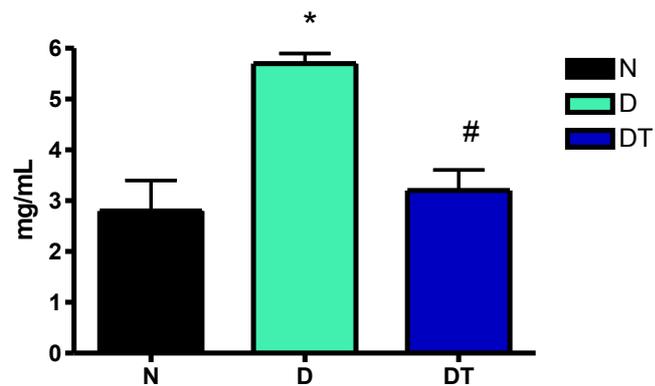
**FIGURA 7a.**

**Effetto della T2 sull'accumulo di grasso in sezioni epatiche  
Dei ratti N, D e DT**



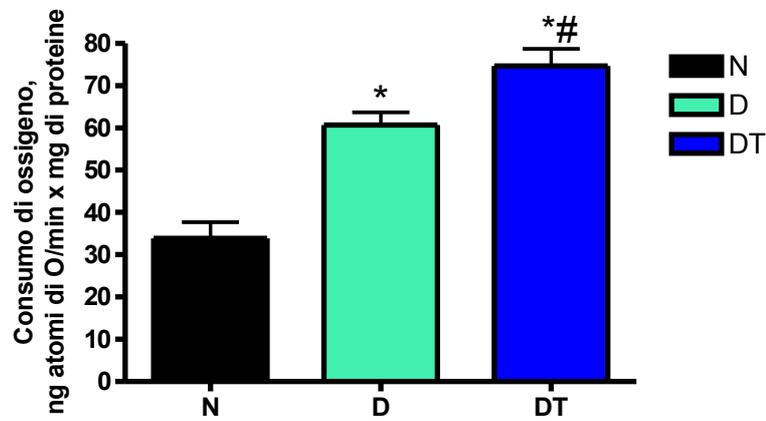
**FIGURA 7b**

**Livelli dei trigliceridi epatici dei ratti N, D, DT**



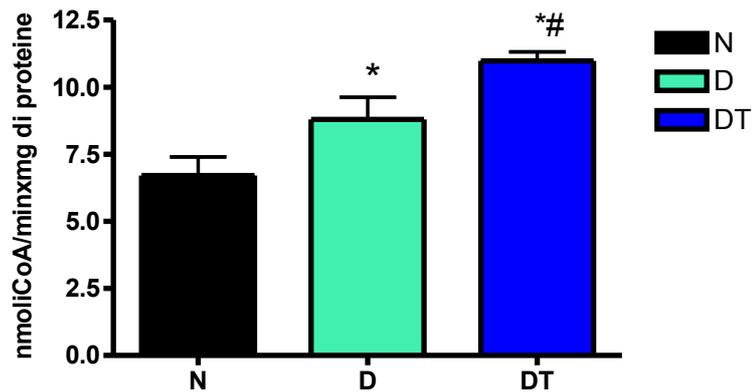
**I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti  
\* P < 0,05 rispetto a N, # P < 0,05 rispetto a D**

**FIGURA 8a**  
**Ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri epatici**  
**dei ratti N, D, DT**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti  
\* P < 0,05 rispetto a N, # P < 0,05 rispetto a D

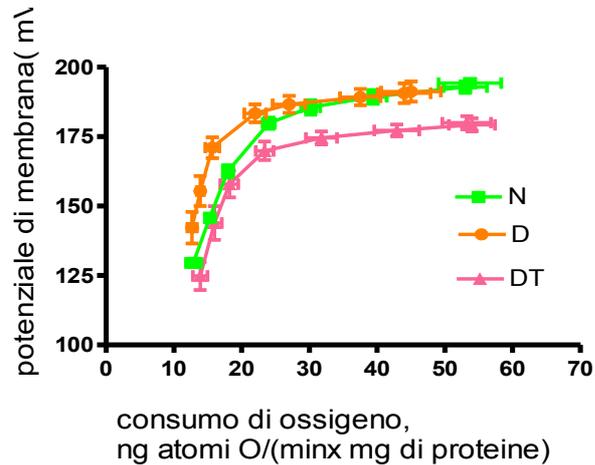
**FIGURA 8b**  
**Misura dell'attività della CPT in mitocondri isolati di fegato**  
**dei ratti N, D e DT**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti  
\* P < 0,05 rispetto a N, # P < 0,05 rispetto a D

**FIGURA 9a**

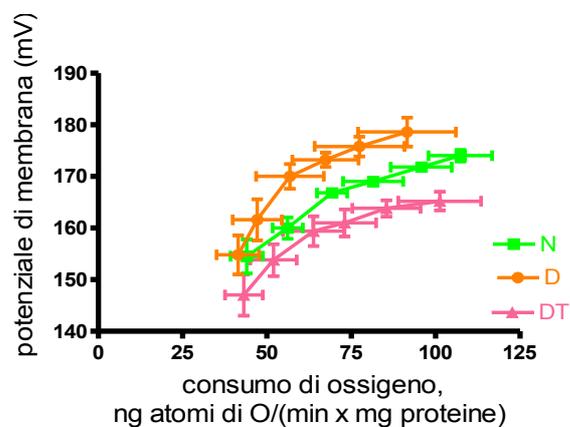
**Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri isolati dal fegato dei ratti N, D e DT**



**I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti**

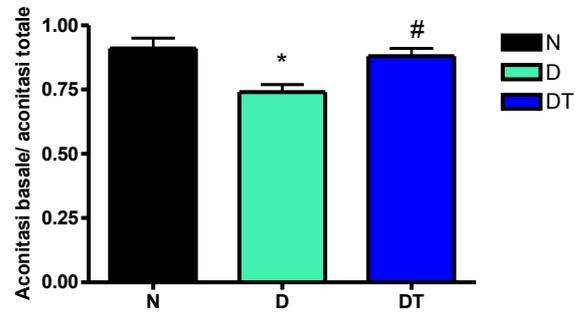
**FIGURA 9b.**

**Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri isolati dal fegato dei ratti N, D e DT**

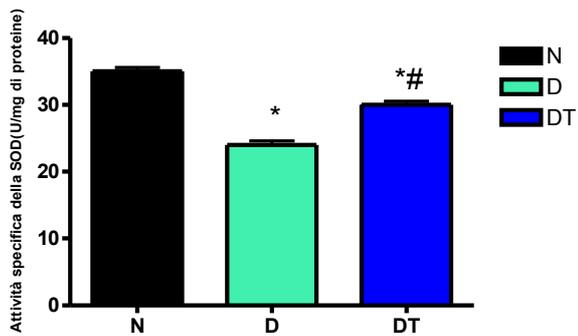


**I valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti.**

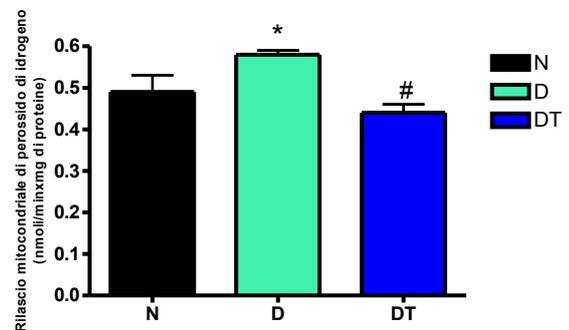
**FIGURA 10a**  
**Misura dell'attività dell'aconitasi nei mitocondri isolati dal fegato dei ratti N, D, DT**



**FIGURA 10b**  
**Misura dell'attività della SOD nei mitocondri isolati dal fegato dei ratti N, D, DT**



**FIGURA 10c**  
**Misura del rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei mitocondri isolati dal fegato dei ratti N, D, DT**



valori sono le medie  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti.  
\*P < 0.05 comparato agli N, #P < 0.05 comparato ai D

## **CAPITOLO 9.**

### **DISCUSSIONE.**

L'obesità è una condizione determinata da un costante bilancio energetico positivo che porta ad un aumento della massa del tessuto adiposo dell'organismo e ad un maggiore rischio di incorrere in malattie associate ad essa, come: diabete, steatosi epatica, dislipidemia e malattie cardiovascolari. In passato erano poche le cure contro l'obesità, oggi, invece, sono stati scoperti dei potenziali farmaci in grado di ridurre i danni apportati da questa patologia.

In particolare sono stati effettuati studi sugli ormoni tiroidei, soprattutto sulla T3, evidenziandone un ruolo importante sulla riduzione di peso, dovuta soprattutto ad un aumento della velocità metabolica. Nonostante ciò, è stato limitato l'utilizzo della T3 come agente con attività anti-obesità, in quanto è stato riscontrato uno stato tireotossico associato ai suoi effetti benefici.

Per tale motivo è stata posta l'attenzione sul ruolo della T2 nella cura dell'obesità, in quanto il suo utilizzo non induce effetti tireotossici. Fino a qualche anno fa la T2 era considerata un metabolita inattivo della T3 e T4, ma un numero crescente di prove sperimentali ha dimostrato che questo ormone possiede attività biologica, è stato dimostrato infatti, in studi condotti nel 1997<sup>71</sup>, che tale ormone ha un effetto sul metabolismo energetico di modelli animali, in quanto aumenta la velocità del metabolismo a riposo (RMR) nei ratti trattati con tale ormone. Tale ormone è in grado quindi di stimolare la velocità metabolica e la respirazione cellulare attraverso meccanismi indipendenti da quelli attuati dalla T3. Partendo dal presupposto che la T2 può aumentare la spesa energetica e tenendo presente che i mitocondri svolgono un ruolo importante nella patogenesi della NASH e che la T2 ha come bersaglio principale i mitocondri, lo scopo della presente tesi è quello di valutare l'effetto dell'ormone tiroideo T2 in ratti alimentati contemporaneamente con dieta iperlipidica sullo sviluppo dell'obesità, della steatosi epatica, e in particolare sulla funzionalità mitocondriale epatica.

In particolare l'attenzione è stata focalizzata sull'effetto della T2 sull'accumulo lipidico a livello epatico e sulla funzionalità mitocondriale:

- sia quando tale ormone viene somministrato contemporaneamente ad una dieta iperlipidica per testarne l'effetto di prevenzione sullo sviluppo di obesità e steatosi rispetto a ratti trattati solo con dieta iperlipidica,

-sia quando tale ormone viene somministrato a ratti in cui la steatosi è già stata indotta precedentemente con un trattamento prolungato con dieta iperlipidica per testarne l'eventuale effetto terapeutico.

A tale scopo ho utilizzato due disegni sperimentali:

I. il primo prevedeva un trattamento di quattro settimane con dieta iperlipidica e contemporanea somministrazione di T2 in ratti giovani (60 giorni di età). In tale disegno sperimentale ho focalizzato la mia attenzione sull'effetto della T2 sul bilancio energetico corporeo, sulla resistenza all'insulina e sullo sviluppo della steatosi epatica analizzando le alterazioni nella funzionalità mitocondriale.

II. il secondo prevedeva un primo trattamento di sei settimane con dieta iperlipidica in ratti di 180 giorni di età e un secondo periodo in cui veniva somministrata T2 insieme alla dieta iperlipidica per quattro settimane successive. In questo secondo disegno sperimentale si è scelto di partire da ratti di età maggiore e prolungare il periodo di trattamento con dieta iperlipidica allo scopo di indurre severi danni a livello epatico prima di iniziare il trattamento con T2. Infatti, è noto che sia l'avanzare dell'età sia diete iperlipidiche prolungate inducono danni a livello epatico. Infatti, in tale disegno sperimentale ho voluto soprattutto valutare la capacità della T2 nel ridurre la steatosi epatica, precedentemente indotta da un trattamento prolungato con dieta iperlipidica.

I risultati riguardanti il primo disegno sperimentale sull'analisi della composizione corporea e del bilancio energetico mettono in evidenza che a parità di energia introdotta, i ratti DT rispetto ai D presentano un minore guadagno di peso corporeo. Valutando l'effetto della T2 sul metabolismo basale, ho riscontrato un aumento di questa componente della spesa energetica nei ratti DT, sia in relazione ai ratti D che ai ratti N.

Quindi, mentre nei ratti D una maggiore quantità di energia introdotta viene depositata nell'organismo portando ad un aumento di peso corporeo, nei ratti DT la maggior parte dell'energia introdotta viene spesa anziché depositata, al contrario di quanto accade nei ratti D.

Per quanto riguarda la composizione corporea alla fine del trattamento, non ho riscontrato variazioni significative tra i tre gruppi di ratti in termini di percentuale di proteine e acqua; mentre i ratti D e DT presentano, rispetto agli N, un aumento significativo della percentuale lipidica. La composizione corporea per cento grammi di carcassa pertanto è la stessa nei D e nei DT, tuttavia i DT hanno un minore guadagno di peso corporeo che corrisponde ad un minore guadagno lipidico corporeo. Questo perché il trattamento con T2 aumenta il metabolismo basale e quindi la spesa energetica.

I ratti D hanno una maggiore efficienza energetica (espressa come rapporto tra guadagno di peso corporeo ed energia introdotta) rispetto ai ratti N, indicando che in tali ratti una maggiore quantità di energia introdotta viene depositata. Nei ratti DT, invece, l'efficienza energetica è simile a quella dei ratti N, indicando che rispetto a ratti D una maggiore quantità di energia introdotta viene spesa dall'organismo, come confermato dall'aumento del metabolismo basale.

Il trattamento con T2, quindi, fa variare l'efficienza energetica corporea, intendendo per essa la capacità di trasformare l'energia introdotta dall'organismo in energia depositata, utilizzabile dall'organismo stesso, senza disperderla all'esterno.

Ovviamente, una diminuzione dell'efficienza energetica corporea è utile in caso di ipernutrizione corporea per prevenire l'obesità.

Nei ratti DT ad una minore efficienza energetica si associa una minore efficienza di deposito dei lipidi (espressa come rapporto tra guadagno lipidico ed energia introdotta) rispetto ai ratti D. In questi ultimi si osserva un aumento di tale efficienza rispetto ai ratti N, quindi i ratti D depositano più lipidi.

Dal momento che l'obesità aumenta considerevolmente non solo la probabilità di insorgenza della steatosi epatica, ma anche dell'insulino-resistenza, In questo disegno sperimentale ho, quindi, ritenuto interessante valutare la capacità della

T2 di migliorare lo stato di resistenza all'insulina e, quindi, la tolleranza al glucosio.

I risultati ottenuti indicano che, in seguito ad un carico orale di glucosio, i valori di glicemia riferiti ai ratti D nell'arco dei successivi 180 minuti restano elevati così come i livelli di insulina. Ciò dimostra che i ratti alimentati con dieta iperlipidica hanno una maggiore secrezione di insulina, ma tale secrezione non riesce a riportare i livelli di glucosio alla normalità nell'arco dei 180 minuti. L'insulina non riesce ad agire e a favorire l'ingresso di glucosio nelle cellule, pertanto i suoi livelli nel sangue si mantengono elevati. Da ciò si deduce che la tolleranza al glucosio è diminuita nei ratti D, ossia è aumentata l'insulino resistenza. Al contrario, le concentrazioni di insulina nel sangue dei ratti DT sono in grado di riportare le concentrazioni di glucosio alla normalità nell'arco dei 180 minuti. L'ipotesi, quindi, di un eventuale ruolo della T2 nel migliorare la risposta ad un carico orale di glucosio, sembrerebbe essere confermata da questi risultati, infatti vi è quindi un aumento della capacità di captare il glucosio in circolo da parte delle cellule bersaglio con una conseguente riduzione della glicemia.

Dal momento che lo stato di insulino-resistenza è associato con una diminuita attivazione del PI3K e del suo substrato a valle, la PKB/Akt, ho determinato lo stato di fosforilazione di quest'ultima proteina nel muscolo scheletrico che è il tessuto maggiormente coinvolto nell'insulino-resistenza. Questa proteina chinasi serina/treonina è un mediatore cruciale dell'azione dell'insulina. La sua attivazione contribuisce a regolare l'uptake di glucosio, il metabolismo del glicogeno, l'espressione genica, la sopravvivenza delle cellule e, quindi, la loro proliferazione e protezione dall'apoptosi<sup>3</sup>.

La diminuita tolleranza al glucosio che caratterizza i ratti D è evidenziata anche da una ridotta fosforilazione dell'Akt. L'insulina non riesce ad agire a livello muscolare e conseguentemente ad avviare la via di trasduzione del segnale.

Nei ratti DT, invece, la maggiore fosforilazione dell'Akt, favorita dal trattamento con T2, evidenzia un'aumentata sensibilità all'insulina e, quindi, un'aumentata tolleranza al glucosio.

Ho inoltre valutato i parametri ematici collegati al metabolismo lipidico e ho riscontrato che i valori dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi e ALT misurati, mettono in evidenza che nei ratti D i livelli di questi parametri sono aumentati significativamente rispetto agli N, mentre nei DT sono ridotti rispetto ai ratti D. Pertanto i ratti ai quali è stata somministrata la T2 mostrano un miglioramento di parametri ematici correlati all'iperlipidemia. Invece non si osservano differenze significative circa i livelli serici di TSH nei tre gruppi di ratti, indicando che i trattamenti utilizzati non influenzano l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide. A questo punto ho ritenuto interessante analizzare se ad un migliore quadro lipidemico corrispondesse un minore accumulo di lipidi a livello epatico nei ratti DT rispetto ai ratti D.

I risultati dimostrano che la somministrazione di T2 nell'arco delle 4 settimane di trattamento ha un importante effetto nel prevenire lo sviluppo della steatosi epatica. Il colore dei fegati prelevati al momento del sacrificio appare, infatti, più scuro nei ratti DT rispetto ai ratti D. Il dato è confermato anche dall'analisi istologica di sezioni di fegato, che mette in evidenza nei ratti DT una minore quantità di goccioline lipidiche, rispetto ai ratti trattati con sola dieta iperlipidica, e dalla misura dei livelli di trigliceridi epatici, che mettono in evidenza un aumento di tali livelli nei ratti D, rispetto agli N ed una riduzione nei ratti trattati con T2, rispetto ai ratti D. La spiegazione convenzionale sull'accumulo di trigliceridi negli epatociti è che l'aumento della massa degli adipociti e l'aumento dell'idrolisi dei trigliceridi contribuisce all'aumento dei livelli plasmatici di acidi grassi liberi (FFA). La velocità di uptake degli FFA negli epatociti non è regolata ed è, perciò, direttamente proporzionale alla concentrazione di FFA nel plasma.

Gli FFA entrati nel fegato sono metabolizzati generalmente mediante due vie metaboliche: la  $\beta$ -ossidazione per generare ATP, o l'esterificazione per produrre trigliceridi. Questi ultimi sono incorporati nelle particelle di VLDL per fuoriuscire dall'epatocita, o in alternativa sono depositati all'interno dell'epatocita. Difetti in uno di queste due vie metaboliche possono portare alla steatosi.

L'aumento sia di arrivo di FFA al fegato che della sintesi epatica di trigliceridi, molto probabilmente gioca un ruolo importante nello sviluppo della steatosi. I risultati della tesi dimostrano che, nei mitocondri epatici dei ratti D la  $\beta$ -ossidazione e l'attività della CPT sono aumentate rispetto ai ratti N.

Questi risultati sono in accordo con quelli di altri lavori, in cui un aumento del carico di FFA a livello epatico causa un aumento della  $\beta$ -ossidazione mitocondriale. Un aumento della beta ossidazione si riscontra in topi ob/ob che presentano un alto grado di steatosi<sup>154</sup> e in pazienti obesi affetti da NASH.

I meccanismi responsabili dell' aumento della  $\beta$ -ossidazione nei pazienti con NASH sono scarsamente conosciuti, ma sono state avanzate diverse ipotesi. Un meccanismo potrebbe essere l'attivazione del PPAR- $\alpha$  epatico da parte dell'aumentato pool di FFA. Un secondo meccanismo potrebbe, invece, essere l'aumento della stimolazione dell'attività della CPT-1 che promuoverebbe l'ulteriore ingresso di acidi grassi a lunga catena nei mitocondri epatici. L'aumentata attività e/o espressione della CPT-1 è stata riscontrata anche in topi con steatosi epatica. Tale incremento sembra essere dovuto all'attivazione del PPAR- $\alpha$ , ma alcuni studi suggeriscono che anche gli acidi grassi a lunga catena sono capaci di incrementare l'espressione di CPT-1 in modo PPAR- $\alpha$  indipendente<sup>155</sup>.

Nonostante l'aumento della  $\beta$ -ossidazione mitocondriale in presenza di steatosi, questa non è comunque in grado di compensare l'aumentato carico di acidi grassi liberi, per cui gli FFA in eccesso vengono convertiti in trigliceridi ed in parte conservati all'interno del citoplasma, causando steatosi e, in parte, secreti nel plasma, determinando ipertrigliceridemia.

Anche i risultati della mia tesi, portano dunque ad ipotizzare che l'aumento della  $\beta$ -ossidazione e della CPT riscontrato nei ratti D non sia in grado di compensare l'aumentato carico di FFA che sopraggiunge al fegato, portando ad un aumentato deposito di trigliceridi, come confermato dal colore del fegato.

Nei ratti DT si osserva un incremento rispetto i D sia della  $\beta$ -ossidazione che dell'attività della CPT, meccanismo che favorisce l'ossidazione lipidica anziché il deposito a livello epatico.

Un altro meccanismo attraverso il quale la T2 può contribuire a prevenire l'accumulo di lipidi a livello epatico può essere rilevato nella diminuzione dell'efficienza dell'accoppiamento mitocondriale tra ossidazione del substrato e produzione di ATP (effetto termogenico).

L'efficienza attraverso la quale l'energia dei substrati viene convertita in ATP, cioè l'accoppiamento tra velocità della catena respiratoria e la fosforilazione ossidativa, dipende dall'entità della conduttanza protonica.

Le misure da me effettuate dimostrano che in questo primo disegno sperimentale il trattamento con T2 porta ad una diminuzione dell'efficienza mitocondriale. Infatti, si osserva un aumento della conduttanza protonica basale nei ratti DT rispetto agli altri due gruppi di ratti. La diminuzione dell'efficienza mitocondriale può essere uno dei meccanismi attraverso il quale la T2 può contribuire alla diminuzione dell'efficienza energetica corporea e l'accumulo lipidico riscontrata nei ratti DT rispetto ai D. La diminuzione dell'efficienza mitocondriale nei ratti DT indica che in tali ratti i mitocondri epatici devono ossidare una maggiore quantità di substrati (tra i quali gli FFA che arrivano in eccesso al fegato) per produrre la stessa quantità di ATP dei D. La maggiore conduttanza protonica è un modo per disperdere il gradiente protonico utile per produrre ATP sottoforma di calore e per bruciare una maggiore quantità di grassi per produrre la stessa quantità di ATP. Conseguentemente, una maggiore quantità di acidi grassi che arrivano al fegato sono diretti verso l'ossidazione anziché verso il deposito.

L'aumento della conduttanza protonica basale nei ratti DT, portando ad una riduzione del potenziale di membrana, può avere una importante implicazione nel prevenire lo sviluppo di steatosi, in quanto il disaccoppiamento può portare ad una riduzione della produzione dei ROS.

Tenendo presente che lo stress ossidativo svolge un importante ruolo nella patogenesi della steatosi, ho ritenuto interessante valutare come indice di stress ossidativo l'attività dell'aconitasi, enzima del ciclo di Krebs che contiene nel suo sito attivo un cluster [4Fe-4S] che ossidato dallo ione superossido, viene inattivato.

I risultati indicano che i ratti D hanno un elevato decremento dell'attività dell'aconitasi (intesa come rapporto aconitasi basale/aconitasi totale), rispetto agli N, mentre i ratti DT presentano un rapporto più alto rispetto ai D. La T2 riesce a prevenire i danni a livello mitocondriale indotti dai ROS contribuendo in tal modo a prevenire i danni da stress ossidativo che possono far progredire il grado di steatosi.

Una volta accertato in questo primo disegno sperimentale questo ruolo preventivo della T2 nell'insorgenza di problematiche associate all'obesità, steatosi epatica e resistenza all'insulina, ho ritenuto interessante valutare in un secondo disegno sperimentale l'effetto della T2 sulla funzionalità mitocondriale epatica in un modello animale in cui già è sviluppata steatosi epatica. In particolare valutare se tale ormone potesse migliorare il grado di steatosi epatica. In questo caso il disegno sperimentale prevedeva, dopo sei settimane di trattamento con dieta iperlipidica, ulteriori quattro settimane in cui il trattamento con dieta iperlipidica era associato con il trattamento con T2.

I risultati di questo secondo disegno sperimentale sul bilancio energetico mettono in evidenza che dopo le prime sei settimane di trattamento, i ratti alimentati con dieta iperlipidica (D) mostrano un aumento del guadagno di peso, dell'energia introdotta e dell'efficienza energetica, rispettivamente del 60%, del 20% e del 35%, se confrontati ai ratti N (dati non riportati).

Dopo le ulteriori 4 settimane di trattamento il guadagno di peso corporeo e l'efficienza energetica sono significativamente aumentati nei ratti D se paragonati agli N, mentre nei DT si osserva una significativa diminuzione del guadagno di peso corporeo del 37% e dell'efficienza energetica del 48%, se confrontati ai ratti D. Questi risultati indicano che i ratti D sono metabolicamente più efficienti degli N e che la somministrazione di T2 induce un decremento dell'efficienza energetica del 48%.

Le misure dei livelli serici di colesterolo, trigliceridi e ALT (indice di danno epatico) mettono in evidenza un aumento di questi parametri nei ratti D rispetto agli N e che la somministrazione di T2 invece determina una diminuzione

significativa di questi tre parametri, se confrontati ai ratti D. Invece, non si osservano significative variazioni dei livelli serici del TSH nei tre gruppi di ratti.

Inoltre, i ratti alimentati con dieta iperlipidica (D) rispetto ai ratti alimentati con la dieta standard di laboratorio (N) presentano steatosi epatica come dimostrato dal colore più chiaro del fegato e dall'analisi istologica, la quale mette in evidenza un elevato accumulo di goccioline lipidiche. Nei ratti DT, invece, la somministrazione di T2 nelle ultime 4 settimane riduce il grado di steatosi: il colore del fegato di questi ratti è meno chiaro rispetto ai D e più simile agli N, indicando che il trattamento con T2 riesce a far regredire l'accumulo di lipidi, indotto precedentemente dalla dieta. Il dato è confermato dall'analisi istologica di sezioni di fegato e anche dalla misura dei livelli di trigliceridi epatici che mettono in evidenza un aumento di tali livelli nei ratti alimentati con sola dieta iperlipidica, rispetto ai controlli, ed una riduzione nei ratti trattati con T2, rispetto ai ratti D.

Inoltre nei ratti D rispetto agli N si osserva un aumento della  $\beta$ -ossidazione e dell'attività della CPT. Tale aumento però non è sufficiente, da solo, a far migliorare la steatosi epatica indotta dal trattamento con dieta iperlipidica. Un ulteriore aumento di questi due parametri mitocondriali si riscontra nei ratti a cui è stata somministrata la T2.

L'altro meccanismo attraverso il quale la somministrazione di T2 può migliorare il grado di steatosi epatica è la diminuzione dell'efficienza mitocondriale. L'efficienza attraverso la quale l'energia dei substrati viene convertita in ATP, (cioè l'accoppiamento tra velocità della catena respiratoria e la fosforilazione ossidativa), dipende dall'entità della conduttanza protonica che può essere distinta in due tipi: conduttanza protonica basale e conduttanza protonica inducibile. La conduttanza protonica basale non è finemente regolata ed è presente in tutti i mitocondri, mentre quella inducibile è catalizzata da proteine ed è indotta dagli acidi grassi.

Le misure da me effettuate dimostrano che, in questo secondo disegno sperimentale, il trattamento con dieta iperlipidica porta ad un aumento dell'efficienza mitocondriale a causa della diminuzione della conduttanza

protonica basale, rispetto ai controlli. Questo aumento dell'efficienza mitocondriale epatica nei ratti D può contribuire all' aumento dell'efficienza energetica totale corporea riscontrata in tali ratti. Nei ratti ai quali è stata somministrata la T2 si osserva, infatti, un aumento sia della conduttanza protonica basale, sia della conduttanza protonica indotta da acidi grassi, rispetto agli altri due gruppi di ratti. L'aumento della conduttanza protonica basale ed indotta nei mitocondri dei ratti DT può avere una ulteriore importante implicazione nel migliorare lo stato di steatosi, e il leggero disaccoppiamento può portare ad una riduzione della produzione dei ROS. E' noto che i mitocondri sono la principale fonte di produzione di ROS che aumenta (anche in situazioni fisiologiche) quando il gradiente protonico ai lati della membrana mitocondriale aumenta, raggiungendo una determinata soglia. La produzione di ROS, quindi, correla con il potenziale di membrana. In sostanza anche piccole variazioni del potenziale possono avere ampi effetti sulle velocità di produzione dei ROS.

L' abbassamento del potenziale di membrana mitocondriale nei ratti DT (e quindi del gradiente protonico ai lati della membrana) non farebbe quindi raggiungere il valore soglia che porta ad una aumentata produzione di ROS. Tale valore viene invece raggiunto nei ratti D dove il potenziale di membrana è elevato. Il lieve disaccoppiamento trovato nei mitocondri dei ratti DT quindi potrebbe contribuire a ridurre la produzione dei ROS, diminuendo il potenziale di membrana. La riduzione della produzione dei ROS insieme ad una più veloce ed inefficiente ossidazione degli acidi grassi può spiegare il miglioramento del grado di steatosi che si osserva dopo il trattamento con T2. Infatti, un meccanismo che contribuisce a far regredire l'accumulo di lipidi è una diminuzione della produzione di radicali liberi nei mitocondri. Nella NASH, l'aumento nei fegati dell'ossidazione lipidica da parte dei mitocondri, porta ad una maggiore produzione di donatori di elettroni (NADH e FADH<sub>2</sub>) alla catena di trasporto di elettroni e di conseguenza il gradiente di voltaggio attraverso la membrana mitocondriale aumenta fino a raggiungere un valore limite. A questo punto, il trasferimento degli elettroni all'interno del complesso III viene bloccato, provocando il ritorno degli elettroni al coenzima Q che cede uno per volta gli

elettroni all'ossigeno molecolare, generando superossido. L'anione superossido tramite l'enzima superossido dismutasi viene trasformato in perossido di idrogeno che in condizioni fisiologiche è convertito in acqua, attraverso la catalasi e la glutadione perossidasi. L'attività di tutti questi sistemi enzimatici risulta però diminuita nella steatosi. I risultati della mia tesi dimostrano un'aumentata concentrazione di  $H_2O_2$  a livello mitocondriale, come indice indiretto della produzione di anione superossido, nei ratti D rispetto agli N, mentre i DT presentano una diminuita concentrazione di  $H_2O_2$  e quindi una diminuzione del livello dei ROS. Questi risultati sono in accordo con i dati relativi all'attività dell'enzima aconitasi, enzima del ciclo di Krebs, che contiene nel suo sito attivo un cluster 4Fe-4S che è ossidato dallo ione superossido, rendendolo inattivo. Infatti, i ratti D hanno mostrato un elevato decremento dell'attività dell'aconitasi (intesa come rapporto aconitasi basale/aconitasi totale), rispetto agli N, mentre i ratti DT presentano un rapporto più alto rispetto ai D, indice di un minor danno ossidativo.

In aggiunta ho anche valutato l'attività dell'enzima superossido dismutasi e quindi la capacità di eliminazione di anione superossido a livello mitocondriale. Anche in questo caso i ratti D, paragonati agli N, presentano una minore attività dell'enzima SOD e quindi una ridotta capacità di eliminare superossido; nei ratti DT ho invece riscontrato un aumento dell'attività enzimatica rispetto ai D con conseguente diminuzione dello stress ossidativo. L'aumento della  $\beta$ -ossidazione, assieme ad una riduzione dell'efficienza mitocondriale e della produzione dei ROS, può spiegare il miglioramento del grado di steatosi che si osserva dopo il trattamento con la T2.

Nel loro complesso, i risultati di questa tesi dimostrano che il trattamento con T2 in ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi influenza il bilancio energetico dell'organismo, agendo in particolare sul guadagno energetico corporeo e su una componente della spesa energetica, come il metabolismo basale. Il trattamento con T2 è anche in grado di prevenire e far regredire i danni indotti dalla dieta iperlipidica a livello epatico agendo sulla funzionalità mitocondriale e sullo stress ossidativo.

Da un punto di vista applicativo, questi risultati aggiungono un ulteriore dato in favore di un possibile utilizzo della T2 non solo nel prevenire lo sviluppo della steatosi epatica come dimostrato nel momento in cui viene somministrata contemporaneamente all'inizio del trattamento con la dieta iperlipidica, ma anche di far regredire questa patologia nel momento in cui è già sviluppata a causa di un precedente trattamento con la dieta iperlipidica.

Questi risultati aprono la strada a futuri studi di approfondimento sui meccanismi coinvolti nell'azione dell'ormone tiroideo (T2) nella patogenesi della steatosi epatica e dell'insulino resistenza, condizioni associate all'obesità e sul conseguente possibile utilizzo sull'uomo, in cui l'uso farmacologico di quest'ormone potrebbe aiutare a contrastare i suddetti problemi senza indurre uno stato tireotossico.

Ovviamente i risultati di questa tesi sono solo preliminari e non escludono che la T2 possa avere effetti deleteri a lungo termine e che la T2 agisca allo stesso modo nell'uomo.

## PROSPETTIVE FUTURE.

Dopo aver focalizzato i miei studi sull'effetto della T2 sullo sviluppo dell'obesità e delle patologie ad essa correlate, analizzando in particolare l'effetto di tale ormone sulla funzionalità e sullo stress ossidativo mitocondriale, ho ritenuto interessante, nell'ultimo periodo del mio dottorato di ricerca focalizzare l'attenzione su un altro organello cellulare che può andare incontro a stress ed il cui stress, se prolungato, può portare a conseguenze deleterie a livello cellulare, tissutale e d'organo: il reticolo endoplasmatico (ER).

Da un lavoro di review, a cui ho contribuito durante il mio dottorato (Nutr. Metab Cardiovasc Dis. 2009 Feb;19(2):146-52. Epub 2009 Jan 25. **From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation.**), si evince che la capacità del tessuto adiposo di immagazzinare grasso ha un ruolo chiave nello sviluppo dell'infiammazione cronica e che lo stress del reticolo endoplasmatico (ER stress) è coinvolto in tale processo. Un'ipernutrizione cronica provoca un aumento dei depositi adiposi, e se, l'espandibilità del tessuto adiposo è bassa, tali depositi sono caratterizzati da un'elevata presenza di adipociti ipertrofici.

Questa ipertrofia degli adipociti è, appunto, una possibile condizione di stress per il reticolo endoplasmatico (ER), che porterebbe a uno stato proinfiammatorio nel tessuto adiposo. In questa condizione, l'ER stress potrebbe attivare pathways metabolici (chiamati JNK-AP-1 e Ikbkb-NF-kB) che scatenano l'insulino-resistenza, il rilascio di proteine chemioattraenti macrofagi, infiammazione, fino alla morte dell'adipocita. I macrofagi infiltrati rilasciano proteine infiammatorie che causano un ulteriore reclutamento di macrofagi al tessuto adiposo e quindi il rilascio di citochine infiammatorie. Successivamente a questi eventi, inizia a svilupparsi uno stato di insulino-resistenza, che si estende a tutto il tessuto adiposo. Gli adipociti insulino-resistenti, caratterizzati da una bassa capacità liposintetica e un'alta capacità lipolitica, causano un aumentato rilascio di acidi grassi liberi (FFA). Gli FFA rilasciati dagli adipociti lipolitici, possono anche attivare i recettori Toll-like 4 e successivamente chemochine e citochine che amplificano lo stato di insulino-resistenza, lipolisi e infiammazione in tutto il

tessuto adiposo. Inoltre, l'aumento in circolo degli FFA, riduce i livelli di adiponectina e induce resistenza alla leptina, e tutto ciò porta ad una riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi nei tessuti periferici, innescando l'accumulo di lipidi in sede ectopica, lipotossicità e insulino-resistenza.

In particolare, il compito principale del reticolo endoplasmatico è quello di sintetizzare circa un terzo delle proteine in una cellula eucariotica ed è soprattutto in grado di fornire un ambiente adatto sia per il folding delle proteine, sia per le modificazioni post-traduzionali. Durante un periodo di ipernutrizione cronica, gli adipociti sono esposti ad una continua invasione di nutrienti sotto forma di acidi grassi, e il RE deve sintetizzare una grande quantità di proteine, e quando il carico è eccessivo, c'è un aumento di proteine malripiegate che si accumulano nel RE. Questa è, appunto, una condizione di stress per il reticolo, e quando tale situazione procede nel tempo, il RE attiva una particolare risposta, chiamata UPR (unfolded protein response).

Tale risposta è mediata da tre proteine: PERK, ATF6 e IRE1alfa. Questi tre sensori sono normalmente mantenuti in uno stato inattivo mediante la proteina chaperone BiP/GRP78. Quando si accumulano le proteine malripiegate, BiP si stacca da questi tre sensori e in questo modo si avvia la risposta UPR.

Negli ultimi mesi del mio dottorato ho svolto la mia attività di ricerca presso il laboratorio della prof.ssa Fernandez Alfonso dell'Universidad Complutense de Madrid (Spagna), ed ho focalizzato la mia attenzione sullo sviluppo dell'ER stress nel tessuto adiposo di ratti alimentati con dieta iperlipidica, e in particolar modo sul tessuto adiposo perivascolare, per poter correlare lo sviluppo dell'ER stress con i danni endoteliali. In letteratura è noto che il tessuto adiposo perivascolare, quel tessuto adiposo situato intorno ai vasi sanguigni, ha un possibile ruolo nel modulare le funzioni vascolari, ma il meccanismo è ancora sconosciuto. Lo scopo di utilizzare il tessuto adiposo perivascolare è quello di individuare se l'ER stress prodotto in tale tessuto, sia in grado di influenzare le funzioni vascolari e se fosse coinvolto nello sviluppo delle alterazioni a livello cardiovascolare.

In questo periodo ho avuto modo di apprendere le tecniche di dissezione del tessuto adiposo perivascolare perivascolare e la microscopia confocale.

Dopo il sacrificio dei ratti, viene prelevato il tessuto adiposo perivascolare mesenterico. Si stacca l'intero intestino dal ratto e si disseziona il tessuto adiposo al microscopio ottico, isolando il tessuto adiposo dall'arteria mesenterica. Immediatamente una parte del tessuto viene congelata in azoto liquido e successivamente in un congelatore a -80 gradi, per poter effettuare i Western Blot. Un'altra parte di tessuto invece viene utilizzata per la microscopia confocale. A tale scopo sezioni di tessuto adiposo perivascolare mesenterico vengono fissati in PFA 4% (paraformaldeide) per 24 h. Dopo un breve lavaggio in PBS 1% o soluzione salina, viene montato un pezzetto di tessuto tra due vetrini. Il tessuto viene visualizzato con un sistema confocale Leica TCS SP2 formato da un laser Argon and Helio-Neon e un microscopio LEICA DMIRE 2, ad una lunghezza d'onda di 488/515 nm, in modo tale da visualizzare gli adipociti fluorescenti. Gli adipociti sono localizzati ed e' possibile valutarne il diametro con un software Metamorph image analysis software.

I risultati ottenuti sono preliminari, e indicano una maggiore espressione di proteine coinvolte nello sviluppo dell'ER Stress, quale, appunto BiP/GRP78, in ratti alimentati con dieta iperlipidica, indice di un maggiore sviluppo di stress in tali ratti. Inoltre l'area degli adipociti del tessuto adiposo mesenterico risulta essere maggiore nei ratti trattati con dieta iperlipidica ( $1560 \pm 630 \mu\text{m}^2$ ) rispetto all'area degli adipociti dei ratti trattati con una dieta standard di laboratorio ( $804 \pm 21 \mu\text{m}^2$ ).

Le tecniche apprese (dissezione del tessuto adiposo perivascolare, western blot e microscopia confocale) potranno essere applicate in futuro per valutare l'insorgenza dell'ER stress in ratti alimentati con dieta iperlipidica e l'eventuale effetto della T2 sull'insorgenza dell'ER stress in maniera preventiva o terapeutica.

## BIBLIOGRAFIA CITATA

(in grassetto la bibliografia consultata)

[http://www.torinomedica.com/link\\_articolo\\_obesita](http://www.torinomedica.com/link_articolo_obesita)'.

<sup>2</sup>Samaras TT, Storms LH, Elrich H, *Longevity, mortality and body weight* in "Ageing. Res. Rev." (2002); 1 (4): pp. 673-691.

<sup>3</sup>Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D, Hemmings BA, *Physiological functions of protein kinase B/Akt* in "Biochem. Soc. Trans " (2004); 32: pp. 350-354.

<sup>4</sup>Pessayre D, Fromenty B, *NASH: a mitochondrial disease* in "Hepatology" (2005); 42: pp. 928-940.

<sup>5</sup>Yang S, et al. *Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress.* (2000); Arch. Biochem. Biophys. 378: pp. 259-268.

<sup>6</sup>Lanni A, Moreno M, Lombardi A and Goglia F, *Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat* in "J. Physiol." (1996); 494: pp. 831-837.

<sup>7</sup>Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH, *Mammalian mitochondrial complex I: Biogenesis, Regulation and Reactive Oxygen Species generation* in "Antioxid Redox Signal."(2009).

<sup>8</sup>Tamitsuka E, Kita K., Esumi H, *Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit* In "Proc jpn Acad ser B Phys Biol.Sci" 2009;85(7):258-65.

<sup>9</sup>Carbajo RJ, Kellas FA, Runswick MJ, Montgomery MG, Walzer JE, Neuhaus D, *Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an alpha-subunit* In "Mol. Biol." (2005); 351: pp. 824-838.

<sup>10</sup>Brand MD, *The proton leak across the mitochondrial inner membrane* In "Biochim. Biophys. Acta." (1990)1018: 128-133.

<sup>11</sup> Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DF, Porter RK, *The causes and functions of mitochondrial proton leak.* In "Biochim. Biophys. Acta." (1994) 1187: 132-139

<sup>12</sup>Rolfe DF, Brand MD, *Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate.* In "Am. J. Physiol."(1996)271: C1380-C1389.

- <sup>13</sup>Soboll S, Grundel S, Schwabe U, Scholtz R, *Influence of fatty acids on energy metabolism. Kinetics of changes in metabolic rates and changes in subcellular adenine nucleotide contents and pH gradients following addition of octanoate and oleate in perfused rat liver.* In "Eur J Biochem." (1984) **141**: 231-236.
- <sup>14</sup>Wojtczak L, *Effect of long-chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport, and energy-coupling processes.* In "J. Bioenerg. Biomembr." (1976) **8**: 293-311.
- <sup>15</sup>Wojtczak L, Schönfeld P, *Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria.* In "Biochim. Biophys. Acta." (1993) **1183**: 41-57.
- <sup>16</sup>Hulsmann WC, Elliot WB, Slater EC, *The nature and mechanism of action of uncoupling agents present in mitochondria preparations.* In "Biochim. Biophys. Acta" (1960) **39**: 267-276
- <sup>17</sup>Zborowski J, Wojtczak L, *Induction of swelling of liver mitochondria by fatty acids of various chain length.* In "Biochim. Biophys. Acta." (1963) **70**: 596-598.
- <sup>18</sup>Wrigglesworth JM, Sharpe MA, Cooper CE, *Regulation of electron flux through cytochrome c oxidase: pH, delta pH and fatty acids.* In "Biochem. Soc. Trans." (1993) **21**: 781-784.
- <sup>19</sup>Dedukhova, VI, Mokhova, EN, Skulachev, VP, Starkov, AA, Arrigoni, Martelli, E, Bobyleva, VA. *Uncoupling effect of fatty acids on heart muscle mitochondria and submitochondrial particles.* In "FEBS Lett." (1991) **295**: 51-54.
- <sup>20</sup>Schönfeld P, *Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria?* In "FEBS Lett." (1990) **264**: 246-248.
- <sup>21</sup>Argilès JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ., *The role of uncoupling proteins in pathophysiological states.* Biochem. Biophys. Res. Commun. (2002) **293**: 1145-1152
- <sup>22</sup>Fleury, C, Nevrora, M, Raimbault, S, Champigny, O, Levi-Meyrueis, C, Boouillaud, F, Seldin, MF, Surwit, RF, Ricquier, D, *Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia.* In "Nat. Genet." (1997) **15**: 269-272.
- <sup>23</sup>Boss, O, Samec, S, Paolini, Giacobino, A, Rossier, C, Dulloo, A, Seydoux, J, Muzzin, P, Giacobino, JP *Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression.* In "FEBS Lett." (1997) **408**: 39-42.
- <sup>24</sup>Mao, W., Yu, XX., Zhong, W., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., Pan, G., *UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells.* In "FEBS Lett." (1999) **443**: 326-330

- <sup>25</sup>Yu,XX.,Mao,W.,ZhongW.,Schow,P.,Brush,J.,Sherwood,SW.,Adams,SH.,Pan  
*Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation.* In "FASEB J." (2000) **14**: 1611-1618.
- <sup>26</sup>Vasquez- Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy MC, *Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation.* In "J Biol Chem." (2000); **275**: pp. 14064-14069.
- <sup>27</sup>Longo VD, Viola KL, Finch CE,. *Reversible inactivation of superoxide-sensitive aconitase in Abeta1-42-treated neuronal cell lines.* In "J Neurochem" (2000); **75**: pp. 1977-1985.
- <sup>28</sup>Wallace DC, *Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases ?* "In Science"(1992); **256**: pp. 628-632.
- <sup>29</sup>Quant PA, Robin D, Robin P, Ferre P, Brand MD, Girard J, *Control of hepatic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase during the foetal/neonatal transition, suckling and weaning in the rat.* In "Eur J Biochem" (1991); **195**: pp. 449-454.
- <sup>30</sup>Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA, *The Structural Biochemistry of the Superoxide Dismutases* .In "Biochim Biophys Acta"(2009).
- <sup>31</sup>Kulinskii VI, Kolesnichenko LS, *Glutathione system. I. Synthesis, transport, glutathione transferases, glutathione peroxidases* In "Biomed Khim" (2009);**55(3):255-77.**
- <sup>32</sup>Battin EE, Brumaghim JL, *Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms.* In "Cell Biochem Biophys"(2009);**55(1):1-23.**
- <sup>33</sup>Pardridge WM, *Plasma protein-mediated transport of steroid and thyroid hormones in* "Am.J.Physiol." (1987); **252**: pp. E157-E163.
- <sup>34</sup>Davis PJ, Spaulding SW, Gregerman RI, *The three thyroxine bynding proteins in rat serum : binding capacities and effects of binding inhibitors* in "Endocrinology" (1970).
- <sup>35</sup>Docter R, Krenning EP, Bernard HF, Hennemann G, *Active transport of iodothyronines into human cultured fibroblasts* in "J. Clin. Endocrinol." (1987); **65**: pp. 624-628.

- <sup>36</sup>Gharbi-Chihi J, Torresani J, *Thyroid hormone binding plasma membrane preparations: studies in different thyroid states and tissues* in "J. Endoc. Invest". (1981); **4**: pp. 177-181.
- <sup>37</sup>Friesema EC, Ganguli S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ, *Identification of monocarboxylate transporter as a specific thyroid hormone transporter* in "J. Biol. Chem."(2003); **278** (41): pp. 40128-40135.
- <sup>38</sup>Kohrle J, Hesch RD, Leonard JL, *Intracellular pathways of iodothyronine metabolism* in "Braverman LE, Utiger RD (eds) The Thyroid, ed. 6. J.B. Lippincott Company, Philadelphia" (1991); pp. 144-150.
- <sup>39</sup>Visser TJ, *The role of the glutathione in the enzymatic deiodination of thyroid hormone* in "Vitta J. (ed) glutathione metabolism and physiological functions" CRC press Boston (1990); pp. 317-320.
- <sup>40</sup>Visser TJ, Leonard JL, Kapan MM, *Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex* in "Proc. Natl. Acad. Sci." USA (1982); **79** (16): pp. 5080-5084.
- <sup>41</sup>Leonard JL, *Identification and structure analysis of iodothyronine deiodinases* in "Greer MA, (ed) The thyroid Gland" Raven Press New York (1990); pp. 285-287.
- <sup>42</sup>St Germain DL, et al. *The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol-disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase* in "Endocrinology" (1988); **122** (5): pp. 1860-1868.
- <sup>43</sup>Kaplan MM, Yaskoskj KA, *Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates* in "J. Clin. Invest." (1980); **66** (3): pp. 551-562.
- <sup>44</sup>Leonard JL, Larsen PR, *Thyroid hormone metabolism in primary cultures of fetal rat brain cells* in "Brain Res" (1985); **327** (1-2): pp. 1-13.
- <sup>45</sup>Tata JR, Ernster L, Lindberg O, *Control of basal metabolic rate by thyroid hormones and cellular function* in "Nature" (1962); **193**: pp. 1060-1062.
- <sup>46</sup>Tata JR, Ernster L, Lindberg O, Arrhenius E, Pedersen S, Hedman R, *The action of thyroid hormone at the cell level* in "Biochem. J." (1963); **86**: pp. 408-428.
- <sup>47</sup>Tata JR, et al., *Inhibition of the biological action of thyroid hormones by actinomycin D and puromycin* in "Nature" (1963); **197**: pp. 1167-1168.
- <sup>48</sup>Oppenheimer JH, Koerner D, Schwaetr HL., Surks MI., *Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney* in "J, CLin, Endocrinol. Metab." (1972); **35**: pp. 330-333.

- <sup>49</sup>Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong NC, Freaque HC, *Advances in our understanding of thyroid hormone action at cellular level* in “Endocrine Rev.” (1987); **8**: pp. 288-308.
- <sup>50</sup>Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM, *The c-erbA gene encodes a thyroid hormone receptor* in “Nature” (1986); **324**: pp. 635-640.
- <sup>51</sup>**Yen PM, *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action* in “Physiol. Rev.” (2001); **81** (3): pp. 1097-1142.**
- <sup>52</sup>O’ Malley B, *The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future* in “Mol Endocrinol.” (1990); **4** (3): pp. 363-369.
- <sup>53</sup>**Goglia F, Moreno M, Lanni A, *Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target* in “FEBS Lett.” (1999); **452**: pp. 115-120.**
- <sup>54</sup>Murray M, Towle H, *Identification of nuclear factors that enhance binding of the thyroid hormone receptor to a thyroid hormone response element.* “Mol. Endocrinol” (1989); **3**(9): pp. 1434-1442.
- <sup>55</sup>Sugawara A, Yen PM, Darling DS, Chin WW, *Characterization and tissue expression of multiple triiodothyronine receptor-auxiliary proteins and their relationship to the retinoid X receptors* in “Endocrinology” (1993); **133**: pp. 965-970.
- <sup>56</sup>Virbasius JC, Virbasius CA, Scarpulla RC, *Identity of GABP with NRF-2 a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters* in “Genes Dev.” (1993); **7**(3): pp. 380-392.
- <sup>57</sup>**Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G, *Thyroid hormone action in mitochondria.* “J. Mol. Endocrinol.” (2001); **26**: pp. 6777-6782.**
- <sup>58</sup>**Soboll S, et al., *Thyroid hormone action on mitochondrial energy transfer* In “Biochim Biophys Acta” (1993); **1144**(1): pp. 1-16.**
- <sup>59</sup>Hafner RP, Nobes CD, McGown AD, Brand MD, *Altered relationship between protonmotive force and respiration rate in non-phosphorylating liver mitochondria isolated from rats of different thyroid hormone status* in “Eur.J.Biochem.” (1988); **178**: pp. 511-518.
- <sup>60</sup>Mowbray J, Corrigan J, *Short-term control of mitochondrial adenine nucleotide translocator by thyroid hormone* in “Eur.J.Biochem.” (1984); **139**(1): pp. 95-99.
- <sup>61</sup>Rolfe DF, Brand MD, *Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate* in “Am. J. Physiol.” (1996); **271**: pp. C1380-C1389.

- <sup>62</sup>Sterling K, et al., *Direct thyroid hormone activation of mitochondria: the role of adenine nucleotide translocase* in "Endocrinology" (1986); **119**(1): pp. 292-295.
- <sup>63</sup>Goglia F, Torresani J, Bugli P, Barletta A, Liverini G, *In vitro binding of triiodothyronine to rat liver mitochondria* in "Pflugers Arch." (1981); **390** (2): pp. **120-124**.
- <sup>64</sup>Ardail D, Lerme F, Puymirat J, Morel G, *Evidence for the presence of alpha and beta related T3 receptors in rat liver mitochondria* in "Eur. J. Cell. Biol." (1993); **62**(1): pp. 105-113.
- <sup>65</sup>Wrutniak C, Cassar-Malek I, Marchal S, Rochard P, Dauca M, Flechon J, Samarut J, Ghysdael J, Cabello G, *In search for the mitochondrial T3 receptor: a 43 kDa c-erbB related protein is located in the matrix and affects mitochondrial activity* in "J. Clin. Invest." (1994); **17**: pp. 15-18.
- <sup>66</sup>Ichikawa K, Hashizume K, *Thyroid hormone action in the cell* in "Endocr. J." (1995); **42** (2): pp. 131-140.
- <sup>67</sup>Hashizume K, Kobayashi M, Miyamoro T, Yamauchi K, *Dependence of the mitochondrial uptake of triiodothyronine (T3) in rat kidney on cytosolic T3 binding protein* in "Endocrinology" (1986); **119** (3): pp. 1063-1070.
- <sup>68</sup>Kato H, Fukuda T, Parkinson C, McPhie P, Cheng SY, *Cytosolic thyroid hormone-binding protein in a monomer of pyruvate kinase* in "Proc.Natl.Acad.Sci." USA (1989); **86**: pp. 7861-7865.
- <sup>69</sup>Vié MP, Blanchet P, Samson M, Francon J, Blondeau JP, *High affinity thyroid hormone binding protein in human kidney kinetic characterization and identification by photoaffinity labelling* in "Endocrinology" (1996); **137**: pp. 11-15.
- <sup>70</sup>Horst C, Rokos H, Seitz HJ, *Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-diiodo-L- thyronine* in "Biochem J." (1989); **261**: pp. 945-950.
- <sup>71</sup>Lanni A, Moreno M, Cioffi M, Goglia F, *Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver oxidative capacity* in "Mol. Cell. Endocrinol." (1992); **86** (3): pp. 143-148.
- <sup>72</sup>O'Reilly I, Murphy MP, *Studies on the rapid stimulation of mitochondrial respiration by thyroid hormones* in "Acta Endocrinol." (1992); **127** (6): pp. 542-546.
- <sup>73</sup>Moreno M, Lanni A, Lombardi A, Goglia F, *How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines* in "J. Physiol" (London) (1997); **505** (Pt2): pp. 529-538.

- <sup>74</sup> Lanni A, De Felice M, Lombardi A, Moreno M, Fleury C, Riccuier D, Goglia F, *Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart* in “FEBS Lett” (1997); 418m (1-2): pp. 171-174.
- <sup>75</sup> Lombardi A, Lanni A, Moreno M, Brand MD, Goglia F, *Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on the mitochondrial energy-transduction apparatus* in “Biochem.J.” (1998); 330 (Ptl): pp. 521-526.
- <sup>76</sup> Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F, *3,5-diiodo-L-thyronine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine both improve cold tolerance of hypothyroid rats but possibly via different mechanism* in “Pflug.Arch.Eur.J.Physio.” (1998); 436: pp. 407-413.
- <sup>77</sup> Cimmino M, Mion F, Goglia F, *Demonstration of in vivo metabolic effects of 3,5-diiodothyronine* in “J. Endocrinol.” (1996); 149 (2): pp. 319-325.
- <sup>78</sup> Moreno M, Lanni A, Lombardi A, Benedice L, Pinna G, Goglia F, *Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself?* In *Endocrinology* (2002); 143 (2): 604-10.
- <sup>79</sup> Moreno M, Silvestri E, Visser TJ, Goglia F, Lanni A, *Identification of 3,5-diiodo-L-thyronine binding proteins in rat liver cytosol by photoaffinity labelling* in “Endocrinology” (2003); 144 (6): pp. 2297-2303.
- <sup>80</sup> Goglia F, Lanni A, Horst C, Moreno M, Thoma R, *In vitro binding of 3,5-diiodo-L-thyronine to rat liver mitochondria* in “J. Mol. Endocrinol.” (1994); 13 (3): pp. 275-282.
- <sup>81</sup> Arnold S, Goglia F, Kadenbach B, *3,5-diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c-oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP* in “Eur. J. Biochem.” (1998); 252 (2): pp. 325-330.
- <sup>82</sup> Hummerich H, Soboll S, *Rapid stimulation of calcium uptake into rat liver by L-triiodothyronine* in “Biochem.J.” (1989); 285 (2): pp. 363-330.
- <sup>83</sup> Lanni A, Moreno M, Lombardi A, de Lange P, Silvestri E, Ragni M, Farina P, Baccari G, Failahi P, Antonelli A, Goglia F, *3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats* in “FASEB J.” (2005); 19: pp. 1552-1556.
- <sup>84</sup> Brunt EM. *Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology*. *Semin Liver Dis* 2001, 21: 3-16
- <sup>85</sup> Reid A.E. *Nonalcoholic steatohepatitis*. *Gastroenterology* 2001, 121: 710

- <sup>86</sup>Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. *Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes*. *Sem Liver Dis*, 2001, 21: 17-26
- <sup>87</sup>**Marchesini G, et al. *Nonalcoholic fatty liver disease: A feature of the metabolic syndrome in “Diabetes” (2001); 50: pp. 1844-1850.***
- <sup>88</sup>Franzese A, Vajro P, Argenziano A, Puzziello A, Iannucci MP, Saviano MC, Brunetti F, Rubino A *Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population* in “*Dig Dis Sci*” (1997); **42**: pp. 1428-1432.
- <sup>89</sup>**Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, and Giacca A, *Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type2 diabetes*. In “*Endocr. Rev*” (2002); **23**: pp. 201-229.**
- <sup>90</sup>Browning JD, Horton JD, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury* in “*J, CLin, Invest.*” (2004); **114**: pp. 147-152.
- <sup>91</sup>Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM, *Stimulation of adipogenesis in fibroblast by PPAR gamma2, a lipid-activated transcription factor* in “*Cell*” (1994); **79**: pp. 1147-1156.
- <sup>92</sup>Chao L, et al. *Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones* in “*J, CLin, Invest.*” (2000); **106**: pp. 1221-1228.
- <sup>93</sup>**Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA, *Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with non-alcoholic steatohepatitis* in “*Hepatology*” (2003); **38**: pp. 999-1007.**
- <sup>94</sup>**Begrache K, Igoidjil A, Pessayre D, Fromenty B, *Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it* in “*Mitochondrion*” (2006); **6**: pp. 1-28.**
- <sup>95</sup>Berson A, De Beco V, Lettéron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N, Feldmann G, Fromenty B, Pessayre D, *Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes*. In “*Gastroenterology*” (1998); **114**: 764-774.
- <sup>96</sup>Eaton S, *Control of mitochondrial  $\beta$ -oxidation flux* in “*Prog Lipid. Res*” (2002); **41**: pp. 197-239.

- <sup>97</sup>Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. *Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes* in "Mol. Pharmacol." (1995); 48: pp. 825-834
- <sup>98</sup>Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. ***Mitochondrial adaptation to obesity-related oxidant stress. Arch Biochem Biophys*** 2000;378:259-268
- <sup>99</sup>Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakauchi H, Nakatani K, Wakasa K. *In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic Fatty liver disease. J. Hepatol.*(2000); 37: pp. 56-62
- <sup>100</sup>Schulz H. *Beta oxidation of fatty acids in Biochem. Biophys. Acta* (1991); 1081:pp:109-120
- <sup>101</sup>Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. *High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. Febs* (1997); 416: pp.15-18
- <sup>102</sup>Esterbauer H, Schaur RJ, and Zollner H. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes* in "Free Radic.Biol. Med." (1991); 11: pp. 81-128
- <sup>103</sup>Poli, G, Schaur R J. *4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. IUBMB.* (2000) 50:315-321
- <sup>104</sup>Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher ZA. *Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production* in "J. Clin. Invest." (2004); 113: pp. 1277-1287
- <sup>105</sup> Sanchez-Alcazar JA, Schneider E, Martinez MA, Carmona P, Hernandez-Munoz I, Siles E, De La Torre P, Ruiz-Cabello J, Garcia I, Solis-Herruzo JA. *Tumor necrosis factor-alpha increases the steady state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells* in J. Bio.Chem. (2000); 275:pp.13353-13361
- <sup>106</sup> Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, Varala N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, Rojas J, Maluenda F, Burdiles P, Diaz J C, Smok G, Thielemann L, Poniachik J. *Oxidative stress-related parameters in the liver of non.alcoholic fatty liver disease patients. Clin. Sci.(Lond).*(2004); 106: pp. 261-268

<sup>107</sup>[www.minerva.unito.it/storia/insulina/insulina\\_struttura.htm](http://www.minerva.unito.it/storia/insulina/insulina_struttura.htm)

<sup>108</sup>Marino-Buslje C, Martin-Martinez M, Mizuguchi K, Siddle K, Blundell TL *The insulin receptor: from protein sequence to structure* in “Biochem. Soc. Trans.” (1999); 27 (4): pp. 715-726.

<sup>109</sup>Kavanaugh WM, Williams LT, *An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins* in “Science” (1994); 266: pp. 1862-1865.

<sup>110</sup>Cantley LC, *The phosphoinositide 3-kinase pathway* in “Science” (2002); 296: pp. 1655-1657

<sup>111</sup>Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB, Cohen P, *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein* in “Curr. Biol.” (1997); 7: pp. 261-269.

<sup>112</sup>Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT, *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B* in “Science” (1997); 277: pp. 567-570.

<sup>113</sup>Vanhaesebroeck B, Alessi DR, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB* in “Biochem. J.” (2000); 346: pp. 561-576.

<sup>114</sup>Sasaki K, Sato M, Umezawa Y, *Fluorescent indicators for Akt / protein kinase B and dynamics of Akt activity visualized in living cells* in “ J. Biol. Chem.” (2003); 278: pp. 30945-51.

<sup>115</sup>Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR, *Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha* in “Biochem. J.” (1998); 331: pp. 299-308.

<sup>116</sup>Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA, *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B* in “Nature” (1995); 378: pp. 785-789.

<sup>117</sup>Holman GD, Kasuga M, *From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport* in “Diabetes” (1997); 40: pp. 991-1003.

<sup>118</sup>Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS *Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells* in “Diabetes” (1998); 47: pp. 1006-1013.

- <sup>119</sup>Ueki K, Yamamoto-honda R, Kaburagi Y, Yamauchi T, Tobe K, Burgering BM, Coffey PJ, Komuro I, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T *Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis and protein synthesis* in “J. Biol. Chem.” (1998); **273**: pp. 5315-5322.
- <sup>120</sup>Nascimento EB, Fodor M, van der Zon GC, Jazet IM, Meinders AE, Voshol PJ, Vlasblom R, Baan B, Eckel J, Maassen JA, Diamant DM, Ouwens M, *Insulin-mediated phosphorylation of the proline-rich Akt substrate PRAS40 is impaired in insulin target tissues of high-fat diet-fed rats* in “Diabetes” (2006); **55**: pp. 3221-3228.
- <sup>121</sup>Datta SR, Brunet A, Greenberg ME, *Cellular survival: a play in three Acts* in “Genes Dev” (1999); **13**: pp. 2905-2927.
- <sup>122</sup>Schwertferger KL, Richert MM, Anderson SM, *Mammary gland involution is delayed by activated Akt in transgenic mice* in “Mol Endocrinol.” (2001); **15**(6): pp. 867-881.
- <sup>123</sup>Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC, *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation* in “Science” (1998); **282**: pp. 1318-1321.
- <sup>124</sup>Ohba N, Kiryu-Seo S, Maeda M, Muraoka M, Ishii M, Kiyama H, *Transgenic mouse overexpressing the Akt reduced the volume of infarct area after middle cerebral artery occlusion* in “Neurosci. Lett.” (2004); **359**: pp. 159-162.
- <sup>125</sup>Petersen KF, Shulman GI: *Etiology of insulin resistance* in “Am. J. Med.” (2006); **119**: pp. 10S-16S.
- <sup>126</sup>Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M: *Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin* in “J. Biol. Chem.” (1994); **269**: pp. 3568-3573.
- <sup>127</sup>resner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI: *Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity* in “J. Clin. Invest.” (1999); **103**: pp. 253-259.
- <sup>128</sup>Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI: *Free fatty acid-induced insulin resistance is*

associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade in "Diabetes" (1999); **48**: pp. 1270-1274.

<sup>129</sup>Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI: *PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance* in "J. Clin. Invest." (2004); **114**: pp. 823-827.

<sup>130</sup>Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI: *Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo* in "J. Biol. Chem." (2000); **275**: pp. 38990-38994.

<sup>131</sup>Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI: *Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease* in "J. Biol. Chem." (2004); **279**: pp. 32345-32353.

<sup>132</sup>Neschen S, Morino K, Hammond LE, Zhang D, Liu ZX, Romanelli AJ, Cline GW, Pongratz RL, Zhang XM, Choi CS: *Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice* in "Cell. Metab." (2005); **2**: pp. 55-65.

<sup>133</sup>Reaven GM: *Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and hypertension. Parallels between human disease and rodent models* in "Diabetes Care" (1991); **14**: pp. 195-202.

<sup>134</sup>Chase HP, Voss MA, Butler-Simon N, Hoops S, O'Brien D, Dobersen MJ: *Diagnosis of pre-type I diabetes* in "J Pediatrics" (1987); **111**: pp. 807-812.

<sup>135</sup>Kahn CR: *Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes*. Diabetes (1994); **43**: 1066-1084, 1994.

<sup>136</sup>Reaven GM: *Role of insulin resistance in human disease* in "Diabetes" (1988); **37**: pp. 1595-1607.

<sup>137</sup>Stern MP: *Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis* in "Diabetes" (1995); **44**: pp. 369-374.

<sup>138</sup>**Lanni A, Moreno M, Lombardi A and Goglia F, Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat** in "J. Physiol." (1996); **494**: pp. 831-837.

<sup>139</sup>Allard M, Le blanc J, *Effects of cold acclimation, cold exposure, and palatability on postprandial thermogenesis in rats* in "Int. J. Obes." (1988); **12**: pp. 169-178.

<sup>140</sup>**Folch J, Lees M., Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue.** In "Biol Chem"(1957); **226**: 497-509.

- <sup>141</sup>S. Summermatter, D. Mainieri, A.P. Russel, J.Seydoux, J.P.Montani, A. Buchala, G. Solinas, and A.G.Dulloo. *Thrifty metabolism that favors fat storage after caloric restriction: a role for skeletal muscle phosphatidylinositol-3-kinase activity and AMP-activated protein kinase*. In “The FASEB Journal”(2008); **22(3):774-85**.
- <sup>142</sup>Golbahar J, Aminzadeh MA, Kassab SE, Omrani GR. *Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male Sprague-Dawley rats*. In *Diabetes res clin pract.* (2007);**76:1-5**.
- <sup>143</sup>Laemmli UK, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. In “Nature”(1970);**227(5259):680-5**.
- <sup>144</sup>Liverini G, Iossa S, Barletta A, *The effect of cold exposure on rat liver mitochondrial respiratory capacity* in “Comp. Biochem. Physiol. B.” (1991); **98: pp. 583-585**.
- <sup>145</sup>Estabrook RW, *Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios* in “Methods Enzymol.” (1967); **10: pp. 41-47**.
- <sup>146</sup>Nedergaard,J. *The relationship between extramitochondrial Ca<sup>2+</sup> concentration, respiratory rate, and membrane potential in mitochondria from brown adipose tissue of the rat*. *Eur. J. Biochem.* (1983)**133:85-191**.
- <sup>147</sup>Richieri GV, Anel A, Kleinefeld AM, *Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB*. In “Biochemistry”(1993) **32: 7574-7580**.
- <sup>148</sup>Alexson SE, Nedergaard J. *A novel type of short-and medium-chain acyl-CoA hydrolases in brown adipose tissue mitochondrial*. In “J.Biol:Chem” (1988) **263 (27):13564-13571**.
- <sup>149</sup>Gardner PR, *Aconitase: sensitive target and measure of superoxide* in “Methods Enzymol.” (2002); **349: pp. 9-23**.
- <sup>150</sup>Fridovich I, *Superoxide radical and superoxide dismutases* in “Annu. Rev. Biochem.” (1995); **64: pp. 97-112**.
- <sup>151</sup>Drapier JC, Hibbs JB Jr, *Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis* in “Methods Enzymol.” (1996); **269: pp. 26-36**.
- <sup>152</sup>Imlay JA, Fridovich I, *Assay of metabolic superoxide production in Escherichia Coli*. In “J Biol Chem.”(1991); **266(11): 6957-65**.
- <sup>153</sup>Flohè L, Otting F, *Superoxide Dismutase assays*. In “Methods Enzymol.”(1984); **105: 93-104**.

<sup>154</sup>Brady LJ, Brady PS, Romsos DR and Hoppel CL, *Elevated hepatic mitochondrial and peroxisomal oxidative capacities in fed and starved adult obese (ob/ob) mice* in “Biochem. J.” (1985); **231**: pp. 439-444.

<sup>155</sup>Louet JF, Chatelain F, Decaux JF, Park EA, Kohl C, Pineau T, Girard J, Pegorier JP, *Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha)-independent pathway* in “Biochem. J.” (2001); **354**: pp. 189-197.