

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

IN BIOLOGIA APPLICATA

IVXX

“Effetti della 3,5 diiodo-L-tironina sul metabolismo lipidico del muscolo gastrocnemio di ratto”

Cordinatore

Ch.ma Prof.

Ezio Ricca

Docente Tutore

Ch.ma Prof.ssa

Lilla Lionetti

Candidata

Napolitano Laura

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

PAG.

CAPITOLO I: GLI ORMONI TIROIDEI

-Generalità.....	2
-La deiodinazione periferica degli ormoni tiroidei.....	5
-Meccanismo di azione degli ormoni tiroidei.....	7
-Effetti a breve termine degli ormoni tiroidei.....	12

CAPITOLO II: LA 3,5-DIODO-L-TIRONINA (3,5-T2)... 15

-L'ormone T3 è precursore endogeno della 3,5-T2.....	15
-Effetti <i>in vitro</i> della 3,5-T2.....	16
-Effetti <i>in vivo</i> della 3,5-T2	19
-Importanza della 3,5-T2 nel ridurre l'adiposità nei ratti.....	25

CAPITOLO III: regolazione dell'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico: coinvolgimento della proteina chinasi attivata da AMP (AMPK) e del trasportatore FAT/CD36... 29

-AMPK e suo ruolo nella regolazione del metabolismo lipidico del muscolo scheletrico	29
-Ruolo di FAT/CD36 nel metabolismo lipidico del muscolo scheletrico.	38

SCOPO DELLA TESI..... 42

PROCEDURE SPERIMENTALI..... 45

RISULTATI 68

DISCUSSIONE..... 104

BIBLIOGRAFIA..... 115

CAPITOLO I: GLI ORMONI TIROIDEI

Generalità

Gli ormoni tiroidei vengono prodotti e secreti dalla tiroide una ghiandola endocrina, localizzata nella regione anteriore del collo, che riversa direttamente nel sangue gli ormoni tiroidei. Circa il 90% della secrezione ormonale è costituita dalla 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina, T₄), mentre il rimanente 10% dalla 3,5,3'-triiodotironina (T₃) (fig 1).

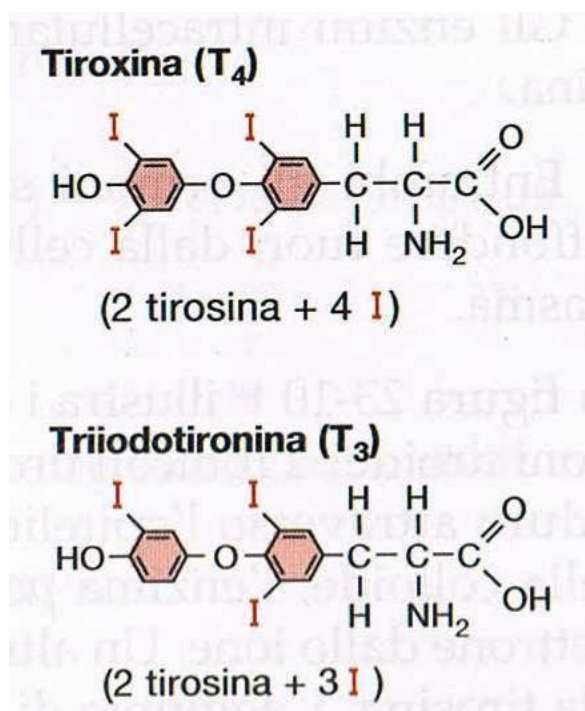


Figura 1 : gli ormoni tiroidei T₄ e T₃

Le due molecole differiscono solo per la configurazione chimica della posizione 5'. T₄ presenta un atomo di iodio che invece è assente nella T₃. A livello dei tessuti periferici, la maggior parte della T₄ circolante (circa 80%) viene deiodinata in posizione 5 o 5' a livello periferico ad opera di enzimi detti deiodasi che la

trasformano rispettivamente in T3 o reverse T3 (rT3). L'insieme delle attività biologiche degli ormoni tiroidei sono da attribuire alla T3 per la quale sono presenti recettori specifici nei tessuti ed è quindi da considerarsi la molecola ormonale biologicamente attiva.

La secrezione degli ormoni tiroidei viene finemente regolata dal TSH proveniente dall'adenoipofisi. La secrezione del TSH è a sua volta stimolata dall'ormone stimolante il rilascio di tireotropina (TRH), proveniente dall'ipotalamo. Gli stessi ormoni tiroidei poi agiscono con un feedback negativo sull'ipotalamo e sul lobo anteriore dell'ipofisi per limitare la secrezione di TRH e TSH.

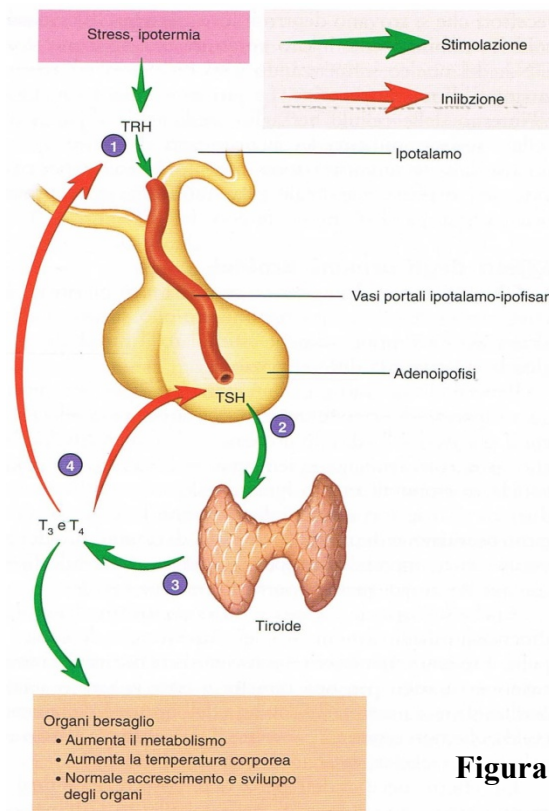


Figura 2:Regolazione della secrezione degli ormoni tiroidei

La distribuzione degli ormoni tiroidei ai vari tessuti avviene attraverso proteine proteico di trasporto: la proteina di legame della tiroxina (TBG) , la transtiretina (TTR) e l'albumina. Gli ormoni sono associati con le proteine di trasporto da legami non covalenti e sono in costante equilibrio dinamico con una piccola quantità di ormoni liberi. E' proprio questa frazione libera ad essere immediatamente disponibile per i tessuti bersaglio.

Gli effetti degli ormoni tiroidei si manifestano su quasi tutti gli organi, stimolando, in alcuni il metabolismo, in altri la crescita e la differenziazione. Tali ormoni, infatti, aumentano la velocità con cui i carboidrati, i lipidi e le proteine vengono metabolizzati, il che, a sua volta, aumenta la temperatura corporea (termogenesi). Possono, poi, alterare la funzione mitocondriale con produzione di maggiori quantità di ATP. Sono, inoltre, indispensabili per uno sviluppo normale di ossa, tessuto connettivo e tessuto nervoso.

Risulta, pertanto, intuitivo che l'ipersecrezione degli ormoni tiroidei provochi un aumento del metabolismo, i cui sintomi principali sono: elevata temperatura corporea, perdita di peso, aumento dell'appetito, tachicardia, ipertensione e ipertrofia tiroidea. L'iposecrezione, invece, provoca una riduzione del metabolismo energetico associato a riduzione della temperatura corporea, aumento di peso, riduzione dell'appetito, bradicardia, ipotensione, ipotonia della muscolatura scheletrica ed apatia. Se l'iposecrezione si manifesta nell'infanzia, si verificano, inoltre, un anomalo sviluppo del sistema nervoso, una crescita alterata

ed una maturazione tissutale anomala. Ne consegue un ritardo mentale in persone con bassa statura e una forma clinica caratteristica denominata *cretinismo*.

II. La deiodinazione periferica degli ormoni tiroidei.

La reazione di deiodazione delle iodotironine svolge un ruolo chiave nell'omeostasi degli ormoni tiroidei. Gli enzimi responsabili delle deiodinazioni sono stati individuati e clonati; essi sono la iodotironina deiodinasi di tipo 1 (ID-I), la iodotironina deiodinasi di tipo 2 (ID-II) e la iodotironina deiodinasi di tipo 3 (ID-III). Si tratta di seleno-proteine, in quanto possiedono residui di selenocisteina cruciali per la loro stessa attività catalitica. (*Williams e coll 2011*)

ID-I presenta un'attività prevalente per la deiodazione in posizione 5'. Essa catalizza la reazione di conversione della T4 in T3 ed anche della rT3 in 3,3'T2 (fig 3). Inoltre, può anche catalizzare la deiodazione dell'anello interno dei composti solfo-coniugati degli ormoni tiroidei. L'attività della ID-I è stimolata da cofattori tiolici ed 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 in caso di ipertiroidismo. Questo enzima è localizzato principalmente nel fegato, nel rene e nella tiroide; tuttavia il contributo relativo dei predetti tessuti alla produzione totale della T3 non è conosciuto e può variare nelle diverse specie. Nel soggetto adulto sano, l'80% circa della T3 circolante è prodotta dalla monodeiodazione della T4, mentre questa proporzione varia in condizioni patologiche (*Visser, e coll., 1988*)

ID-II come la deiodasi di tipo I, presenta un'attività prevalentemente per la deiodazione in posizione 5' ed ha una maggiore affinità per la T4 rispetto alla rT3 o T3. Questo enzima è presente nel sistema nervoso centrale, nell'ipofisi, nel tessuto adiposo bruno e nella pelle e nel topo ID-II è espressa anche nel muscolo (*Marsili A. e coll., 2010*). Per potersi attivare richiede la presenza di un'alta concentrazione di cofattori tiolici e non è inibita dal PTU (*St. Germain, 1997*).

Tuttavia, analogamente alla ID-I, è inibita dallo iodato o iopanoato. Si ritiene che la ID-II sia importante per il mantenimento dei livelli intracellulari di T3, soprattutto nel sistema nervoso centrale, costituendo una difesa dalla deficienza di ormoni tiroidei (*Sabatino L. e coll 2000*). Infine, **ID-III** catalizza la deiodazione in posizione 5 ed ha un'affinità molto maggiore per la T3 rispetto alla T4. E' abbondante nel sistema nervoso centrale e nella placenta (*St. Germain,, 1997*). E' stimolata dai cofattori tiolici, ed è inibita dall'ipodato e iponoato ma è insensibile al PTU. Dal momento che i metaboliti generati dalla deiodazione in 5 non hanno attività calorica o tiro mimetica, questa via metabolica è definita generalmente inattivante, in contrapposizione con la via che porta alla conversione della T4 in T3. Alcuni studi, tuttavia, indicano che la rT3 ha funzioni a livello cellulare (*Kohrle e coll., 1991*).

La via principale del metabolismo dell'ormone tiroideo è dunque rappresentata dalla deiodinazione (fig.3): la tiroxina viene convertita in T3 mediante deiodinazione dell'anello fenolico esterno oppure in rT3 attraverso deiodinazione dell'anello tirosilico interno. La T3 e la rT3 vengono, poi, ulteriormente

deiodinate formando le diiodotironine: la T3 produce 3,3'-T2 e potenzialmente 3,5-T2, mentre la rT3 produce 3,3'-T2 e 3',5'-T2.

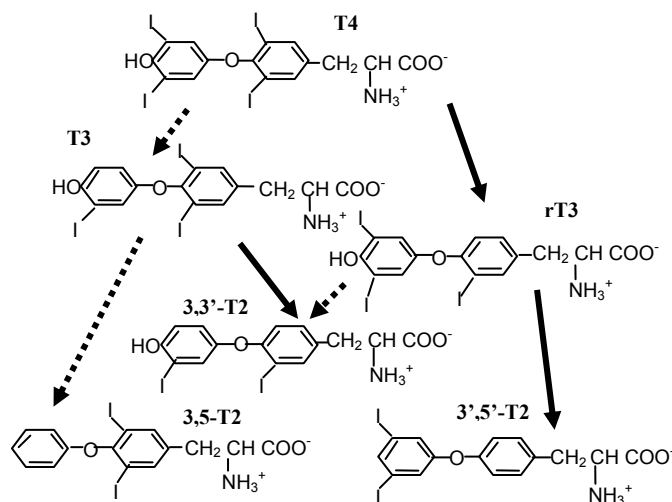


Figura 3: Deiodinazione periferica delle iodotironine: produzione di T₃, rT₃, 3,3'-T₂, 3,5-T₂ e 3',5'-T₂ a partire da T₄ (le linee tratteggiate rappresentano la deiodinazione dell'anello esterno).

III. Meccanismo d'azione degli ormoni tiroidei.

La maggior parte degli effetti noti svolti dagli ormoni tiroidei sono il risultato della modulazione della trascrizione genica che si verifica in seguito al legame dell'ormone con il proprio recettore nucleare.

In effetti, i recettori per gli ormoni tiroidei appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari (*Yen PM, 2001*) che include anche i recettori per gli estrogeni, progesterone, glucocorticoidi, acido retinoico, vitamina D3 e i recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi. (PPAR). I suddetti recettori sono *fattori di trascrizione ligando-dipendenti* in grado di legare sia l'ormone che sequenze di DNA localizzate

nel promoter dei geni bersaglio (TRE), dove possono interagire con co-repressori e co-attivatori regolando così la trascrizione genica.

Due geni ($THR\alpha$ e $THR\beta$) codificano per diverse isoforme recettoriali. Il gene $THR\alpha$ dà origine, per splicing alternativo, alle isoforme $THR\alpha_1$ e $THR\alpha_2$ di cui solo la prima è funzionalmente attiva, in quanto l'altra non è in grado di legare l'ormone. Il trascritto primario del gene β presenta un sito alternativo di inizio della traduzione e produce le isoforme $THR\beta_1$ e $THR\beta_2$, entrambe funzionali.

I recettori per gli ormoni tiroidei (TR) spesso formano eterodimeri con il recettore per l'acido retinoico (RXR). L'eterodimerizzazione è regolata da diversi meccanismi che insieme determinano la variabilità della sequenza di riconoscimento (*Glass CK, 1994*).

TR sono costituiti da una singola catena polipeptidica con più domini. La regione N-terminale contiene un dominio di transattivazione ligando indipendente, definito AF1; centralmente è localizzato il dominio di legame al DNA (DBD) ed infine, a livello dell'estremità C-terminale, ritroviamo un dominio di legame al ligando (LBD) che riconosce l'ormone e contiene al suo interno un secondo dominio di transattivazione, definito AF2, la cui esposizione si verifica solo in seguito al cambiamento conformazionale determinato dall'interazione ormone-recettore (figura 4).



Figura 4. Organizzazione strutturale del recettore per gli ormoni tiroidei.

TR legano il DNA sia in presenza che in assenza di ligando, in corrispondenza degli elementi di risposta all'ormone tiroideo (TREs) localizzati nel promoter dei geni bersaglio. Diversi studi hanno dimostrato che in assenza di ormone si registra una repressione della trascrizione genica dovuta alla presenza di corepressori, proteine responsabili direttamente o indirettamente della deacetilazione degli istoni e, quindi, della compattazione della cromatina, evento che impedisce la trascrizione genica (*Hörlein AJ e coll, 1995*).

Il legame dell'ormone tiroideo con i TR ne determina una modifica conformazionale: perde affinità per i co-repressori e recluta i co-attivatori, proteine che permettono l'acetilazione degli istoni e l'attivazione della trascrizione genica catalizzando direttamente tale reazione, se sono dotate di attività istone deacetilasica, o indirettamente, reclutando proteine che possiedono questa attività.

Studi recenti hanno dimostrato che topi knock-out per i recettori TR α e TR β presentano un fenotipo più lieve rispetto alle caratteristiche cliniche associate ad un ipotiroidismo congenito. Ciò è dovuto al fatto che in assenza del recettore viene rimossa anche la repressione della trascrizione dei geni bersaglio che il recettore

stesso esercita quando non è legato all'ormone (*Forrest D, 2000; Flamant F e coll, 2003*).

Gli ormoni tiroidei sono in grado di regolare negativamente la trascrizione di alcuni geni bersaglio attraverso un processo che coinvolge TREs negativi (nTREs). Al contrario di quanto detto per i geni regolati positivamente, in assenza dell'ormone il recettore, agendo sui suddetti nTREs, stimola la trascrizione genica ed il successivo legame con la T3 ne determina una repressione (figura 5). Tra i geni regolati negativamente dalla T3 quelli maggiormente studiati sono: il gene che codifica per il TRH e quelli che codificano per le subunità α e β del TSH. Ciò è dovuto al fatto che la loro espressione è fondamentale per il corretto funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide.

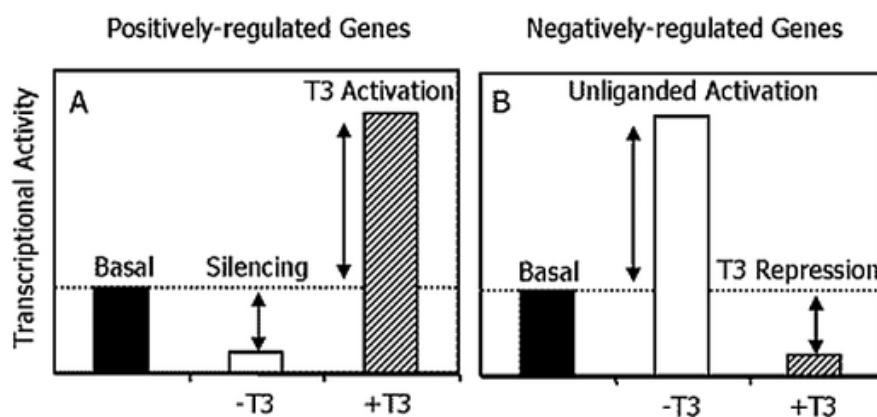


Figura 5. Regolazione della trascrizione genica da parte della T3

Il meccanismo alla base di tale regolazione negativa non è del tutto chiaro, infatti sono stati proposti differenti modelli. Secondo il modello più semplicistico, il legame della T3 al suo recettore induce il rilascio dei coattivatori e il reclutamento dei corepressori, per cui tale meccanismo richiede necessariamente il legame del recettore con il DNA (figura 6a). Un altro modello prevede l'intervento di proteine di legame al DNA, come il complesso AP1 (jun-fos) che a sua volta interagisce con il recettore dell'ormone tiroideo (*Pfahl M, 1993*) (figura 6b). Nella figura 6c, infine, è rappresentato un terzo modello secondo il quale il recettore interagisce con i coattivatori e i corepressori (rispettivamente in presenza o in assenza di T3) sottratti ad altri recettori nucleari o ad altri fattori di trascrizione, come AP1 (*Tagami T, 1997; Kamei Y et al, 1996*).

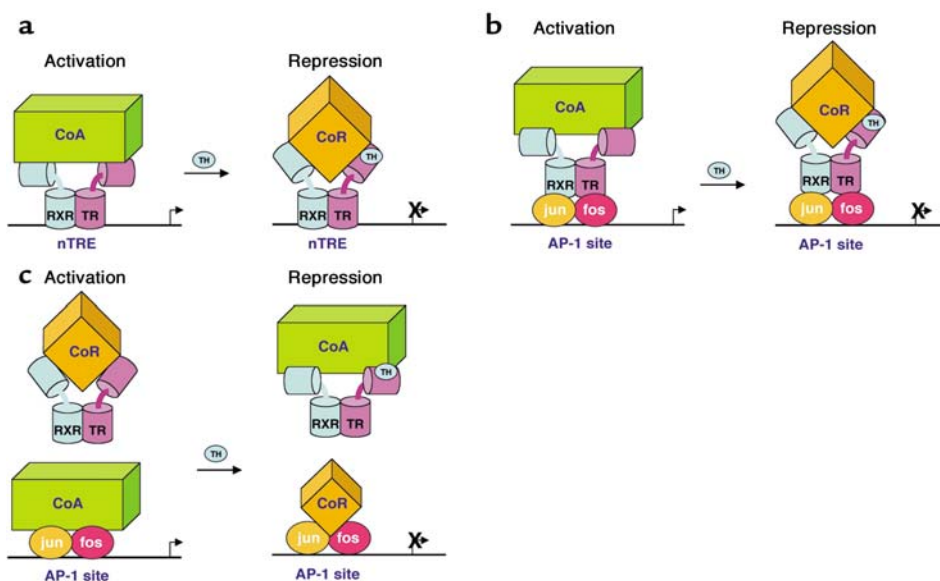


Figura 6. Probabili meccanismi che descrivono come la T3 regola negativamente l'espressione genica.

IV. Effetti a breve termine degli ormoni tiroidei.

Le azioni degli ormoni tiroidei, mediate principalmente da recettori nucleari, sono il risultato della modulazione dell'espressione genica. La manifestazione degli effetti, pertanto, richiede la sintesi dell'RNA messaggero e la successiva traduzione in proteine, processi che richiedono tempi abbastanza lunghi (molte ore o addirittura giorni) e che sono alla base di quelli che vengono definiti effetti a *lungo termine*.

Alcuni effetti indotti dagli ormoni tiroidei si manifestano rapidamente e sono indipendenti dalla trascrizione e dalla traduzione, suggerendo che tali ormoni possono attuare anche meccanismi non-genomici (*Bassett JH e coll, 2003*). Questi ultimi sono mediati da recettori extranucleari, localizzati a livello della membrana plasmatica, del citoplasma e dei mitocondri. Gli effetti non genomici comprendono svariati processi cellulari tra cui: la motilità cellulare (*Davis PJ e coll, 2002a,b*), l'ingresso del calcio (*Davis PJ e coll, 2002*), l'attivazione della proteina chinasi C (*Davis PJ e coll, 2002a,b*), il traffico proteico intracellulare (*Davis PJ e coll, 2002a,b*), l'attività dell'antiporto Na^+/H^+ (*Scapin E e coll, 2009a,b*) e la proliferazione cellulare (*Davis FB e coll, 2006*).

A differenza degli effetti genomici, per la cui realizzazione è necessario un intervallo di tempo abbastanza lungo, quelli non genomici possono essere registrati nell'arco di poche ore dalla somministrazione dell'ormone, si parla quindi di effetti a *breve termine*. Ciò può essere spiegato dal fatto che, in questo caso, viene regolata l'attività di proteine già presenti all'interno della cellula, senza attivarne la trascrizione e la successiva sintesi. L'attivazione di recettori extranucleari, in alcuni

casi, può culminare in una variazione dell'attività trascrizionale. E' da sottolineare che in questo caso non è coinvolto il legame della T3 con il TR legato a TRE. Un esempio di attivazione di recettori extranucleari per gli ormoni tiroidei vede coinvolta l'integrina $\alpha V\beta 3$, presente sulla superficie cellulare e recentemente riconosciuta da Bergh e coll (2005) come un recettore di membrana per le iodotironine. Il legame degli ormoni tiroidei a $\alpha V\beta 3$ induce l'attivazione di una serina-treonina chinasi (MAPK detta ERK). Una volta attivata, ERK trasloca nel nucleo, fosforila TR $\beta 1$ e ne modifica l'attività trascrizionale. In forma fosforilata, infatti, TR $\beta 1$ rilascia i co-repressori e recluta i co-attivatori (Davis PJ e coll, 2000). Tuttavia, è stato visto che l'attivazione della suddetta via di segnalazione sembra promuovere la trascrizione genica fino ad un livello detto *basale*. Per poter osservare l'attivazione completa della trascrizione genica è necessario che la T3 sia presente allo stesso tempo a livello nucleare ed interagisca con i propri recettori (Davis PJ e coll, 2008).

Studi *in vivo* ed *in vitro* hanno dimostrato che gli effetti a breve termine indotti dagli ormoni tiroidei comprendono l'attivazione di molte chinasi tra cui, la proteina chinasi B (detta anche Akt) mediata dall'attivazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K). Akt induce l'esposizione dei trasportatori del glucosio GLUT4 a livello della membrana plasmatica (Cettour-Rose P e coll, 2005) e promuove la glicolisi attivando, mediante fosforilazione, enzimi chiave di tale processo quale la fosforuttochinasi (PFK) (Moeller LC e coll, 2006).

L'attivazione della PI3K, da cui consegue l'attivazione di Akt precedentemente descritta, sembra essere il risultato dell'interazione tra il recettore TR β 1, localizzato a livello citosolico e complessato con la T3, e l'enzima stesso.

L'attivazione di Akt promuove la traduzione dell'mRNA. Il meccanismo molecolare sembra coinvolgere la fosforilazione della proteina S6 della subunità ribosomiale 40 S conseguente all'attivazione di mTOR (target mammaliano della rapamicina) (Cao *X e coll*, 2005).

Studi *in vivo* hanno confermato la capacità della T3 di indurre rapidamente l'attivazione di Akt. Ciò determina un aumento del metabolismo glucidico e garantisce l'ingresso del glucosio nella cellula (De Lange *P e coll*, 2008). Gli effetti della T3 sulla fosforilazione di Akt sono rapidi ed evidenziabili già dopo 6 ore dalla sua somministrazione. In vivo a ratti ipotiroidei

CAPITOLO 1

L'ormone 3,5-diiodotironina (T2)

Oggi è noto che alcuni derivati degli ormoni tiroidei “classici” T3 e T4 possiedono un'attività biologica che sembra essere legata, in particolare, al metabolismo lipidico. Tra le iodotironine naturalmente prodotte dal metabolismo periferico della T3, da sempre considerate solo molecole inattive, emergono le diiodotironine ed, in particolare, la 3,5-T2 (fig. 7)

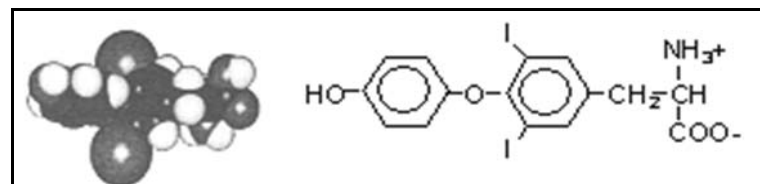


Figura 7: struttura della 3,5-diiodotironina

II. L'ormone T3 è il precursore endogeno della 3,5-T2

Attraverso studi *in vitro* è stato identificato che :

- T4 è precursore di T3 ed rT3
- rT3 è precursore sia della 3,3'-T2 sia della 3',5'-T2
- T3 è precursore della 3,3'-T2.(Visser e coll.,1990)

Anche se potenzialmente la T3 è precursore della 3,5-T2 gli studi *in vitro* non supportano tale ipotesi. Infatti, l'incubazione di T3 con microsomi di fegato di ratto (una frazione cellulare ricca di deiodinasi di tipo 1, in grado di catalizzare la rimozione di un atomo di iodio sia dall'anello tirosilico sia da quello fenolico) ha

rivelato la formazione di 3,3'-T2, ma non di 3,5-T2. Anche l'incubazione di T3 con cellule transfettate con cDNA per la deiodinasi di tipo 2 (enzima che catalizza la rimozione di un atomo di iodio dall'anello esterno delle iodotironine e noto convertire T4 in T3) non ha permesso di evidenziare la formazione di 3,5-T2 a partire dalla T3. (Moreno e coll. comunicazione personale.), Tali dati possono avere due interpretazioni:

- la T3 non è precursore della 3,5-T2
- in vitro l'assenza di cofattori cruciali affinché si verifichi la conversione di T3 in 3,5-T2 non permette di evidenziare tale pathway

Per evidenziare la via di formazione della T2 a partire dalla T3, quale suo precursore metabolico sono stati effettuati studi in vivo. (Moreno e coll.2001)

Da tali studi è emerso che la somministrazione intraperitoneale di T3 ad animali eutiroidei comporta un incremento dei livelli sierici di 3,5-T2, indicando che la stessa T3 è un precursore metabolico della T2. La conversione di T3 a 3,5-T2, *in vivo*, non è più evidenziabile quando la stessa T3 viene somministrata ad animali che presentano inibizione degli enzimi deiodinasi. Tali dati indicano che la deiodinazione periferica della T3 è una tappa metabolica importante per la formazione della 3,5-T2.

III. Effetti *in vitro* della 3,5-T2

I primi studi *in vitro* che hanno evidenziato un ruolo della 3,5-T2 nell'attivazione delle ossidazioni a livello mitocondriale risalgono al 1989, quando Horst e

collaboratori mostrarono che la T2, come la T3, a concentrazione pari a 1pM, in pochi minuti è in grado di provocare una stimolazione del consumo di ossigeno di fegato perfuso di ratti ipotiroidei. Inoltre, gli stessi studi hanno messo in evidenza che l'effetto della T3, ma non quello della T2, è abolito in presenza di un inibitore dell'attività della deiodinasi di tipo 1, suggerendo che gli effetti della T3 sono il risultato della sua conversione in T2.

Gli esperimenti condotti *in vitro*, relativi all'effetto della T2 su mitocondri isolati ed intatti, hanno dato esiti negativi. Tuttavia se la T2 veniva preincubata in vitro con l'omogenato di fegato, e solo successivamente venivano isolati i mitocondri, la T2 era in grado di indurre un incremento dell'attività della citocromo ossidasi. Ciò suggerisce il coinvolgimento di uno specifico fattore citoplasmatico negli effetti metabolici della T2. L'idea dell'esistenza di proteine citoplasmatiche in grado di legare la T2, e di poterne mediare anche gli effetti a livello cellulare, è stata confermata attraverso studi di fotoaffinità. Nel fegato di ratto, infatti, sono state identificate tre proteine citosoliche con peso molecolare di 86, 66 e 38 kDa. Di queste la proteina p38 mostra la maggiore affinità per la T2. La stessa proteina è anche in grado di legare la T3, ma solo in presenza di NADPH. (*Moreno e coll. 2003*).

Siti specifici di legame per la T2 sono stati anche evidenziati nei mitocondri di fegato di ratto (*Gogliola e coll., 1994*). 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).

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 presenti ad un'elevata concentrazione.

Ulteriori studi di marcatura per fotoaffinità, condotti da Arnold e collaboratori (1998), hanno identificato la subunità Va del complesso della COX come sito di legame per la T2, (fig 8). La natura specifica del legame è stata confermata utilizzando un anticorpo monoclonale contro la subunità Va, in presenza del quale viene impedito il legame della diiodotironina alla subunità stessa.

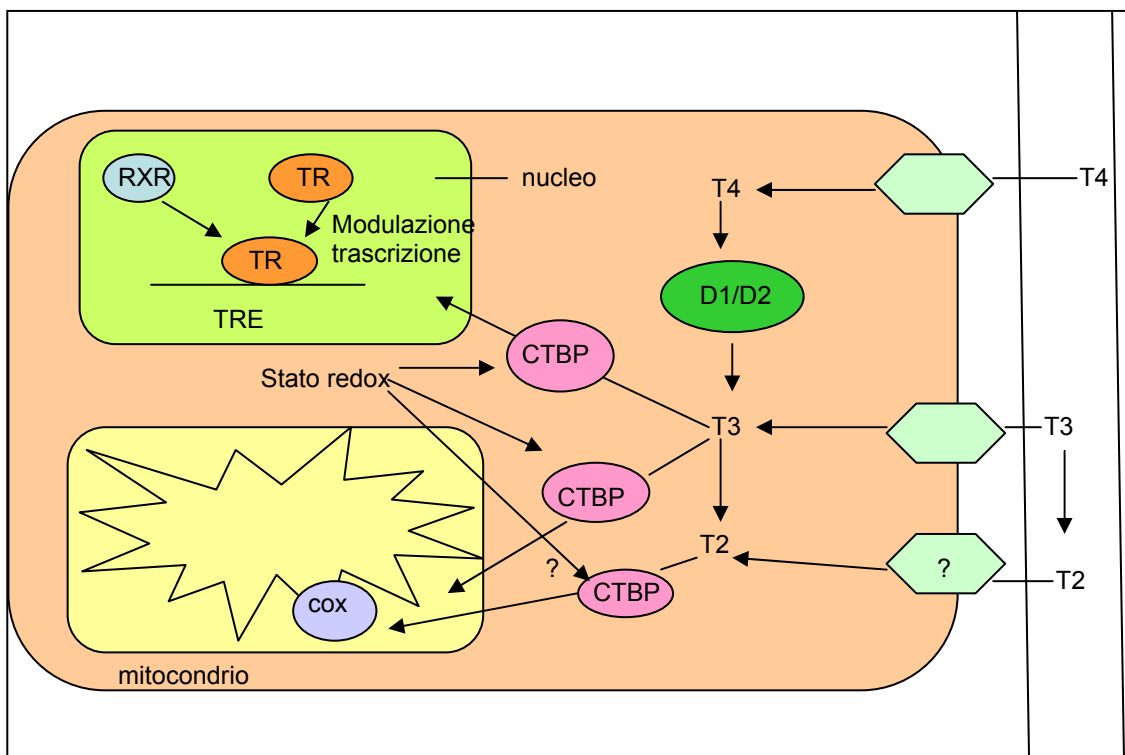


Figura 8 Schematica rappresentazione dell'azione degli ormoni tiroidei T3 e T2 a livello nucleare e mitocondriale.

Il mitocondrio contiene specifici siti di legame per la T2, come la subunità Va del complesso COX, attraverso cui la diiodotironina modula l'attività della catena respiratoria. La T2 viene formata all'interno della cellula, ma può anche provenire dal plasma; tuttavia, specifici trasportatori della T2 sulla membrana plasmatica non sono stati identificati. Gli effetti della T2 sul mitocondrio dipendono dal suo legame con le CTBP e sono indipendenti dallo stato redox della cellula.

La T2 sembra influenzare l'attività mitocondriale anche attuando altri processi. Infatti, Hummerich e collaboratori (1989) hanno evidenziato che la diiodotironina induce un incremento nella captazione di calcio da parte del mitocondrio, processo che si traduce in un'incrementata attività delle deidrogenasi mitocondriali e, quindi, in un incremento della quantità di substrati ridotti disponibili per la catena respiratoria.

II. Effetti *in vivo* della 3,5-T2

Diversi studi *in vivo* sono stati effettuati per chiarire il ruolo fisiologico della T2 e, principalmente, i suoi effetti sul metabolismo energetico, sulla respirazione cellulare e su quella mitocondriale.

Uno studio condotto da Lanni e collaboratori (1992) ha evidenziato che somministrazioni acute e croniche di T2 a ratti ipotiroidei provocano cambiamenti significativi nella funzionalità mitocondriale. In particolare, è stato visto che una singola somministrazione 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. Inoltre, l'effetto della T2 è indipendente dalla sintesi proteica, in quanto è evidente anche in presenza di cicloesimide (O'Reilly e Murphy, 1992), il che suggerisce che è mediato da un'interazione diretta con i mitocondri. D'altro canto, gli effetti indotti dalla T3 sarebbero il risultato della sua azione a livello nucleare.

Per individuare i siti mitocondriali bersaglio della T2, responsabili della sua azione biologica, Lombardi e collaboratori (1998) hanno effettuato studi nei quali la “top-down elasticity analysis” è stata applicata ai mitocondri isolati da ratti in cui era stata iniettata la T2. I risultati hanno mostrato che, un’ora dopo la sua somministrazione *in vivo*, la T2 incrementa l’attività globale delle reazioni coinvolte nell’ossidazione dei substrati. In particolare, la diiodotironina agisce su due blocchi/gruppi di reazioni: il complesso IV (COX) e l’insieme delle reazioni coinvolte nella riduzione del citocromo C.

E’ stato evidenziato che gli effetti della T2 non sono esclusivamente mitocondriali. Infatti la diiodotironina è in grado di influenzare l’attività di 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 (Lombardi e coll., 2000).

Dato il ruolo chiave svolto dai mitocondri nel metabolismo energetico, sono stati effettuati studi atti a valutare se l’effetto della T2 sulla velocità del consumo di ossigeno mitocondriale potesse riflettersi sul metabolismo energetico dell’animale in toto (Moreno e coll., 1997). In tali studi, sono stati paragonati gli effetti esercitati dalla T3 e dalla T2 sul metabolismo di riposo di animali ipotiroidei, cioè che presentavano gli enzimi deiodinasi inibiti ; (utilizzando tale modello animale gli autori hanno escluso che gli effetti osservati, in seguito a somministrazione

delle iodotironine, fossero dovuti a prodotti derivanti dalla loro deiodinazione periferica). Dal predetto studio è emerso che sia T3 sia T2 sono capaci di incrementare la velocità metabolica a riposo (RMR) dell'animale. Gli effetti indotti, tuttavia, mostrano differenze relative se si considera il tempo di insorgenza dell'effetto stesso e la dipendenza dalla trascrizione genica nucleare.

La T3, infatti, induce un incremento nell'RMR di quasi il 40% che inizia 25-30 ore dopo la somministrazione della iodotironina, raggiunge un massimo valore a 50-75 ore e si prolunga fino a 5-6 giorni dopo la somministrazione. La somministrazione della T2, invece, induce una risposta che inizia 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 vengono somministrate simultaneamente all'actinomicina D, la stimolazione dell'RMR da parte di T3 è quasi completamente abolita, mentre quella indotta dalla T2 non presenta alcuna attenuazione. Tali dati sostengono l'idea che il meccanismo d'azione della T2 sia indipendente dalla trascrizione genica nucleare e, quindi, confermano l'ipotesi che tale diiodotironina agisca direttamente a livello mitocondriale attraverso un effetto a breve termine indipendente dalla sintesi proteica (fig. 9).

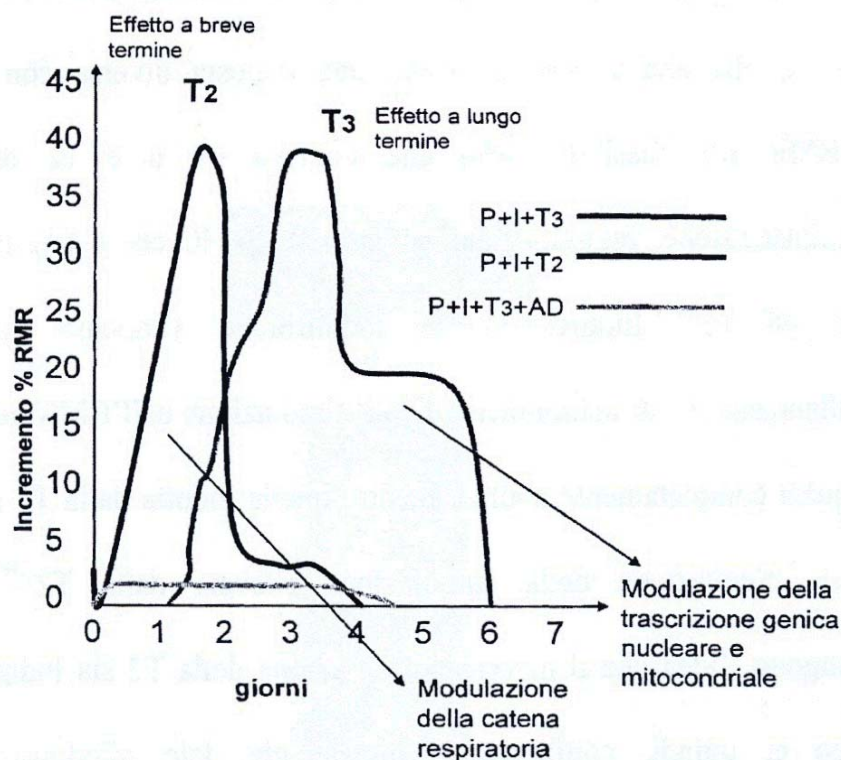


Figura 9: descrizione generale dei meccanismi proposti per gli effetti di T3 e T2 sull'RMR. Sono stati misurati gli effetti sull'RMR di una singola iniezione di T2 o T3 in animali resi ipotiroidei in seguito al trattamento con PTU e IOPA. In queste condizioni, la T2 e la T3 incrementano l'RMR, sebbene 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 bloccato dalla simultanea somministrazione di actinomicina D. Al contrario, la 3,5-T2 stimola l'RMR in modo rapido: il suo massimo effetto si rileva già dopo 1 giorno ed è insensibile all'actinomicina D. (Moreno e coll., 1997)

La capacità eccito-metabolica della T2, che si manifesta rapidamente indipendentemente dalla trascrizione, ha suggerito che essa potesse essere coinvolta in situazioni in cui è richiesta una rapida produzione di calore, come, ad esempio, l'esposizione al freddo. In effetti, sia T3 sia T2 migliorano la tolleranza al freddo, ma attraverso differenti meccanismi (Lanni e coll., 1998).

Altri studi relativi all'effetto metabolico esercitato *in vivo* dalla T2 confermano che la somministrazione cronica di T3 o di T2 a ratti ipotiroidei ripristina il valore della spesa energetica caratteristico degli animali eutiroidei e che la T2 è in grado di stimolare significativamente l'utilizzo degli acidi grassi come substrati per le ossidazioni cellulari (*Cimmino e coll 1996*).

Nonostante gli effetti *in vivo* della T2 su animali ipotiroidei siano chiari e riproducibili, la somministrazione della stessa a ratti eutiroidei non provoca cambiamenti significativi nell'RMR (*Moreno e coll.,2001*). Più fenomeni potrebbero essere alla base del mancato effetto della 3,5-T2 negli animali eutiroidei:

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

In effetti, Moreno e collaboratori (*2001*) hanno evidenziato che parte degli effetti generalmente attribuiti alla T3, somministrata a ratti eutiroidei, è in realtà, dovuta alla neo-formata T2. Tali autori hanno esaminato le variazioni nell'RMR osservate in seguito a somministrazione di T3 a ratti eutiroidei (ossia animali in cui è possibile la conversione della T3 a T2), e le differenze osservate sono state, poi, comparate con quelle ottenute in seguito ad iniezione acuta della stessa iodotironina in ratti resi ipotiroidei con le deiodinasi bloccate. Al contempo, gli autori hanno determinato i livelli sierici ed epatici della T2. I risultati hanno

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

La somministrazione di T3 e di actinomicina D ad animali ipotiroidei con le deiodinasi bloccate conferma la completa perdita dell'effetto della T3 già osservata in precedenza dagli stessi autori; in più, in ratti eutiroidei, l'inibizione acuta delle deiodinasi, ad un tempo di 4 ore prima della somministrazione della T3, risulta in una riduzione della parte precoce dell'effetto della T3 (che è anche indipendente dall'actinomicina D), indicando che la deiodinazione della T3 è una tappa metabolica necessaria per produrre il suo effetto.

Non è, pertanto, un caso che il massimo incremento nell'RMR, che risulta essere actinomicina D insensibile, coincide con il massimo della concentrazione epatica di T2, fenomeno che si verifica circa 25 ore dopo l'iniezione di T3 a ratti eutiroidei (fig. 10).

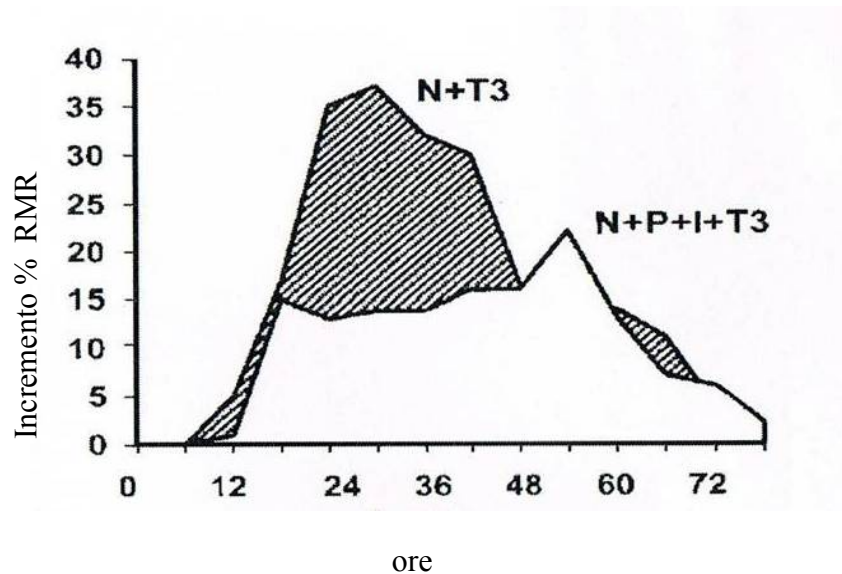


Figura 10: Effetti di T3 sull'RMR in ratti eutiroidi (N) e in ratti resi ipotiroidi in seguito al trattamento con PTU e IOPA (P+I). (Moreno e coll., 2001)

Questi risultati indicano che parte dell'iniziale cambiamento nell'RMR che si verifica dopo somministrazione di T3 in ratti eutiroidi è dovuta alla sua conversione in T2, il cui effetto è, invece, indipendente dall'actinomicina D, ed, inoltre, confermano che la T3 è il precursore, *in vivo*, della T2.

IV. Importanza della 3,5-T2 nel ridurre l'adiposità nei ratti

La capacità della T2 di incrementare il metabolismo di riposo dell'animale in toto (Lanni 1996, Moreno 1997) e l'ossidazione dei grassi (Cimmino e coll, 1996), ha suggerito che essa potesse prevenire l'insorgenza dell'adiposità indotta da una dieta iperlipidica.

Infatti più ricerche al riguardo, suggeriscono che la somministrazione della T2 a ratti che ricevono una dieta iperlipidica (HFD) è in grado di ridurre l'adiposità ed

il peso corporeo, senza indurre cambiamenti nei livelli sierici di T3 e T4, alterazioni della frequenza cardiaca e riduzione della massa magra (*Lanni e coll., 2005*). I ratti che ricevono contemporaneamente alla dieta iperlipidica la T2 (HFD+T2), quando paragonati a ratti che ricevono solo una dieta iperlipidica, assumono una maggiore quantità di cibo (il 6% in più) e mostrano un guadagno di peso corporeo minore (di circa il 13%) (i loro pesi corporei non sono diversi da quelli dei ratti normali nutriti con una dieta standard). Inoltre, i ratti HFD+T2 presentano circa il 50% di massa grassa in meno, mentre la loro massa magra non risulta variata e mostrano una completa scomparsa della steatosi epatica caratteristicamente indotta dalla dieta iperlipidica (*Lanni e coll., 2005; Mollica e coll., 2009*) (fig. 11).

L'effetto anti-steatosico della T2 sui fegati di ratti HFD è accompagnato da un incremento della velocità di ossidazione degli acidi grassi e da una riduzione dei livelli sierici di trigliceridi e colesterolo (*Lanni e coll., 2005 de Lange e coll., 2011*)

..La T2, inoltre, determina un'inefficienza nella trasduzione energetica mitocondriale, infatti quando somministrata ad animali sottoposti a dieta iperlipidica, determina un incremento del flusso dei protoni dallo spazio intermembrana alla matrice mitocondriale, un processo che comporta la dispersione dell'energia contenuta nel gradiente elettrochimico protonico sotto forma di calore, senza che venga sintetizzata ATP (*Lanni e coll., 2005; Mollica e coll., 2009*) .

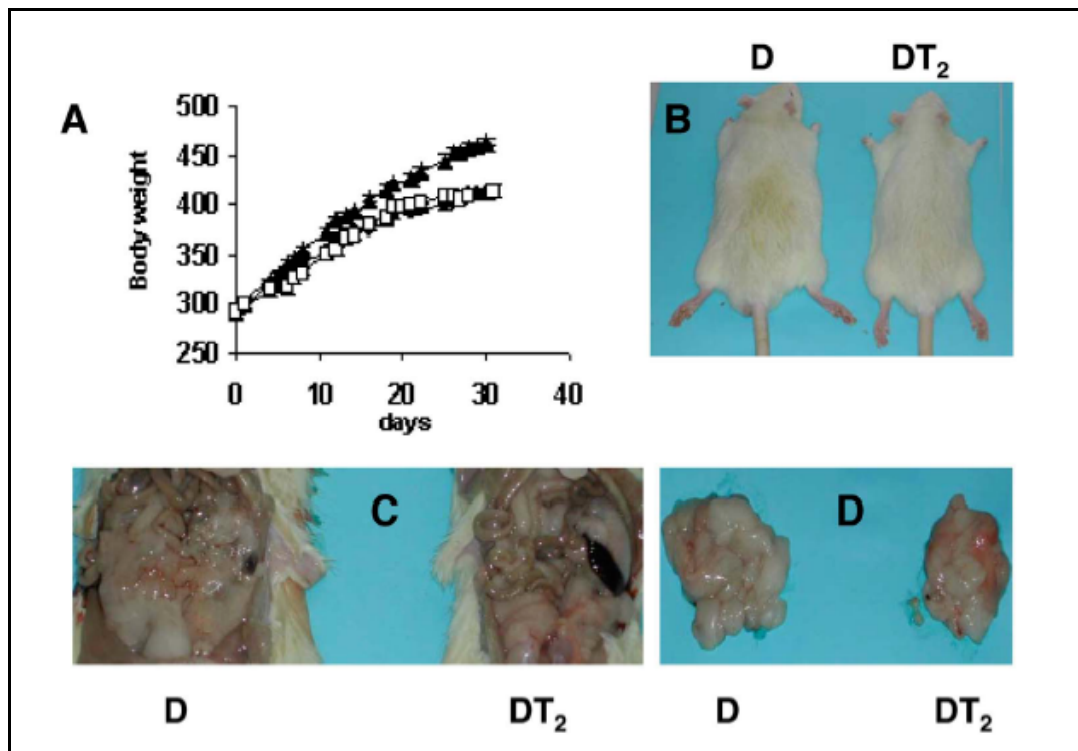


Figura 11 : Peso corporeo e tessuto adiposo dei ratti sottoposti a dieta iperlipidica (HFD) e dei ratti sottoposti a dieta iperlipidica + T2 (HFD+T2).
 A) Misure giornaliere del peso corporeo di ratti normali (quadrato vuoto), di ratti HFD (triangolo pieno) e di ratti HFD+T2 (cerchio pieno); i dati sono la media \pm ES di 12 ratti.
 B) Visione dorsale di HFD e HFD+T2.
 C) Visione addominale dei ratti che permette di osservare il grasso viscerale.
 D) Grasso viscerale isolato dai ratti HFD ($19.3 \pm 2.97g$) e dai ratti HFD+T2 ($15.3 \pm 2.97g$). (Lanni e coll., 2005)

Infine recenti ricerche hanno dimostrato che la somministrazione della T2 a ratti che ricevono una dieta iperlipidica (HFD) è in grado, non solo di stimolare l'ossidazione degli acidi grassi a livello epatico, impedendone il loro accumulo sotto forma di trigliceridi nei tessuti magri, ma è in grado anche di prevenire l'insulino-resistenza (de Lange 2011, Moreno 2011). Tale effetti sono dovuti all'attivazione da parte della

T2 , di una sirtuina epatica (SIRT1), che a sua volta attiva una cascata di eventi che comportano una upregulation dei geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale ed una downregulation dei geni coinvolti nella gluconeogenesi epatica. SIRT sembra mediare gli effetti della T2 sull'ossidazione degli acidi grassi, infatti il suo effetto stimolatorio viene annullato quando somministrata a ratti in cui l'attività di SIRT era bloccata da EX-525, un suo noto inibitore. L'attivazione di SIRT sembra essere dovuta ad una interazione diretta tra la proteina e la T2 (*de Lange e coll 2011*).

CAPITOLO 3: Regolazione dell'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico: coinvolgimento della proteina chinasi attivata da AMP (AMPK) e del trasportatore FAT/CD36.

L'ossidazione degli acidi grassi a livello muscolare ha molti siti di regolazione:

- i) Lipolisi e rilascio di LCFA dal tessuto adiposo
- ii) Distribuzione degli LCFA al muscolo scheletrico
- iii) Trasporto attraverso l'endotelio vascolare e attraverso la membrana plasmatica delle cellule muscolari
- iv) Lipolisi dei trigliceridi intratissutali
- v) Attivazione degli LCFA ad LCFACoA e trasporto degli stessi nel mitocondrio
- vi) Completa ossidazione degli LCFACoA nel mitocondrio

Dei processi elencati i primi due non dipendono dal muscolo scheletrico in sé, mentre i restanti si verificano a livello dei miociti e sono influenzati dallo stato nutrizionale, dall'attività fisica e dagli ormoni.

AMPK e suo ruolo nella regolazione del metabolismo lipidico del muscolo scheletrico.

La AMPK è una proteina della famiglia della serina-treonina chinasi, considerata un sensore energetico, in quanto la sua attivazione è favorita da condizioni che comportano deplezione energetica e che inducono un incremento del rapporto

AMP/ATP. La proteina chinasi attivata dall'AMP è un complesso trimerico composto da una parte catalitica, la subunità α ed una parte regolatoria, formata da due subunità, β e γ . Questa proteina è altamente conservata in tutti gli organismi: dal più semplice come il lievito al più complesso come l'uomo. La conservazione di questa struttura suggerisce che la formazione del complesso di tre subunità distinte sia un requisito essenziale per il funzionamento della chinasi. Le subunità α e β sono codificate rispettivamente da due geni, mentre la subunità γ è codificata da tre geni.

Di tutte queste subunità ci sono diverse isoforme ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) e tale varietà fornisce dodici possibili combinazioni dell'assemblaggio dell'eterotrimerico (*Hardie e coll., 2005*). Il complesso che predomina in molte cellule è quello $\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$, mentre nel muscolo scheletrico sono presenti tutte le isoforme, inclusa la più rara: la subunità $\gamma 3$.

La subunità α esiste in due isoforme molto simili tra di loro: $\alpha 1$ e $\alpha 2$. La subunità $\alpha 1$ è ampiamente espressa nel cervello, nel cuore, nel fegato, nel rene, polmoni e milza; mentre la subunità $\alpha 2$ è espressa solo nel muscolo scheletrico e, nel fegato e nel rene (*Stapleton D e coll., 1996*). All'interno della cellula le due isoforme sono differenzialmente compartimentalizzate, infatti la subunità $\alpha 1$ è ampiamente distribuita a livello citoplasmatico e regola le vie di trasduzione del segnale, mentre la subunità $\alpha 2$ è espressa a livello nucleare ciò permette di regolare la trascrizione e l'espressione genica.

Entrambe le isoforme contengono (Fig 12):

-un dominio catalitico ,altamente conservato all'estremità N-terminale, che permette, quando fosforilato su un residuo di treonina in posizione 172 l'attivazione di AMPK (*Hawley e coll. 1996*).

- una regione C-terminale (SBD) che è coinvolta, invece, nel legame con le subunità regolatorie β e γ (*Crute e coll. 1998*).

-una sequenza autoinibitoria (AIS).Una mutazione puntiforme di questa sequenza determina un'attivazione costitutiva di AMPK.

Anche **la subunità β** esiste in due isoforme molto simili tra : β_1 e β_2 . In particolare la subunità β_1 ha la stessa distribuzione della subunità α_1 , mentre la subunità β_2 è espressa solo nel muscolo scheletrico e in misura minore nel cuore (*Chen, Z e coll.,1999*)La sub unità β ha due domini principali : il dominio di legame ai carboidrati (CBM); una regione C-terminale, mediante la quale si lega al restante complesso (*Hudson e coll. 2003; Polekhina e coll. 2003*). Il dominio CBM può interagire con il glicogeno permettendo alla glicogeno sintetasi di interagire con AMPK attraverso un meccanismo però ancora sconosciuto (*Hudson e coll. 2003*).

La subunità γ è la subunità principale, in quanto è la sola capace di percepire i cambiamenti dei livelli di AMP/ATP all'interno della cellula e poter così attivare il complesso enzimatico AMPK . La subunità γ esiste in tre isoforme differenti: γ_1 , γ_2 , γ_3 . L'isoforma γ_1 è la più piccola, costa infatti di solo 331 residui, ma è espressa in tutti i tessuti, mentre l'isoforma γ_2 è espressa solo nel muscolo scheletrico. L'isoforma γ_3 , invece è la più grande contiene 569 residui ed è espressa nel cuore,

nel cervello e nella placenta.(*Mahlapuu M. e coll.,2004*). Tutte le isoforme presentano un dominio C-terminale altamente conservato mentre il dominio N-terminale è molto variabile nelle varie isoforme sia in sequenza che in lunghezza .La regione N-terminale presenta quattro domini identici ripetuti in tandem detti CBS (cristationina –beta-sintetasi) o domini Bateman. (Bateman A. 1997)

Ciascuno di questi domini lega una molecola di AMP o ATP in modo mutuamente esclusivo(*Kahn e coll 2005*);(fig 12)

E' proprio il legame deell'AMP ai domini Bateman che promuove l'attivazione allosterica della AMPK (*Hardie e coll;2003*). Tutti questi meccanismi assicurano una risposta estremamente sensibile ad ogni piccolo aumento di AMP. Poiché l'attivazione è antagonizzata da alte concentrazioni di ATP, il sistema risponde non semplicemente ad un aumento dell'AMP ma all'aumento del rapporto AMP/ATP all'interno della cellula.

La AMPK può essere attivata da uno stress metabolico che può essere sia fisiologico come la contrazione muscolare, sia patologico, come ad esempio ipossia, ischemia e stress iperosmotici .In entrambi i casi si assiste comunque ad un aumento della concentrazione di AMP..(*Toyoda e coll.,2006; Marsin e coll.,2000*). La stessa attivazione di AMPK viene determinata anche in seguito ad alterazioni a carico dei processi coinvolti nella fosforilazione ossidativa mitocondriale. Infatti, un incremento della fosforilazione di AMPK è stato riscontrato in seguito ad inibizione dei complessi respiratori del mitocondrio o dell'ATP sintetasi.

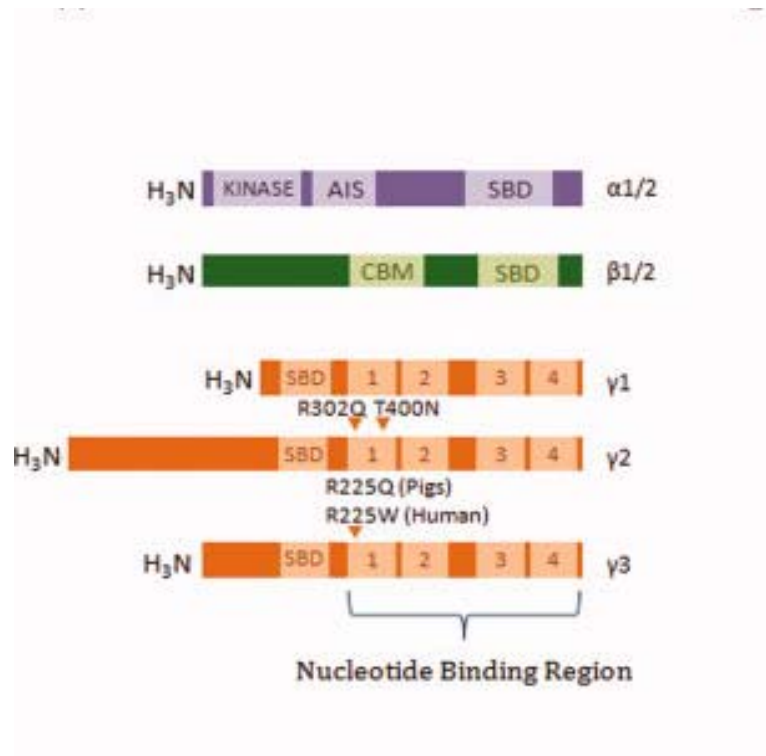


Figura 12 struttura di AMPK

La regolazione del complesso AMPK (fig 13) ricorre a differenti meccanismi:

-Attivazione allosterica da parte di AMP

-Fosforilazione del residuo Treonina-172 (Thr-172) da parte della chinasi LKB1;

Chinasi 1 attivata dai fattori di crescita trasformanti $-\beta$ (Tak1); Chinasi Ca^{2+} /calmodulina dipendente (CaMKK), che interagiscono direttamente con la subunità α (Hawley S. e coll., 1996).

-Attivazione da parte piccole molecole attivatrici AICAR/ZMP AMP interagiscono direttamente con la subunità γ

- Attivatori indiretti: metformina, dinitrofenolo e rotenone che agiscono incrementando il rapporto AMP:ATP
- Inattivazione per de-fosforilazione operata da specifiche proteine fosfatasi
- Inattivazione da parte del glicogeno, attraverso il legame con la subunità β .

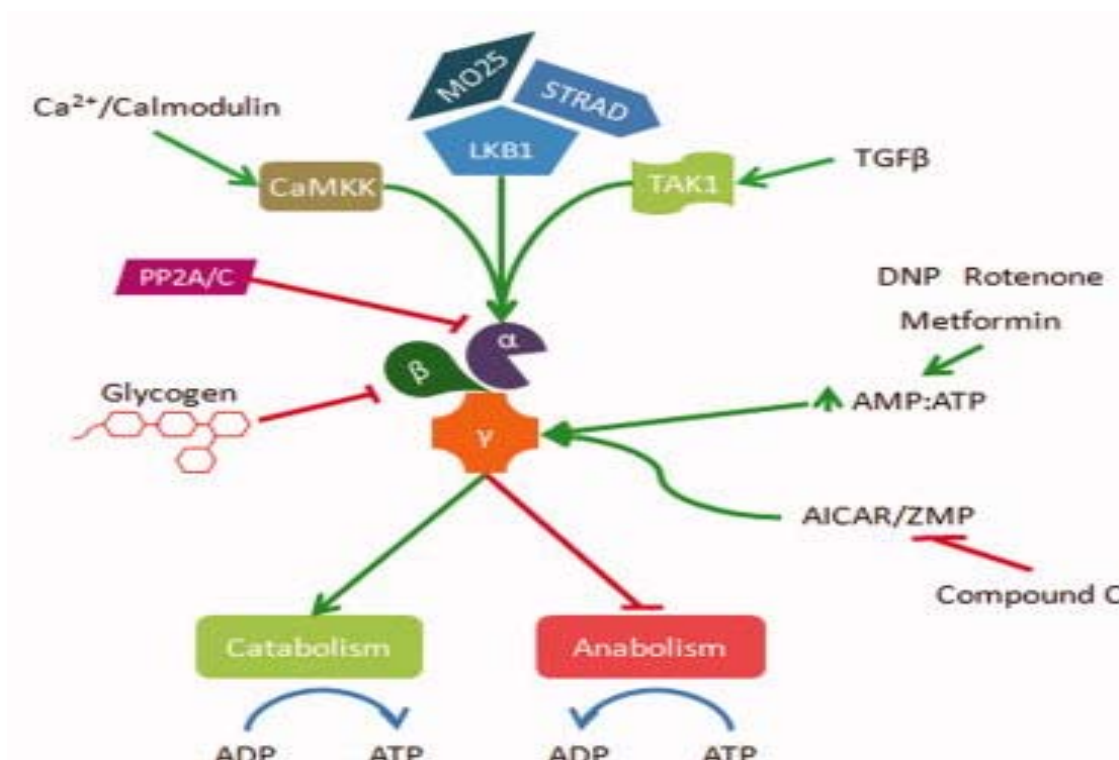


Figura 13: Regolazione di AMPK(Steinberg, G. R. and Kemp, B. E. 2009)

Sono state identificate tre chinasi i cui domini sembrano strettamente correlati a LKB1 e all'isoforma β della CAMKK (*Howley e coll. 2003*);

LKB1 è un complesso ubiquitario, con due subunità, STRAD e MO25 che, esistono entrambe in due isoforme (α e β) e sono codificate da due distinti geni (

Howeley e coll. 1996). Ad LKB1 è stato attribuito il ruolo di oncosoppressore, in quanto si è visto che il suo gene risultava mutato in cellule tumorali (*Giardiello e coll. 2000*).

LKB1 induce fosforilazione del residuo di Thr-172 presente sulla subunità α , in seguito ad un aumento dei livelli di AMP. L'attivazione di LKB1 da parte dell'AMP non è un processo diretto; in effetti il nucleotide lega AMPK e la rende un miglior substrato per LKB1 che la fosforila in Thr-172 e quindi la attiva. Si è osservato, tuttavia, che in cellule prive o difettate di LKB1, come le cellule tumorali, avviene comunque l'attivazione della chinasi AMPK. Tale effetto coincide con un aumento di calcio intracellulare che porta all'attivazione della chinasi CAMKK. La CAMKK è altamente espressa nel sistema nervoso centrale, nel testicolo, nel timo e nelle cellule T, mentre in altri tessuti, come muscolo scheletrico e fegato, i suoi livelli sono molto bassi (*Howley e coll. 2005; Hurley e coll. 2005; Woods e coll. 2005*). Il riconoscimento dei molteplici bersagli da parte di AMPK, avviene grazie alla presenza di residui idrofobici e basici, che circondano il residuo di tirosina, destinato alla fosforilazione (*Weekes e coll. 1993*).

La AMPK può essere attivata da uno stress metabolico che può essere sia fisiologico, come la contrazione muscolare, sia patologico come l'ipossia e l'ischemia. In entrambi i casi si assiste comunque ad una diminuzione nella produzione di ATP e quindi ad un aumento della concentrazione di AMP.

L'attivazione di AMPK, dovuta a questa condizione di deplezione energetica ,permetterà di poter ripristinare i livelli di ATP attivando processi catabolici quali ad esempio il metabolismo dei carboidrati e degli acidi grassi.

fosfato (G6P) attraverso l'azione dell' esochinasi.

Un accumulo di G6P può attivare GS, andando a prevalere sull'inibizione esercitata dalla fosforilazione operata dalla stessa AMPK. Pertanto, l'attivazione acuta o moderata di AMPK esaurisce glicogeno attraverso la sua azione sul GS, ma un'attivazione cronica può portare ad accumulo di glicogeno accelerato dalla aumento dei livelli di G6P all'interno della cellula. (*Aschenbach e coll., 2002*).

AMPK sembra, svolgere un ruolo importante , anche nell'ossidazione degli acidi grassi, incrementando l'up-take di FFA nei mitocondri del muscolo scheletrico.

La proteina chinasi dipendente dall'AMP (AMPK) è in grado di incrementare l'uptake di acidi grassi nei mitocondri inibendo l'enzima acetil-CoA carbossilasi (ACC), tramite la fosforilazione reversibile del suo residuo di serina-79, determinando una riduzione dei livelli intracellulari di malonil-CoA e, di conseguenza, la mancata inibizione di CPT 1, che potrà così garantire l'importo degli acidi grassi attivati (*Winder e coll., 1996; Hardie e coll., 2006; Lim e coll., 2010*). Alcuni studi suggeriscono che AMPK possa ridurre i livelli di malonil-CoA andando anche a fosforilare e ad attivare l'enzima malonil-CoA decarbossilasi (MCD) (*Saha e coll., 2000; Park e coll., 2002*) (fig1 14).

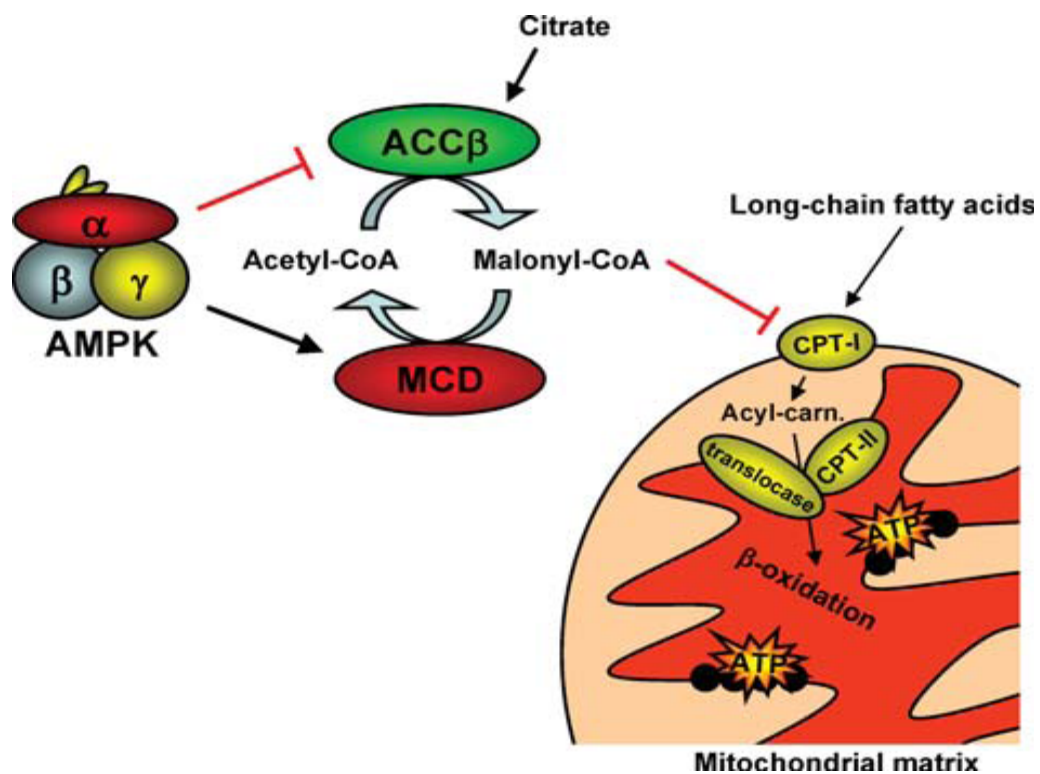


Figura 14: La produzione di malonil-CoA è ridotta dall'inibizione dell'acetyl CoA carboxilasi β (ACC β) e dall'attivazione della malonil-CoA decarbossilasi (MCD). La riduzione dei livelli di malonil-CoA attiva CPT1, che aumenta l'uptake di acidi grassi e la loro ossidazione.

Tra gli altri fattori che sono in grado di diminuire la concentrazione di Malonil-CoA, ricordiamo: l'esercizio fisico, l'AICAR (analogo dell'AMPK), e anche fattori ormonali tra i quali leptina, adiponectina, e ormoni tiroidei.

Ruolo di FAT/CD36 nel metabolismo lipidico del muscolo scheletrico

Per molto tempo, si è ritenuto che il trasporto degli acidi grassi a lunga catena, attraverso la membrana plasmatica avvenisse per semplice diffusione, in quanto il movimento flip-flop era apparso troppo veloce per coinvolgere proteine regolatrici (Noy e coll 1986). Successivamente sono state identificate, a livello della membrana, proteine coinvolte nell'importo degli LCFA. Ciò quindi ha suggerito che l'utilizzo degli acidi grassi a lunga catena non esterificati da parte del muscolo scheletrico, nonostante dipendesse dai livelli sierici di LCFA è regolato a livello tissutale anche da proteine di membrana. Le proteine coinvolte in tale processo sono:

-*FABpm* localizzata esternamente alla membrana plasmatica

-*FATP1-6*, una famiglia di trasporto di circa 63 kDa

-*FAT/CD36*, una traslocasi degli acidi grassi altamente glicosilata, presente sulla superficie di molte cellule animali.

FAT/CD36, appartiene alla classe B della famiglia dei recettori *scavenger*, essa infatti lega molti ligandi tra cui trombospodina 1, fosfolipidi anionici ed gli LCFA. E' costituita da 472aa; la sua elevata glicosilazione fa sì che il suo peso molecolare da 53 diventi di 88kDa.. *FAT/CD36* è costituita da α -eliche transmembrana che si proiettano all'interno della cellula dove, si affacciano le estremità C e N-terminali. In assenza di ligando *FAT/CD36* è in forma monomerica, mentre li legame con il ligando ne permette la sua dimerizzazione e quindi la sua attivazione.

Un ruolo chiave di *FAT/CD36* nel metabolismo lipidico è dimostrato dall'evidenza che, topi trasgenici che ipr-esprimono *FAT/CD36* a livello muscolare, in seguito a

contrazione muscolare, mostrano una incrementata capacità di importare e di ossidare acidi grassi a lunga catena, riducendo così i livelli di trigliceridi e degli acidi grassi liberi nel siero, ed aumentando glucosio ed insulina nel plasma. (*Ibrahimi A. e coll.,1999.*) Il ruolo di FAT/CD36 nel modulare il metabolismo degli acidi grassi non sembra essere ristretto all'importo degli LCFA attraverso la membrana plasmatica. E' stato, infatti,dimostrato attraverso la microscopia confocale a immunofluorescenza,che , in seguito all'esercizio fisico, si ha una rapida traslocazione di FAT/CD36 dal compartimento endosomale verso la membrana e verso i mitocondri, dove la proteina modulerebbe l'ossidazione degli LCFA (*Holloway 2008*).Esperimenti condotti su topi knockout per FAT/CD36 , hanno rilevato una ridotta velocità di ossidazione degli FFA, confermando quindi il ruolo cruciale di FAT/CD36 nell'ossidazione degli LCFA .Tradizionalmente, si riteneva che CPT1 fosse la tappa limitante dell'importo mitocondriale degli LCFA.

Tuttavia recenti studi che in condizioni di elevata richiesta energetica , il solo incremento dell'attività di CPT1 non è in grado di giustificare l'elevato up-take mitocondriale di acidi grassi , e ciò quindi ha suggerito il coinvolgimento di FAT/CD36 (*Campbell e coll. 2004*)

Studi di immunoprecipitazione hanno mostrato che tali proteine immunoprecipitano, quindi sembra che ,FAT/CD36 e CPT siano funzionalmente associati (*Campbell e coll 2004*) .

Studi focalizzati ad identificare l'interazione tra FAT/CD36 e CPT si sono avvalsi dell'uso di un inibitore specifico di FAT/CD36, il sulfo-N-succimidil- oleato (SSO).

Nei mitocondri isolati da muscolo di ratto , in presenza di SSO si è riscontrata una inibizione dell'attività di CPT e dell'ossidazione degli acidi grassi (*Campbell e coll 2004*). Ciò ha suggerito che FAT/CD36 agisce a monte di CPT1. D'altro canto gli stessi studi effettuati sui mitocondri di muscolo umano hanno dato dati differenti; ciò sembra essere dovuto ad una specializzazione specie-specifiche (*Bezaire e coll 2006*). Recenti studi condotti da Smith e coll (*2011*) su topi knockout per FAT/CD36, hanno invece dimostrato che FAT/CD36 non sembra interagire solo con la carnitina palmitoiltrasferasi-I come originalmente proposto. Infatti, nei mitocondri isolati da topi knockout si riscontra una ridotta capacità mitocondriale di ossidare palmitato rispetto ai topi wild-type (-34%) ,mentre la capacità di ossidare palmitoil-CoA rimaneva invariata nei due gruppi sperimentali. Ciò ha suggerito che FAT/CD36 quando localizzato a livello della membrana mitocondriale esterna, leggerebbe gli FFA e gli acil-CoA e ne aumenterebbe la disponibilità rispettivamente per l'Acil-CoA sintetasi e per CPT1 (*Smith e coll 2011*).

La traslocazione della stessa FAT/CD36 dal compartimento endosomale verso i mitocondri sembra essere indotto dall'attivazione di AMPK. Infatti, inibitori della fosforilazione ossidativa mitocondriale, la contrazione muscolare, e AICAR inducono rapidamente la traslocazione di FAT/CD36 verso i mitocondri. E' da ricordare che, come già descritto precedentemente, l'attivazione di AMPK comporta anche l'attivazione di CPT attraverso la via di segnalazione AMPK-ACC-malonil-CoA. Ne consegue che l'attivazione di tale chinasi porta ad una rapida modulazione del metabolismo degli acidi grassi nel muscolo scheletrico attivando l'importo degli

LCFA nelle cellule, attraverso la traslocazione di FAT/CD36 sulla membrana e la loro successiva ossidazione a livello mitocondriale ,attraverso la traslocazione di FAT/CD36 verso i mitocondri e l'attivazione di CPT1. Sembra che anche altre chinasi, come AKT e PKC siano coinvolte nella traslocazione di FAT/CD36 dal compartimento endosomale verso la membrana e i mitocondri (*Stefanyk LE e coll.,2011; Luiken JJ, e coll.,2004*).

SCOPO DELLA TESI

Nella società moderna è sempre più frequente l'insorgenza di disturbi del metabolismo conseguenti ad una prolungata alimentazione ipercalorica e/o assenza di esercizio fisico. La crescente prevalenza dell'obesità è associata ad un drammatico incremento di fattori di rischio per le malattie cardiovascolari e il diabete. Per alcuni pazienti una variazione dello stile di vita, quale una dieta ipocalorica e l'esercizio fisico, sono sufficienti per contrastare l'obesità. D'altro canto, in altri soggetti tali interventi non sono sufficiente ed è necessaria, quindi una farmacoterapia. L'utilizzo di farmaci in grado di incrementare la velocità a riposo e/o la termogenesi, evitando alcuni di quei problemi associati all'uso di sostanze anoressizzanti, è utile affinché si verifichi una riduzione di peso nei pazienti obesi. Molti dei farmaci utilizzati per contrastare l'obesità hanno un effetto anoressizzante in quanto, agendo sui centri della fame e della sazietà ipotalamici, riducono l'assunzione di cibo. La loro azione a livello del sistema nervoso centrale, tuttavia, può creare una grave dipendenza fisica e psicologica, nonché gravi effetti collaterali soprattutto a carico del sistema cardio-circolatorio.

L'uso di molecole in grado di indurre una perdita di peso incrementando l'ossidazione dei grassi, ha il vantaggio di promuovere la perdita di massa grassa piuttosto che di massa magra e favorire il miglioramento di patologie associate ad un accumulo ectopico di grassi, quale ad esempio l'insulino-resistenza.

In passato gli ormoni tiroidei, T3 e T4, grazie alla loro capacità di incrementare la termogenesi e il metabolismo di riposo, sono stati utilizzati come farmaci antiobesità.

Tuttavia, insieme alla perdita di peso (che in effetti era il risultato di una riduzione sia di massa magra che di massa grassa), la somministrazione di T2 induceva anche una pletera di effetti indesiderati, quali ad esempio cardiovasculopatie, miopatie, accelerazione dell'osteoporosi. Attualmente, molti studi sono rivolti ad individuare analoghi strutturali dell'ormone tiroideo, che ne preservino l'efficacia anti-obesità ed il "lipid-lowering", e che, al contempo, non determinino l'insorgenza di uno stato tireotossico. Lo sviluppo di tali analoghi ha rappresentato e rappresenta tutt'ora un importante target terapeutico.

E' proprio in questo contesto che si collocano gli studi relativi alla 3,5-diiodo-L-tironina (T2) un metabolita della T2, effettuati dal gruppo di ricerca con cui ho collaborato per lo svolgimento del dottorato di ricerca e che ne hanno evidenziato il ruolo nella regolazione del metabolismo energetico e delle funzioni bioenergetiche cellulari. Infatti, quando somministrata a ratti ipotiroidei, la T2 ne incrementa il metabolismo di riposo (Lanni e coll 1996, Moreno e coll 1997); inoltre, quando somministrata cronicamente a ratti alimentati con una dieta iperlipidica, la T2 impedisce l'aumento del peso corporeo, l'accumulo di adiposità viscerale, l'insorgenza della steatosi epatica (Lanni e coll 2005, Mollica e coll 2010), l'ipertrigliceridemia e l'ipercolesterolemia (Lanni e coll 2005, de Lange e coll 2011) e l'insulino resistenza (Moreno e coll 2011, de Lange e coll 2011).

Da un punto di vista clinico è importante sottolineare che gli effetti descritti non sono associati a tireotossicosi e ad alterazioni a carico del sistema cardiocircolatorio o

dell'asse ipotalamo ipofisi tiroide (Lanni e coll 2005, de Lange 2011). Inoltre, i primi studi effettuati sull'uomo confermano i risultati ottenuti sul ratto.

Da quanto detto, la T2 ha le caratteristiche per essere considerata un potenziale farmaco per la cura dell'obesità e delle patologie ad esse associate, conseguenti ad un accumulo ectopico di grassi. E' quindi di notevole importanza approfondire i meccanismi molecolari con cui la T2 esercita i suoi effetti a livello dei tessuti metabolicamente attivi, in primis nel muscolo scheletrico dato il ruolo chiave svolto da tale tessuto nell'omeostasi metabolica, glucidica e lipidica.

Durante il mio dottorato di ricerca ho appunto approfondito il ruolo della T2 nell'influenzare il metabolismo lipidico del muscolo scheletrico di animali ipotiroidei ed i meccanismi che sottendono gli effetti molecolari di tale iodotironina.

Ho scelto quindi di analizzare sia effetti cronici che acuti della T2 su animali trattati simultaneamente con propiltiouracile (PTU) ed acido iopanoico (IOPA). Il PTU inibisce la produzione ghiandolare di ormone tiroideo e l'attività della deiodinasi di tipo I mentre l'acido iopanoico inibisce l'attività di tutte le deiodinasi note. E' stato scelto di somministrare T2 a tale modello animale in quanto esso presenta dei bassi livelli serici e tissutali di T2 (Moreno e coll. 2002). Infatti, in tali animali, sia la via che porta alla sintesi dei precursori della T2 quali T4 e T3, sia la via che porta alla genesi di T2 a partire dagli stessi precursori, è inibita.

Inoltre come muscolo scheletrico si è scelto il gastrocnemio; tale scelta è da attribuirsi al fatto che tale muscolo è costituito da fibre miste, ossidative e glicolitiche, e facilmente si adatta all'utilizzo di substrati alterativi.

A tale scopo ho valutato se la T2 fosse in grado di influenzare:

-la mobilizzazione degli acidi grassi dai depositi lipidici. e la loro utilizzazione tissutale.

- l'attivazione dell'importo e l'ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri,

-l'attivazione di processi termogenici che rendono inefficiente l'ossidazione degli acidi grassi.

-la redistribuzione cellulare di FAT/CD36, proteina chiave nell'importo degli acidi grassi nel muscolo ma che allo stesso tempo svolge un ruolo chiave nell'ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale (Holloway 2008).

-l'attivazione della chinasi AMPK , dato il suo ruolo chiave nel dirigere la partizione lipidica verso l'ossidazione. (Winder e coll., 1996; Hardie e coll., 2006; Lim e coll., 2010).

Infine ho ritenuto interessante valutare se i rapidi adattamenti del metabolismo lipidico del muscolo gastrocnemio, osservati in seguito a somministrazione della T2 potessero essere o meno il risultato dell'attivazione di AMPK.

PROCEDURE SPERIMENTALI

I. Animali

Gli esperimenti sono stati compiuti utilizzando ratti maschi appartenenti al ceppo Wistar (Harlan Italy) di peso corporeo di circa 250-300g, e topi knockout ed i rispettivi wild-type per UCP3 gentilmente forniti dal prof. Michael N. Sack (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Gli animali sono stati alimentati con mangime commerciale (Charles River, Lecco, Italia) ed acqua *ad libitum* e stabulati a 28 °C con un ciclo di luce artificiale di 12 ore.

Per i nostri esperimenti, i ratti sono stati divisi in 5 differenti gruppi:

1. ratti resi ipotiroidei mediante la somministrazione giornaliera di PTU (1mg/100g di peso corporeo) e iniezione settimanale di IOPA (6mg/100g di peso corporeo) per quattro settimane (P+I);

2. ratti ipotiroidei ai quali è stata somministrata la 3,5-T2 alla dose di 25µg/100g di peso corporeo, un'ora prima del sacrificio (P+I+T2 1h);

3. ratti ipotiroidei ai quali è stata somministrata la 3,5-T2 alla dose di 25µg/100g di peso corporeo, per una settimana prima del sacrificio (P+I+T2 1w);

4. ratti ipotiroidei ai quali è stato somministrato 6-4-(2-piperidin-1-ylethoxil) fenil-3-piridin-4-ylpirazolo (1,5-a) pirimidina (Compound C) alla dose di 1mg/100g di peso corporeo, un'ora prima del sacrificio (P+I+C);

5.ratti ipotiroidei ai quali sono stati somministrati il Compound C alla dose di 1mg/100g di peso corporeo e la 3,5-T2 alla dose di 25µg/100g di peso corporeo, un'ora prima del sacrificio (P+I+T2+C).

Prima di essere sacrificati mediante decapitazione, gli animali sono stati anestetizzati tramite somministrazione intraperitoneale di cloralio idrato alla dose di 40mg/100g di peso corporeo.

Il muscolo gastrocnemio è stato rapidamente prelevato e posto in soluzione isotonica Chappel e Perry (contenente ATP 1mM, HEPES 50mM, KCl 100mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 1mM, EGTA 5mM) oppure immediatamente congelato in azoto liquido. Nel primo caso, i tessuti sono stati immediatamente utilizzati per l'isolamento dei mitocondri; nel secondo, invece, sono stati conservati per la preparazione dei lisati tissutali.

II. Determinazione dei parametri metabolici.

Il metabolismo a riposo è definito come la più bassa velocità metabolica riscontrabile nell'animale a riposo, esposto alla sua temperatura di termoneutralità, non in stato di post-assorbimento o a digiuno e non in stato di sonno.

Il valore di tale parametro è stato determinato per i ratti appartenenti ai diversi gruppi precedentemente descritti alla temperatura di 28°C e tra le ore 12.00 e le ore 16.00, intervallo orario in cui, la spesa energetica risulta essere minima e costante. Le misure sono state effettuate un'ora prima della somministrazione di T3 e a vari intervalli di tempo successivi alle iniezioni stesse, ponendo ciascun topo in una

gabbia metabolica collegata ad un rivelatore di ossigeno (O_2/CO_2 -ECO, Columbus Instruments International Corporation, USA), secondo i principi della calorimetria indiretta a circuito aperto. Il rivelatore è collegato ad un computer e dai parametri: O_2 consumato, CO_2 prodotta e peso dell'animale, sono stati calcolati il metabolismo di riposo, il quoziente respiratorio e la produzione di calore.

III. Preparazione dei mitocondri

I mitocondri essenziali per compiere le misure sono stati isolati dal muscolo scheletrico gastrocnemio. Dopo aver eliminato l'eccesso di grasso e connettivo, i tessuti sono stati tagliuzzati in una soluzione isotonica costituita da 220mM di mannitolo, 70mM di saccarosio, 20mM di Tris-HCl, 1mM di EDTA, 5mM di EGTA e 5mM di $MgCl_2$ ad un pH di 7.4 e sono stati omogeneizzati in 10 volumi della stessa soluzione utilizzando un Potter-Elvehjem. Dopo aver centrifugato gli omogenati a 500 x g per 10 minuti a 4 °C, i supernatanti risultanti sono stati recuperati e centrifugati di nuovo a 3000 x g per 10 minuti alla medesima temperatura. Dall'ultima centrifugazione, è stato ottenuto il pellet contenente i mitocondri che, dopo aver subito due lavaggi, è stato risospeso nel minimo volume. Alla fine di tutti questi passaggi, i mitocondri sono stati posti in ghiaccio ed utilizzati per compiere le misure.

III. Dosaggio proteico

Il *metodo Bio-Rad* utilizzato si basa sul seguente protocollo: si aggiungono 20mg di BSA in 10mL di acqua distillata e si misura l'assorbanza sia a 280 sia a 260nm. Si calcola poi la concentrazione assoluta di BSA utilizzando la seguente formula:

$$C \text{ (BSA) (mg/mL)} = (A_{280} * 1,55) - (A_{260} * 0,76)$$

La BSA da leggere viene posta in cuvette di quarzo. La concentrazione finale deve essere pari a 1,5mg/mL. Per il dosaggio, sono necessari 100µL del campione (previamente diluito 1:100). Di ogni misura si esegue un duplicato, in modo tale da mediare i valori. Bisogna preparare una serie di cuvette, di cui una sarà destinata al bianco che serve per la taratura dello spettrofotometro (in cui si aggiungono tutti i reagenti tranne il campione e la BSA), un paio per gli standard (in cui si aggiunge la BSA a concentrazione nota) ed, infine, quelle per i campioni. Si aggiungono poi 500µL di Soluzione A (compresa nel kit) ad ogni cuvetta e si vortexa rapidamente. Si aggiungono, quindi, 4mL di soluzione B (sempre compresa nel kit) e si vortexa subito. Si incuba per 20 minuti a temperatura ambiente e poi si procede con la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 750nm (i campioni restano stabili per un'ora in queste condizioni). Conoscendo la concentrazione iniziale della BSA, i valori dell'assorbanza ed il fattore di diluizione, si può risalire alla concentrazione proteica del campione applicando la seguente proporzione:

$$A \text{ (BSA)} : A \text{ (Campione)} = C \text{ (BSA)} : C \text{ (Campione)}$$

Da cui:

$$C (\text{Campione}) = A (\text{Campione}) * C (\text{BSA}) * \text{fattore di diluizione} / A (\text{BSA}).$$

IV. Misura della velocità di ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale

L'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi è stata misurata polarograficamente attraverso l'utilizzo dell'elettrodo di Clark alla temperatura di 30°C. Quando veniva usato palmitato come substrato, 200 microgrammi di proteine mitocondriali venivano incubati in una soluzione contenente: 80 mM di KCl, 50 mM di Hepes (pH 7), 1 mM di EGTA, 5 mM di K₂HPO₄, BSA (1%) 5.0 mM ATP, 0,5 mM ADP, 1.0 mM NAD⁺, 0.5 mM carnitine, 0.1 mM coenzyma A, 25 µM cytochrome c, and 0.5 mM malate per 5 minuti, al termine dei quali veniva aggiunto Palmitato ad una concentrazione 1,8 mM. Al consumo di ossigeno misurato in presenza di palmitato veniva sottratto quello eventualmente misurato in sua assenza.

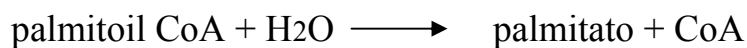
Quando veniva utilizzata palmitoil -carnitina come substrato, 200 microgrammi di proteine mitocondriali erano incubati in 500 microlitri di una soluzione contenente : 80 mM di KCl, 50 mM di Hepes (pH 7), 1 mM di EGTA, 5 mM di K₂HPO₄, 300 µM ADP BSA (1%) 2,5 mM di Malato per 3 minuti al termine dei quali veniva aggiunto 40 µM di palmitoil-carnitina. .

Quando invece veniva utilizzata Palmitoil-CoA come substrato 200 microgrammi di proteine mitocondriali erano incubati in 500 microlitri di una soluzione

contenente : 80 mM di KCl, 50 mM di Hepes (pH 7) , 1 mM di EGTA , 5 mM di K₂HPO₄, 300 μM ADP BSA (1%) 2,5 mM di Malato per 3 minuti al termine dei quali veniva aggiunto 40 μM di palmitoil-CoA..

V. Determinazione dell'attività dell'Acil-CoA tioesterasi mitocondriale di tipo I (MTE-I) e del sistema della carnitina palmitoil transferasi (CPT)

MTE-I è un enzima mitocondriale specifico per i tioesteri degli acidi grassi, a lunga catena, con attività massima per il palmitoil-CoA. Essa converte il palmitoil CoA in palmitato secondo la seguente reazione:



La sua attività è stata misurata con il metodo spettrofotometrico, che è basato sul rilascio di CoA dai tioesteri dell'acil-CoA, che, inducendo la riduzione dell'acido 5,5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB) ad acido 5-tio-2-nitrobenzoico, determina lo sviluppo del colore giallo. La reazione è stata eseguita secondo la metodica di *Alexson e Nedergaard (1988)*, incubando mitocondri trattati con triton X-100 in: Hepes 75mM pH 7.5, EDTA 10mM, BSA 10mg/ml, palmitoil-CoA 2,5mM, DTNB 3mM. Tutte le provette contenenti le soluzioni sono state incubate per almeno 3 minuti a 35°C prima di aggiungere il palmitoil-CoA. La concentrazione dei tioli rilasciati viene calcolata dal coefficiente di estinzione molare, $E_{412\text{nm}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dopo aver corretto per la reazione aspecifica

dei gruppi sulfidrilici di proteina con DTNB e per l'idrolisi non specifica del palmitoil-CoA.

La stessa incubazione sopra descritta se effettuata in presenza di carnitina (5mM) permette di valutare il rilascio di CoA dipendente sia dall'attività di MTE I sia dal sistema carnitina palmitoil transferasi. A tale scopo il rilascio di CoA è stato valutato sia in assenza che in presenza di carnitina. Sottraendo dal rilascio di CoA ottenuto in presenza di carnitina (CPT + MTE) quello ottenuto in assenza di carnitina (MTE) si ottiene l'attività del sistema CPT.

VII. Determinazione degli stati della respirazione mitocondriale.

Per avere indicazioni circa la capacità della T2 di stimolare le vie respiratorie NADH-dipendenti e FADH-dipendenti nei vari gruppi sperimentali, è stata determinata la capacità mitocondriale di ossidare, rispettivamente, piruvato + malato e succinato + rotenone. In particolare è stato determinato sia lo Stato 3 (respirazione accoppiata alla sintesi di ATP) sia lo Stato 4 della respirazione (stato in cui la produzione di ossigeno non è accoppiata alla sintesi di ATP e quindi non c'è fosforilazione di ADP ad ATP).

Le misure sono state effettuate utilizzando l'elettrodo ad ossigeno di Clark ad una temperatura di 37°C. Le proteine mitocondriali (0,5 mg) sono state incubate in 1 ml di soluzione di respirazione (KCl 80 mM, HEPES 50 mM, EGTA 1 mM, KH₂PO₄ 5 mM, MgCl₂ 2 mM; pH 7.0) ed energizzate con una quantità saturante di succinato

(5 mM) + rotenone (4 μ M) oppure piruvato (12 mM) + malato (2.5 mM) come substrato. La misura dello Stato 3 è iniziata con l'aggiunta di ADP (200 mM).

VIII. Estrazione dei lipidi dal gastrocnemio.

Per l'estrazione dei lipidi dal muscolo gastrocnemio di ratto sono stati prelevati 0,5 g di tessuto e sono stati omogeneizzati (usando un Potter-Elvehjem) con 2 ml di una soluzione costituita da Mannitolo 220 mM, Saccarosio 70 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 4 mM e $MgCl_2$ 5 mM a pH 7.4. In questo modo vengono rotte le cellule e i tessuti.

Al termine dell'omogenizzazione è stato aggiunto 1ml di una soluzione costituita da cloroformio e metanolo in rapporto 2:1. Una volta omogenizzato bene, il campione è stato posto in un cilindro ed è stata effettuata una diluizione 1:10 usando la stessa soluzione.

Dopo aver agitato manualmente ad intervalli di 10 min per un totale di 2 ore, sono stati aggiunti 0,2 volumi di NaCl allo 0.29%. Al termine dell'agitazione il campione è stato centrifugato a 2400 rpm per 21 min a 4°C, ottenendo due strati (acqua e metanolo nella parte superiore, lipidi e cloroformio nella parte inferiore) separati da un terzo strato di residui. Con una pipetta pasteur è stato eliminato lo strato superiore di acqua e metanolo ed i residui ed è stato prelevato lo strato inferiore di cloroformio e lipidi che è stato poi sottoposto ad una serie di lavaggi sotto agitazione utilizzando una soluzione detta "Upper Phase Solution" o UPS formata da: 48 parti di metanolo, 3 parti di cloroformio e 47 parti di NaCl allo 0.58% per

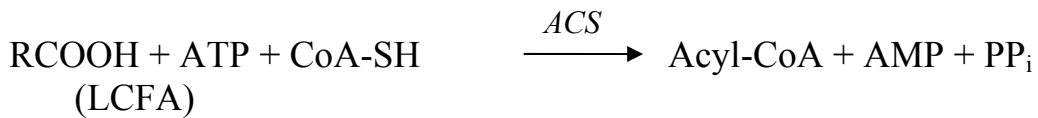
eliminare ulteriori residui rimasti. Anche in questo caso sono state ottenute due fasi: cloroformio e lipidi depositati sul fondo, UPS e residui accumulati nella parte superiore. E' stata eliminata la parte superiore e la fase contenente cloroformio e lipidi è stata posta in piccole provette di vetro ed essiccata sotto un flusso di Azoto. I campioni essiccati sono stati conservati poi, utilizzati per la determinazione degli acidi grassi liberi e dei trigliceridi tissutali.

IX. Determinazione degli LCFAs serici e tissutali.

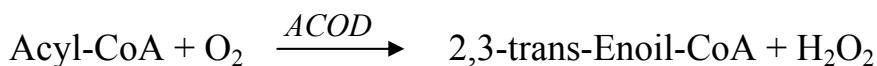
Per determinare gli acidi grassi liberi serici e tissutali, è stato utilizzato un kit della WAKO che permette di determinare gli LCFA attraverso un metodo enzimatico colorimetrico che si avvale delle seguenti soluzioni cromogene:

- **Soluzione reagente cromogeno A** contenente 65 mL di soluzione A (Fosfato buffer 50 mmol/L pH 6.9, MgCl₂ 3.0 mmol/L, surfactant e stabilizzatore), mescolato con 10 mL di soluzione cromogeno A [Acil-CoA sintetasi (ACS) 0.3 kU/L, Ascorbato ossidasi (AOD) 3.0 kU/L, Coenzima A (CoA) 0.6 g/L, Adenosina trifosfato (ATP) 5.0 mmol/L, 4-Aminoantipirina 1.5 mmol/L e sodio azide 1.4%].
- **Soluzione reagente cromogeno B** contenente 130 mL di soluzione B [3-metil-N-etil-N-(β-idrossietile)anilina (MEHA) 1.2 mmol/L, surfactant], a cui vengono aggiunti 20 mL di soluzione per il reagente cromogeno B [Acil-CoA ossidasi (ACOD) 6.6 kU/L, Perossidasi (POD) 7.5 kU/L].

Prima di procedere all'analisi si portano a temperatura ambiente le soluzioni reagenti cromogene e si proteggono dalla luce diretta. Il dosaggio si basa sulle reazioni di seguito riportate. La prima è catalizzata dall'acil-CoA sintetasi (ACS):



Successivamente l'acil-CoA prodotto diviene substrato dall'acil-CoA ossidasi (ACOD) con formazione di perossido di idrogeno (H₂O₂). Quest'ultimo viene poi utilizzato dalla perossidasi in una reazione che determina lo sviluppo di colore:



L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione degli acidi grassi liberi presenti nel campione. L'acido ascorbico viene rimosso dall'azione dell'ascorbato ossidasi e la massima assorbanza si ottiene a 550 nm.

La procedura prevede la preparazione di differenti provette contenenti il bianco, lo standard e i vari campioni. Nel bianco vengono pipettati 50 µl di una soluzione costituita da cloroformio e metanolo in rapporto 2:1, nello standard 50µl di Acido oleico (1.0 mmol/L) e nelle restanti provette 50 µl del campione da dosare. Successivamente in tutte le provette si aggiunge 1 ml di soluzione reagente cromogeno A. Si mescola bene e si incuba per 10 min a 37°C. Al termine

dell'incubazione, si aggiungono in tutte le provette 2 ml di soluzione reagente cromogeno B, si rimescola bene e si incuba nuovamente per 10 min a 37°C.

Alla fine dell'incubazione si effettua la lettura spettrofotometrica e per determinare la concentrazione dei campioni in esame si applica la seguente formula:

$$\frac{\text{Assorbanza del campione} \times \text{concentrazione dello standard}}{\text{Assorbanza dello standard}}$$

I valori ottenuti sono espressi in mmol/L.

X. Determinazione dei trigliceridi tissutali.

La concentrazione totale di trigliceridi è stata determinata con un kit della SIGMA che prevede la preparazione di due differenti soluzioni reagenti. La prima, definita "Triglyceride Reagent", è costituita da 250.000 unità/L di Lipasi, Sodio Azide 0.05%; la seconda, definita "Free Glycerol Reagent", è costituita da ATP 0.75 mM, Magnesio 3.75 mM, 4-Aminoantipirina 0.188 mM, N-Etil-N-(3-sulfopropil) m-anisidina, sodium salt 2.11 mM; 1250 unità/L di glicerolo chinasi, 2500 unità/L di glicerolo fosfato ossidasi, 2500 unità/L di perossidasi, buffer (pH 7.0 ± 0.1), Sodio Azide 0.05%.

Nel bianco si pipettano 10 µl di acqua, nello standard 10 µl di glicerolo standard (10 mg/ml) e nelle restanti provette 10 µl del campione da dosare.

In ogni provetta si pipettano 1 ml di Triglyceride Reagent e 4 ml di Free Glycerol Reagent, si mescola il contenuto delle provette capovolgendole con cautela e si incuba per 5 min alla temperatura di 37°C. Al termine dell'incubazione si legge l'assorbanza allo spettrofotometro a 540 nm e ai valori ottenuti si applica la seguente formula:

$$\frac{(\text{Assorbanza campione}) - (\text{Assorbanza bianco})}{(\text{Assorbanza standard}) - (\text{Assorbanza bianco})} \times \text{concentrazione standard}$$

XI. Determinazione del glicerolo serico.

Per la determinazione della concentrazione serica di glicerolo è stato utilizzato lo stesso kit adoperato per la determinazione livelli tissutali di trigliceridi fornito dalla SIGMA. Sono stati pipettati 10 µl di acqua nel bianco, 10 µl di glicerolo standard (10 mg/ml) nello standard e 10 µl del campione da dosare. In ogni provetta è stata aggiunta la Free Glycerol Reagent, costituita da ATP 0.75 mM, Magnesio 3.75 mM 4-Aminoantipirina 0.188 mM, N-Etil-N-(3-sulfopropil) m-anisidina, sodium salt 2.11 mM; 1250 unità/L di glicerolo chinasi, 2500 unità/L di glicerolo fosfato ossidasi, 2500 unità/L di perossidasi, buffer (pH 7.0 ± 0.1), Sodio Azide 0.05%; il tutto è stato incubato per 5 min a 37°C.

Al termine è stata letta l'assorbanza allo spettrofotometro a 540 nm. Ai valori ottenuti è stata applicata la seguente formula:

$$\frac{(\text{Assorbanza campione}) - (\text{Assorbanza bianco})}{(\text{Assorbanza standard}) - (\text{Assorbanza bianco})} \times \text{concentrazione standard}$$

XII. Determinazione dei livelli di mRNA mediante rtPCR

L'RNA totale utilizzato proviene da tre ratti di ogni gruppo. Per la sintesi del DNA è stato retro-trascritto 1 µg di RNA totale utilizzando 100 pmol di esameri random (Invitrogen Life Technologies, Groningen, Olanda), 2.0 unità Superscript di trascrittasi-inversa, 0.5 unità dell'inibitore dell'RNasi e 1 mM di deossinucleotide trifosfato (dNTPs) nel buffer della trascrittasi-inversa (HT Biotechnology, Cambridge, UK), in un volume totale aggiunto di 20µl. La reazione è stata eseguita per 1 ora a 40°C. Un quarto del miscuglio di reazione-RT è stato utilizzato direttamente per la reazioni di PCR in un volume totale di 25 µl, contenente 0.25 unità di Super Taq Polimerasi, 0.25 mM di dNTPs, un buffer PCR SuperTaq (tutto della HT Biotechnology, Cambridge, Inghilterra), 5% (v/v) di dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich Corp.) e 0.38 pmol di primers (Sigma Genosys, Cambridge, Inghilterra). Per determinare il numero ottimale di cicli sono state utilizzate amplificazioni parallele di 20, 25 e 30 cicli dello stesso cDNA. Dopo 30 cicli, è stato osservato un segnale contenuto nel range lineare. La reazione di PCR segue il seguente programma: i campioni sono stati riscaldati per 5 min a 94°C, sono sottoposti a 30 cicli consecutivi, consistenti ognuno di 1 min a 94°C, 1.5 min a 61°C e 1.5 min a 72°C. Successivamente è stata effettuata un'estensione finale di 10 min a 72°C.

I prodotti della PCR sono stati separati su gel di agarosio al 2% in presenza di bromuro di etidio. I segnali invertiti sono stati scannerizzati con l'uso di un HP

Scanjet e quantificati tramite una Bio Rad Molecular Imager FX utilizzando il software fornito (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, Stati Uniti).

XIII . Preparazione lisati di muscolo scheletrico

50 mg di tessuto ed è stato omogeneizzato in 1 ml di soluzione di lisi con un ultraturax. La soluzione di lisi era costituita da: 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mMEDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodio pirofosfato, 1mM b-glycerolofosfato, 1 mM Na₃VO₄ e le seguenti antiproteasi: 1mM di benzamidina, 4µg/ml di TPCK (N-tosil-L-fenilalanina-clorometil-chetone), 0,1mM di PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoride) , 4µg/ml di aprotinina, 1µg/ml di pepstatina, 2µg/ml di leupeptina e 5µg/ml di bestatina (tutto da Sigma Aldrich Corp), pH 7,5.

Terminata l'omogenizzazione, l'omogenato è stato centrifugato a 40000 x g per la durata di 10 minuti. Una quantità determinata del sopranatante, in cui sono presenti le proteine solubili, stata utilizzata per successivi elettroforesi su gel di poliacrilammide e Western blotting.

XIV .Isolamento delle membrane plasmatiche e dei mitocondri per la determinazione dei livelli di FAT/CD 36.

Il muscolo gastrocnemio privato del connettivo viene immerso in 20 ml della soluzione Chappel et Perry e viene omogeneizzato prima con un Potter-Elvehjem (4 colpi per minuto) in 10 ml della soluzione A costituita da: NaHCO₃ 10mM, NaN₃ 5mM, PMSF 100 µM, Saccarosio 0.25mM a pH 7.4 e successivamente con un

politron (alla massima velocità per 5 volte per 15 sec ciascuna). L'omogenato è stato centrifugato a 1300xg per 10 min a 4°C.

Il supernatante ottenuto viene prelevato e centrifugato a 3000xg per 10 min a 4°C ed il pellet ottenuto, costituito prevalentemente da mitocondri, è stato risospeso in 200 µl di soluzione RIPA (NaCl 150mM, Sodio Deossicolato 0.5%, SDS 0.1%, TRIS 50mM, Triton x100, pH 8).

I mitocondri ottenuti con questa metodica sono praticamente privi di contaminazione di vescicole quali lisosomi, endosomi e membrana plasmatica (*Lanni A e coll, 1994*).

Per ottenere le membrane il surnatante ottenuto dall'ultima centrifugata viene prelevato e centrifugato a 10.000xg per 10 min a 4°C; il pellet ottenuto viene scartato ed il supernatante nuovamente centrifugato a 190.000xg per 1 h. Il pellet ottenuto da quest'ultima centrifugata contiene le membrane che vengono risospese in 200 µl di soluzione RIPA.

XV. Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio-dodecil-solfato (SDS-page).

L'elettroforesi è stata effettuata utilizzando un gel discontinuo di poliacrilammide secondo il metodo di Laemmli (*Laemmli, 1970*). Questa metodica prevede la preparazione di due tipi di gel:

- *Stacking gel*: TRIS 0.125 M; SDS 0.1%, pH 6.8; miscela di acrilamide al 4%; TEMED 0.1%; Ammonio persolfato 0.05%.

- *Separating gel*: TRIS 0.375 M; SDS 0.1%, pH 8.8; miscela di acrilammide (la cui percentuale varia a seconda del peso molecolare della proteina che si vuole valutare, come descritto in seguito); TEMED 0.1%; Ammonio persolfato 0.05%.

Lo stacking gel ha un più basso contenuto di acrilamide per permettere più facilmente il caricamento dei campioni. Invece, il separating gel ha un contenuto di acrilamide più elevato ed è la parte in cui si realizza l'effettiva separazione delle proteine. Per tale motivo, fra le lastre elettroforetiche deve essere versata prima la miscela di separating e solo dopo la sua polimerizzazione bisogna versare la miscela di stacking. Il gel è stato lasciato polimerizzare per 1 ora circa.

La concentrazione proteica dei campioni è stata determinata utilizzando il metodo BOIRAD, precedentemente descritto.

I campioni proteici sono stati diluiti per ottenere una concentrazione appropriata, di seguito riportata, in una soluzione costituita da: TRIS 50 mM; DTT 10 mM; Glicerolo 10%; SDS 2%; Blu di bromofenolo 0.001%, pH 6.8; e riscaldati a 80°C per 10 min prima di essere caricati sul gel. La corsa è stata effettuata a 150 V per 1 ora e 40 min, utilizzando come tampone la soluzione costituita da: TRIS 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0.1%, pH 8.6.

Per determinare i livelli di AMPK e di ACC la percentuale di acrilamide usata nel separating gel è stata del 10 e 5 % rispettivamente.. In ogni pozzetto del gel sono stati caricati 25 µl di campione concentrato 2,4 mg/ml che corrispondono a 60 µg di proteine. Per determinare i livelli mitocondriali e sarcoplasmatici di FAT/CD36 la

percentuale di acrilamide usata nel separating gel è stata dell'8%. In ogni pozzetto del gel sono stati caricati 25 µl di campione concentrato 2,4 mg/ml che corrispondono a 60 µg di proteine. Invece, per determinare i livelli della subunità α della pompa Na^+/K^+ e di UCP3 sulla membrana sarcoplasmatica e mitocondriale, la percentuale di acrilamide nel separating gel è del 13%. Nel caso della subunità α della pompa Na^+/K^+ in ogni pozzetto sono stati caricati 25 µl di campione concentrato 0,4 mg/ml che corrispondono a 10 µg di proteine; nel caso di UCP3 in ogni pozzetto sono stati caricati 25 µl di campione concentrato 1,2 mg/ml che corrispondono a 30 µg di proteine.;nel caso di SCD1 in ogni pozzetto sono stati caricati 25 µl di campione concentrato 1,2 mg/ml che corrispondono a 30 µg di proteine..

XVI. Analisi delle proteine mediante Western blot.

Utilizzando un voltaggio di 100 V per 2 ore in camera fredda, il materiale proteico risultante dalla separazione mediante elettroforesi è stato trasferito su una membrana di nitrocellulosa in un tampone di trasferimento contenente: TRIS 16.5mM, pH 8.3, glicina 150mM e metanolo 20%. Alla fine del trasferimento, la membrana è stata asciugata all'aria per 15 minuti al fine di rimuovere il metanolo.

Per l'uso di anticorpi contro epitopi contenenti aminoacidi non fosforilati, la membrana è stata lavata per 5 minuti nel tampone PBS-tween così composto: PBS 1x, Tween 20 0.1% (PBS 10x: NaCl 1.37M, KCl 27mM, Na_2HPO_4 0.1M, KH_2PO_4 18mM, pH 7.4). Per ottenere il blocco di siti aspecifici tra la nitrocellulosa e le proteine, la membrana è stata incubata a temperatura ambiente per 1 ora in una

soluzione di PBS-tween e agente bloccante (latte 5%). Dopodichè, il filtro è stato incubato per tutta la notte a 4 °C con un anticorpo primario adatto nel tampone che contiene PBS-tween-latte 2%. Successivamente, per allontanare l'anticorpo legato in modo aspecifico, la membrana è stata sottoposta a 4 lavaggi di 15 minuti ciascuno col tampone PBS-tween. Terminati i lavaggi, il filtro è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario appropriato (Goat anti rabbit) diluito 1:4000 in PBS-tween-latte 5%. Anche questa volta, per allontanare l'anticorpo secondario legato in modo aspecifico, la membrana ha subito quattro lavaggi da 15 minuti ciascuno con PBS-tween.

Per l'uso di anticorpi contro epitopi contenenti aminoacidi fosforilati, la membrana è stata lavata per 5 minuti nel tampone TBS-tween così composto: TBS 1x, Tween 20 0.1% (TBS 10x: NaCl 1.37M, 0.2M TRIS-HCl, pH 7.6). Per ottenere il blocco di siti aspecifici tra la nitrocellulosa e le proteine, la membrana è stata incubata a temperatura ambiente per 1 ora in una soluzione di TBS-tween e agente bloccante (latte 5%). In seguito, il filtro è stato lavato tre volte per 5 minuti in TBS-tween e, poi, incubato per tutta la notte a 4 °C con 1g/ml di anticorpo primario adatto nel tampone che contiene TBS-tween-latte 2%. Successivamente, per allontanare l'anticorpo legato in modo aspecifico, la membrana è stata sottoposta a tre lavaggi di 15 minuti ciascuno col tampone TBS-tween. Terminati i lavaggi, il filtro è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario appropriato (Goat anti rabbit) diluito 1:4000 in TBS-tween-latte 7%. Anche questa volta, per

allontanare l'anticorpo secondario legato in modo aspecifico, la membrana ha subito quattro lavaggi da 5 minuti ciascuno con TBS-tween.

Per rilevare il segnale, è stata usata la reazione di chemiluminescenza effettuata con una miscela di incubazione contenente: 5ml di luminolo 1.25mM, 50 μ l di acido cumarico 6.8mM e 15 μ l di H₂O₂ 3%.

La membrana è stata immersa in questa soluzione per 1 minuto, ed è stata misurata la chemiluminescenza usando una lastra per chemiluminescenza in cassette di esposizione a temperatura ambiente. Per assicurarsi che tutti i pozzetti venissero caricati con la stessa quantità di proteine, la membrana di nitrocellulosa è stata sottoposta a colorazione con il rosso Ponceau.

XVII. Determinazione della velocità di respirazione e del potenziale di membrana mitocondriale interna.

Per determinare la variazione cinetica della proton leak in funzione della variazione del $\Delta\Psi$, il potenziale di membrana e la respirazione sono stati misurati simultaneamente nella stessa sospensione mitocondriale alla temperatura di 37°C.

I mitocondri sono stati incubati in un mezzo contenente 80 mM di KCl, 50 mM di Hepes (pH 7), 1 mM di EGTA, 5 mM di K₂HPO₄, 4 μ M di rotenone, 1 μ g/ml di oligomicina, 80 ng/ml di nigericina e 5 mM di succinato.

Per determinare il contributo degli acidi grassi nell'effetto della T2 sulla proton leak in alcuni esperimenti al mezzo di incubazione veniva aggiunta BSA (1%)

Il consumo di ossigeno dei mitocondri è stato misurato mediante l'utilizzo dell'elettrodo di Clark ed è una misura che ha permesso di ottenere il valore della proton leak.

Nella stessa sospensione mitocondriale è stato rilevato anche il $\Delta\Psi$, misurato con un elettrodo sensibile al trifenilmetilfosfonio (TPmP⁺). Questo elettrodo permette di misurare l'attività dello ione TPmP⁺ in una soluzione. Quando il TPmP⁺ viene aggiunto ad una sospensione mitocondriale, essendo carico, si distribuisce all'interno ed all'esterno del mitocondrio a seconda del valore del $\Delta\Psi$. Allo stato stazionario quando il valore del $\Delta\Psi$ risulta essere costante, il TPmP⁺ si distribuisce in modo tale che il potenziale elettrochimico dello ione all'interno e all'esterno della matrice sia uguale. In questa situazione quindi il TPmP⁺ segue la legge dell'equilibrio di Nernst:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{nF} \ln \frac{TPmP^{+} \text{ int}}{TPmP^{+} \text{ out}}$$

dove TPmP⁺int rappresenta la concentrazione dello ione all'interno della matrice che è libero di diffondere e TPmP⁺est rappresenta la concentrazione dello ione all'esterno dei mitocondri. In effetti l'elettrodo selettivo è in grado di misurare il valore del TPmP⁺est e quindi il TPmP⁺int può essere calcolato sottraendo dalla quantità totale di ione aggiunto alla sospensione mitocondriale il TPmP⁺est.

La sensibilità dell'elettrodo al TPmP⁺ è stata calibrata con aggiunte progressive di TPmP⁺ fino a raggiungere una concentrazione di 2 μ M di TPmP⁺.

Il valore del $\Delta\Psi$ mitocondriale può essere variato incrementando o riducendo le attività delle reazioni che ne permettono la sua genesi, quale, ad esempio, la variazione della quantità di substrato in grado di donare gli elettroni alla catena di trasporto.

Per determinare la risposta cinetica della proton leak a variazioni del $\Delta\Psi$, i mitocondri sono stati incubati nel mezzo di respirazione in presenza di oligomicina che inibisce il flusso protonico attraverso l'ATPasi, di nigericina che annulla la differenza di pH ai lati della membrana mitocondriale interna, del succinato che è il substrato donatore di elettroni e dalla cui ossidazione nel ciclo di Krebs si produce FADH₂. In tali condizioni è stato determinato il $\Delta\Psi$ e il consumo di ossigeno. Successivamente è stato aggiunto, al mezzo di incubazione, in modo progressivo, malonato fino a raggiungere la concentrazione di 2.5 mM. L'aggiunta di quest'ultimo, inibendo la Succinico Deidrogenasi, comporta la riduzione del $\Delta\Psi$ e del consumo di ossigeno in quanto diminuisce la disponibilità degli elettroni alla catena di trasporto.

XVIII. Determinazione dell'attività totale della fosfolipasi A2

L'attività totale della fosfolipasi A2 è stata misurata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 414nm, seguendo la cinetica della produzione mitocondriale di gruppi tiolici liberi (-SH) in presenza di acido 5,5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB), usando arachidonil-tio-fosforilcolina come substrato sintetico.

Il metodo spettrofotometrico è basato sul rilascio di gruppi tiolici liberi che possono essere determinati grazie al DTNB. Infatti, la presenza di tioli liberi induce la riduzione del DTNB ad acido 5-tio-2-nitrobenzoico che determinerà lo sviluppo di un colore giallo.

Il dosaggio richiede due tappe: in una prima fase, i mitocondri (0.1mg) sono stati incubati per 60 minuti a temperatura ambiente in 1mL di una soluzione composta da: 80mM di HEPES (pH 7.4), 150mM di NaCl, 1mg/ml di BSA, 10mM CaCl₂, 4mM Triton X-100, 30% glicerolo e 1,5mM arachidonil-tio-PC. In una seconda fase, ovvero al termine dei 60 minuti, la reazione è stata bloccata ed i tioli rilasciati sono stati evidenziati con l'aggiunta di 40μL di una soluzione composta da: 0,5M TRIS-HCl (pH 8.0), 475μM EGTA e 25mM DTNB. La riduzione del DTNB è stata seguita per 5 minuti a temperatura ambiente.

La concentrazione dei tioli rilasciati è stata calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare, $E_{414nm} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

VIX. Analisi statistica

La significatività statistica delle differenze tra i vari gruppi sperimentali è stata determinata utilizzando il test *t di Student* o mediante l'analisi della varianza seguita dal test *Student-Newman-Keuls*.

Le differenze sono considerate significative per $P < 0,05$.

RISULTATI

Effetto della T2 sul metabolismo di riposo, produzione di calore e quoziente respiratorio

Per valutare l'efficienza del trattamento effettuato con T2 sui ratti è stato valutato il consumo di ossigeno e il quoziente respiratorio e la produzione di calore nell'animale in toto, in quanto questi sono parametri notoriamente influenzati dallo stato tiroideo.

Il consumo di ossigeno dell'animale in toto è stato determinato mediante l'uso di un metabolimetro. Questo è stato valutato nelle 4 ore precedenti la somministrazione della T2 e 24 ore dopo la somministrazione della stessa. Le misure effettuate hanno rilevato che, in seguito alla somministrazione della T2 a ratti ipotiroidei, si verifica un aumento del consumo di ossigeno di questi ultimi. In effetti il valore del consumo di ossigeno negli animali ipotiroidei risulta 3.34 ± 0.2 ml/min/Kg^{0,75} e diventa 4.07 ± 0.3 ml/min/Kg^{0,75} dopo somministrazione della T2. (fig 15)

Il valore del quoziente respiratorio (definito come il rapporto tra CO₂ prodotta e O₂ consumato dall'animale) risulta essere significativamente ridotto dalla somministrazione di T2, in effetti, esso risulta 0.91 ± 0.06 prima della somministrazione di T2 e diventa 0.84 ± 0.06 dopo 24 ore dalla somministrazione della stessa. (fig 16)

La produzione di calore, misurata negli stessi gruppi sperimentali di ratti, mostra un lieve incremento in seguito alla somministrazione di T2. In effetti i valori risultano essere 52 ± 2 kcal/gg / Kg^{0,75} negli animali P+I e 62 ± 2 kcal/gg / Kg^{0,75} negli animali P+I+T2. (fig 17).

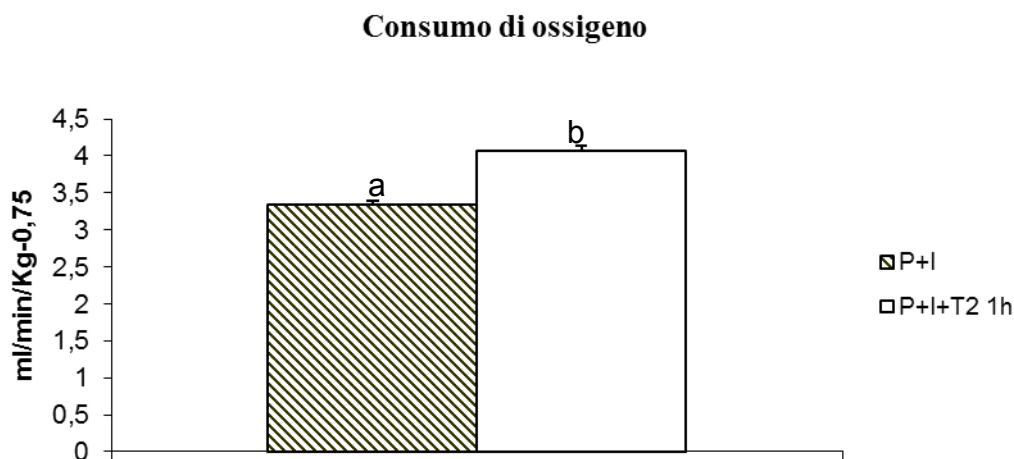


Figura 15: Metabolismo di riposo calcolato attraverso la calorimetria indiretta nei seguenti gruppi di animali: ratti ipotiroidei (P+I) e ipotiroidei trattati con T_2 (P+I+T2).I valori rappresentano la media \pm ES di cinque esperimenti per ogni gruppo.Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$.

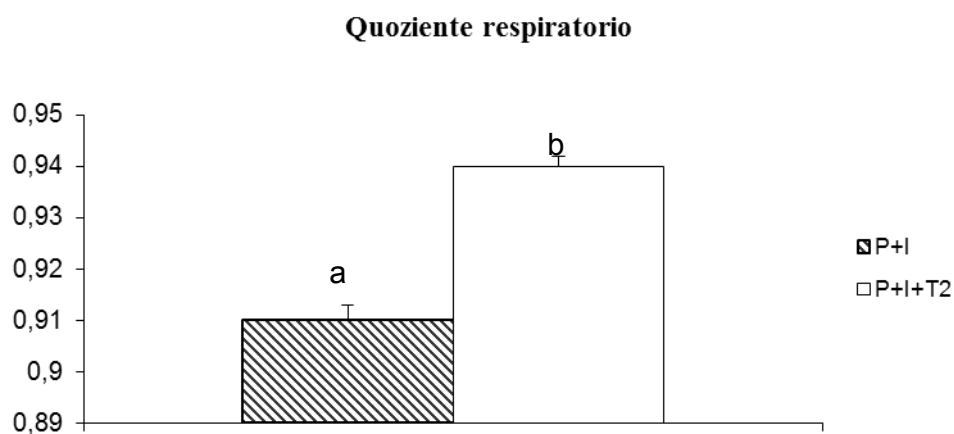


Figura 16: Quoziente respiratorio calcolato attraverso la calorimetria indiretta nei seguenti gruppi di animali: ratti ipotiroidei (P+I) e ipotiroidei trattati con T_2 (P+I+T2).I valori rappresentano la media \pm ES di cinque esperimenti per ogni gruppo.Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$.

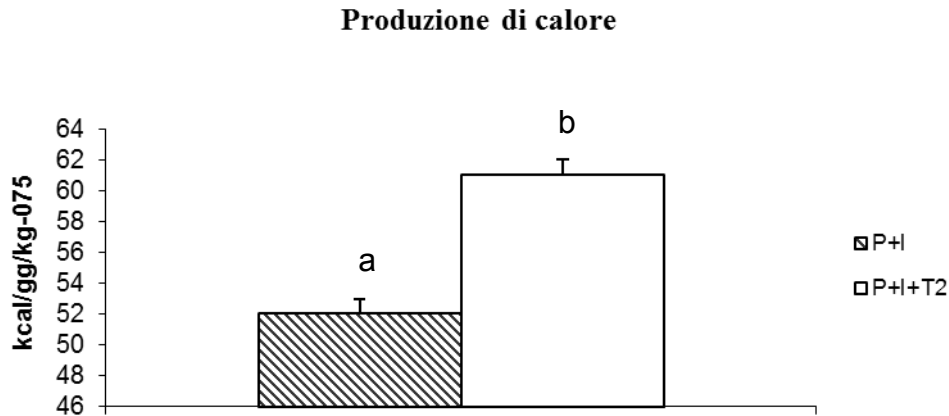


Figura 17: La produzione di calore calcolato attraverso la calorimetria indiretta nei seguenti gruppi di animali: ratti ipotiroidei (P+I) e ipotiroidei trattati con T₂ (P+I+T2). I valori rappresentano la media±ES di cinque esperimenti per ogni gruppo. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, P<0,05.

Effetto della T₂ sulla mobilizzazione lipidica.

Per valutare se la mobilizzazione degli acidi grassi potesse essere influenzata dalla somministrazione della T₂ a ratti ipotiroidei sono stati determinati i livelli serici di glicerolo libero e di FFA. Valutando i livelli serici di FFA nei vari gruppi sperimentali, si evince che non si riscontrano significative differenze tra animali P+I e animali P+I+T21h. Infatti i valori di FFA serici risultano essere 17,82± 1 e 19,13±1 mg/g tessuto rispettivamente negli animali P+I e P+I+T21h.

. D'altro canto la somministrazione cronica di T₂ ad animali ipotiroidei comporta una significativa riduzione di tali livelli (-54%) che si portano ad un valore di 9,7±0,44 mg/g tessuto (fig 18).

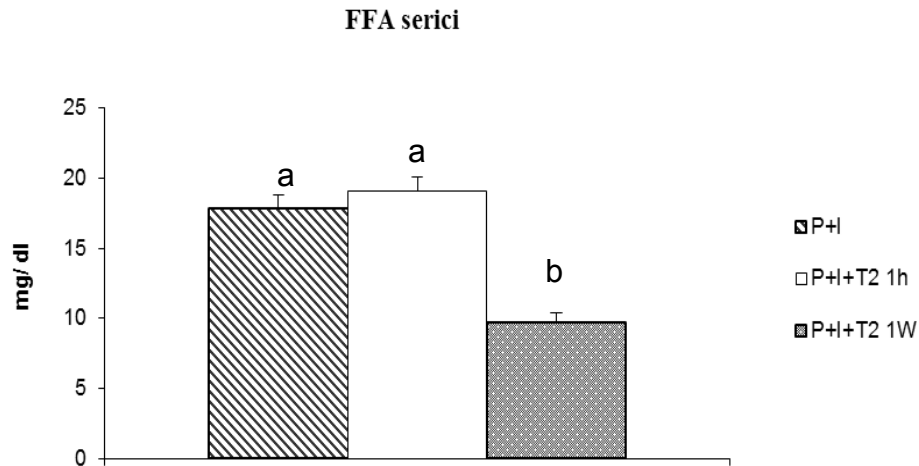


Figura 18: Livelli serici di acidi grassi liberi non esterificati in gastrocnemio di animali ipotiroidei (P+I) ed ipotiroidei trattati acutamente (P+I+T2 1h) e cronicamente (P+I+T2 1 w) con T₂. I valori rappresentano la media±ES di sei esperimenti per ogni gruppo. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, P<0,05.

Per quanto riguarda gli effetti della T₂ sui livelli serici di glicerolo, non sono stati riscontrati effetti significativi dopo la sua somministrazione ad animali ipotiroidei, infatti i valori ottenuti sono 0.162 ± 0.13 e 0.168 ± 0.13 rispettivamente negli animali P+I+T21h e P+I. La somministrazione cronica di T₂ non induce nessun significativo cambiamento rispetto ai controlli P+I, infatti i valori sono $0,182 \pm 0,04$. (fig 19)

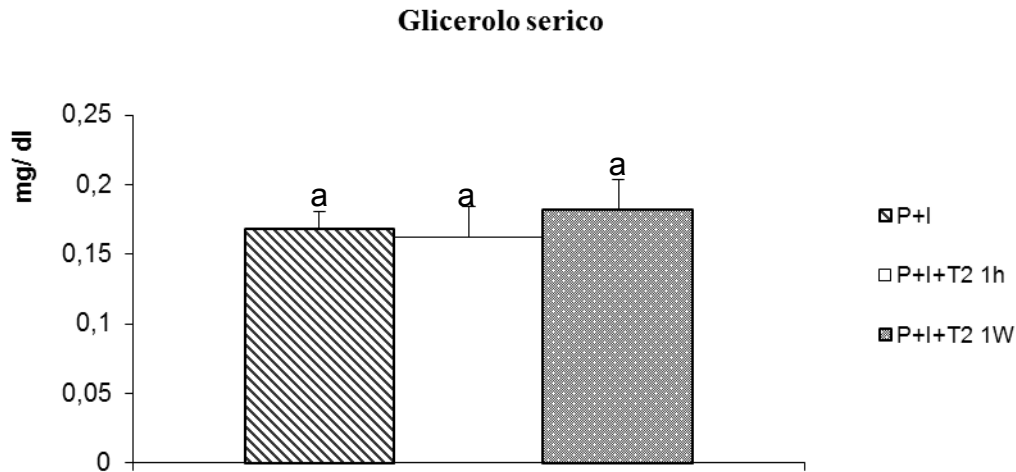


Figura 19 Livelli serici di glicerolo di animali ipotiroidei (P+I) ed ipotiroidei trattati acutamente (P+I+T2 1h) e cronicamente (P+I+T2 1 w) con T₂. I valori rappresentano la media±ES di sei esperimenti per ogni gruppo. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, P<0,05.

La T2 influenza rapidamente l'handling lipidico a livello mitocondriale.

-Effetto sulla capacità mitocondriale di ossidare substrati lipidici-

Per determinare gli effetti della T2 sulla capacità dei mitocondri di muscolo scheletrico di ossidare gli acidi grassi è stato valutato il consumo di ossigeno mitocondriale quando i mitocondri utilizzano diversi substrati lipidici come substrato per la respirazione, tra cui palmitato, palmitoil-CoA e palmitoil-carnitina. Si è scelto di utilizzare i predetti substrati lipidici perché la loro ossidazione coinvolge reazioni diverse. In particolare, l'ossidazione del palmitato richiede l'attivazione dell'acido grasso (formazione di Palmitoil-CoA) ed il successivo importo dello stesso nel mitocondrio, mediato dal sistema di trasporto della carnitina palmitoil transferasi 1(CPT-1). L'ossidazione di palmitoil-CoA richiede il suo importo nel mitocondrio mediante il trasportatore

carnitina palmitoil transferasi 1(CPT-1) , mentre l'ossidazione di palmitoil-carnitina, è indipendente da CPT-1.

La somministrazione di T2 a ratti ipotiroidei incrementa significativamente l'ossidazione mitocondriale di palmitato (fig 20). Infatti i valori del consumo di ossigeno determinato appunto quanto viene utilizzato tale substrato come substrato risulta essere $11,93 \pm 0,9$ nmoli O/min prot e $15,9 \pm 0,8$ nmoli O/min prot, rispettivamente nei mitocondri P+I ed P+I+T2 1h. L'effetto stimolatorio della T2 è mantenuto anche quando questa viene somministrata cronicamente. In questo caso, l'aumento del consumo di ossigeno rispetto agli animali ipotiroidei, risulta essere di circa il 22% .

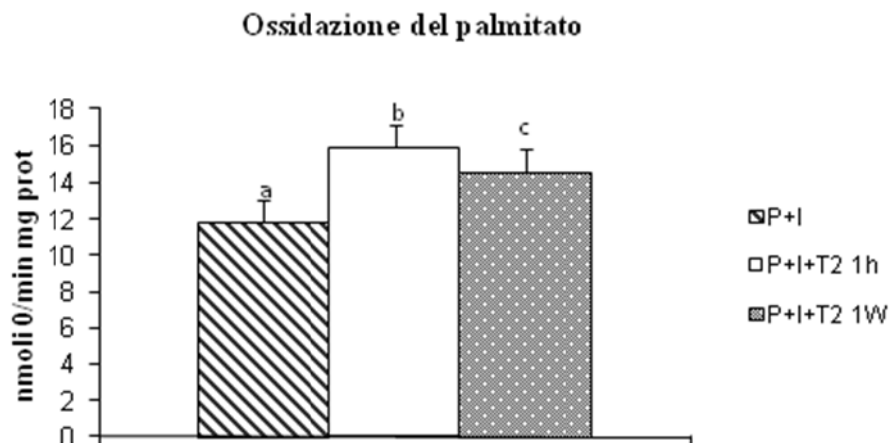


Figura 20: Ossidazione del palmitato in mitocondri isolati da animali ipotiroidei (P+I) ipotiroidei trattati con T2 acutamente (P+I+T2 1h) e ipotiroidei trattati con T2 cronicamente (P+I +T2 1w). I valori rappresentano la media \pm ES ottenuti da sei esperimenti per ogni gruppo di animali. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, con $P < 0,05$.

Quando viene utilizzato palmitoil-CoA (fig 21) come substrato per le ossidazioni si riscontra che la somministrazione acuta di T2 a ratti ipotiroidei ne induce un incremento del consumo di ossigeno di circa il 104%. I valori del consumo di ossigeno, infatti risultano essere sono 48 ± 3 nmol O/min mg prot, 100 ± 9 nmol O/min mg prot, nei mitocondri isolati da ratti P+I ed P+I+T21h, rispettivamente. Tale incremento è osservato anche in seguito ad una somministrazione cronica di T2; in questo caso i valori osservati risultano essere 89.3 ± 6 nmol O/min mg prot.

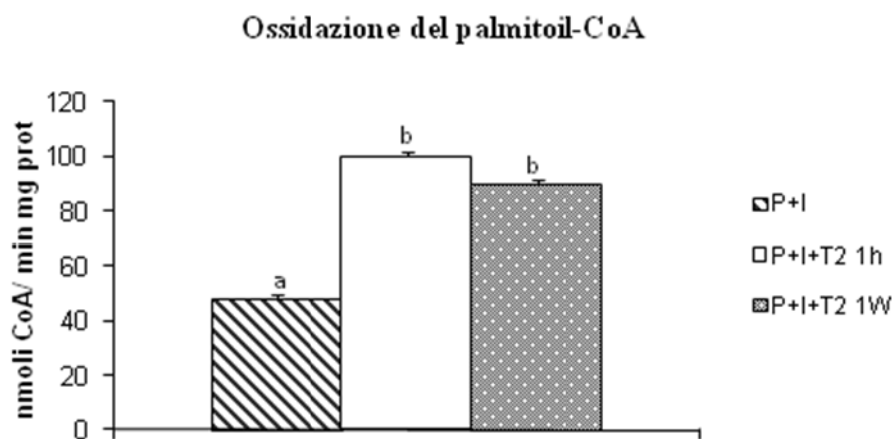


Figura 21: Ossidazione del palmitoil-CoA in mitocondri isolati da animali ipotiroidei (P+I) ipotiroidei trattati con T2 acutamente (P+I+T2 1h) e ipotiroidei trattati con T2 cronicamente (P+I +T2 1w). I valori rappresentano la media \pm ES ottenuti da sei esperimenti per ogni gruppo di animali. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, con $P < 0,05$.

Anche quando i mitocondri utilizzano come substrato la palmitoil-carnitina , la somministrazione acuta e cronica ad animali ipotiroidi comporta un incremento della velocità di ossidazione degli acidi grassi (fig 21).

In seguito a somministrazione acuta e cronica di T2, l'ossidazione della palmitoil-carnitina risulta incrementato rispetto ai controlli ipotiroidi. Infatti i valori del consumo di ossigeno determinato appunto quanto viene utilizzato tale substrato risultano essere 109 ± 9 nmoli O/min prot e 135 ± 9 nmoli O/min prot, rispettivamente nei mitocondri P+I+T2 1h ed P+I+T2 1w . Mentre i valori ,come si osserva anche dalla figura 22, dei controlli ipotiroidi sono 70 ± 10 nmol O/min mg prot.

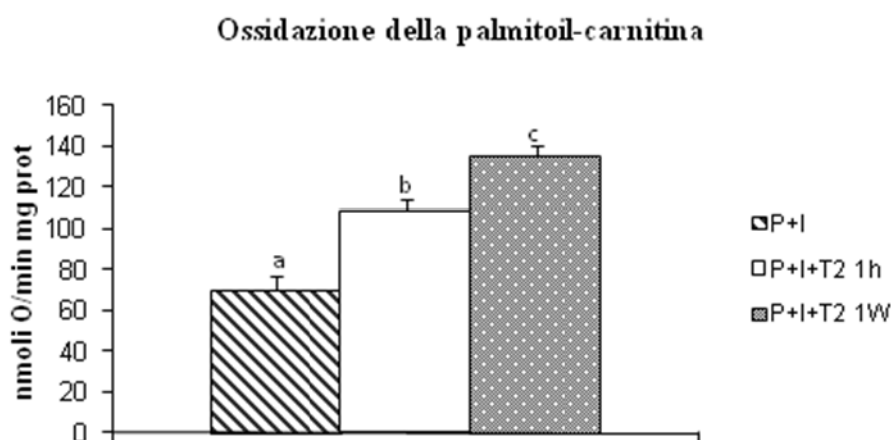


Figura 22 Ossidazione della palmitoil carnitina in mitocondri isolati da animali ipotiroidi (P+I) ipotiroidi trattati con T2 acutamente (P+I+T2 1h) e ipotiroidi trattati con T2 cronicamente (P+I +T2 1w). I valori rappresentano la media \pm ES ottenuti da sei esperimenti per ogni gruppo di animali. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, con $P < 0,05$.

-Effetto sulla capacità mitocondriale importare gli acidi grassi attivati-

Per valutare se la T2 potesse modulare l'importo degli acidi grassi a lunga catena nel mitocondrio, è stata determinata l'attività del sistema della carnitina palmitoil-transferasi. L'attività totale di tale enzima risulta essere 9.14 ± 0.64 nmol CoA/min mg prot in mitocondri isolato da muscolo gastrocnemio di ratti ipotiroidei. La somministrazione acuta e cronica di T2 a ratti P+I induce un significativo incremento dell'attività del suddetto complesso enzimatico (+40% e +50%, rispettivamente). I valori dell'attività di CPT, infatti risultano essere 12.8 ± 0.4 nmol CoA/min mg prot, e 13.8 ± 0.6 nmol CoA/min mg prot, negli animali P+I+T2 1h e P+I+T2 1w (fig 23).

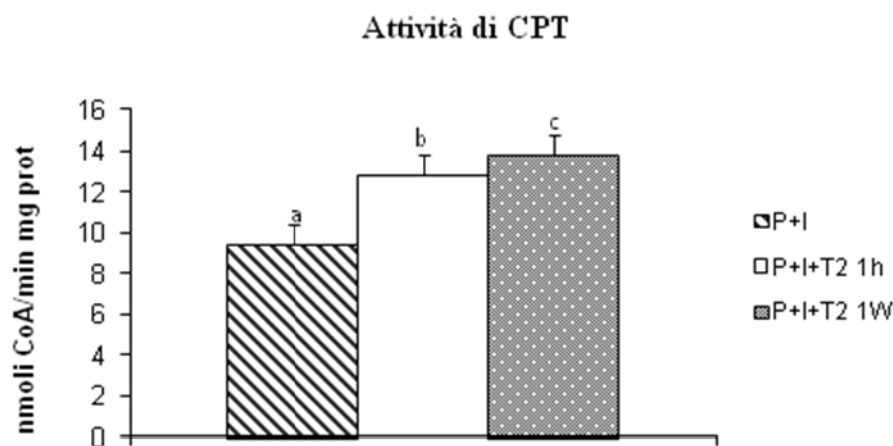


Figura 23 :Effetti della somministrazione acutamente e cronicamente di T2 a ratti ipotiroidei (P+I) sull'attività di CPT.(I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti esperimenti, ciascuno effettuato in duplicato).

-Effetto sulla attività delle tioesterasi mitocondriali-

Poiché il pool di CoASH mitocondriale è limitato, l'aumento dell'importo di acidi grassi e della loro ossidazione ad acetil-CoA potrebbe portare ad un drastico decremento nella matrice di CoA-SH, e di conseguenza al rallentamento o al blocco dell'ossidazione degli acidi grassi stessi. L'idrolisi di parte del palmitoil-CoA a palmitato e CoA, operata dalla tioesterasi mitocondriale (MTE), è funzionale al mantenimento del pool di CoA, necessario affinché la beta ossidazione ed il ciclo di Krebs possano procedere a velocità adeguate. In base a quanto detto si è ritenuto interessante valutare se l'aumento dell'importo degli acidi grassi e della loro ossidazione fosse associato ad un aumento dell'attività della tioesterasi mitocondriale. Come si osserva in figura 24 sia la somministrazione acuta che cronica di T2 ad animali ipotiroidei ne determina un incremento significativo della attività di MTE-1 del 50% e del 37%, rispettivamente. Infatti i valori dell'attività di MTE risultano essere 4.42 ± 0.46 , 7.22 ± 0.4 e $6.06 \pm 0,72$ rispettivamente nei mitocondri isolati da ratti P+I, P+I+T2 1h e P+I+T2 1w.

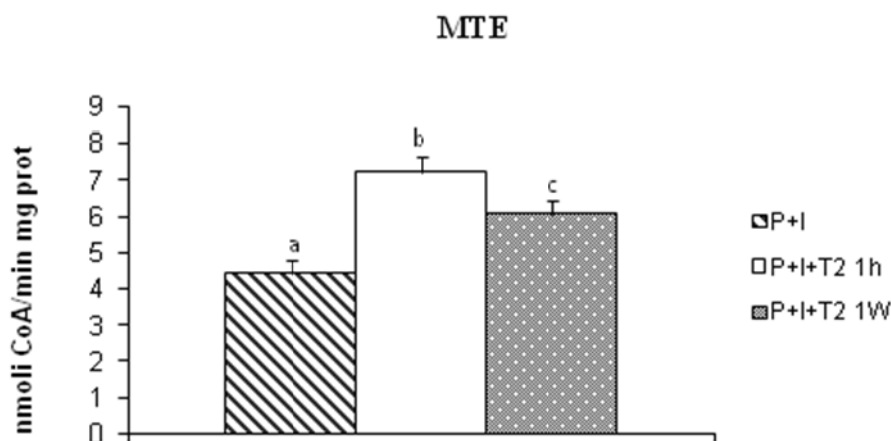


Figura 24: Effetti della somministrazione acutamente e cronicamente di T2 a ratti ipotiroidei (P+I) sull'attività di MTE. (I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti esperimenti, ciascuno effettuato in duplicato).

L'effetto della T2 sulle vie respiratorie mitocondriali FADH2 e NADH dipendenti.

Per valutare se le vie respiratorie mitocondriali fossero bersaglio della T2 sono state valutate le variabili respiratorie mitocondriali, determinando lo Stato 3 (stato della respirazione mitocondriale in cui la sintesi di ATP procede alla massima velocità), lo Stato 4 (stato della respirazione in cui la sintesi di ATP è inibita ed i mitocondri respirano per bilanciare il flusso di protoni attraverso la proton leak) ed il rapporto del controllo respiratorio RCR (rapporto tra Stato 3 e Stato 4)

Tali parametri sono stati valutati utilizzando due substrati differenti che permettono di discriminare l'eventuale coinvolgimento delle vie respiratorie NADH dipendenti da quelle FADH2 dipendenti, nell'effetto della T2.

Quando i mitocondri utilizzano come substrato il succinato+ rotenone,(tabella 1); un substrato che permette di valutare l'attività delle vie respiratorie mitocondriali FADH dipendenti, si osserva che i mitocondri ottenuti da animali ipotiroidei trattati sia acutamente che cronicamente con T2 mostrano sia Stato 4 sia Stato 3 della respirazione mitocondriale incrementati rispetto a quelli degli ipotiroidei di controllo (+30% e +34%, rispettivamente);

Il Rapporto del Controllo Respiratorio (RCR), un indice dell'integrità mitocondriale e dell'efficienza della fosforilazione ossidativa in condizioni basali, non risulta significativamente influenzato dalla somministrazione di T2. Il valore di RCR ottenuto per mitocondri di muscoli scheletrico che risulta essere di circa 4, indica una buona preparazione ed integrità mitocondriale.

Gli stessi parametri metabolici sono stati determinando anche utilizzando come substrato il piruvato + malato che permette di poter valutare le vie respiratorie NADH dipendenti. Come si osserva dalla tabella 2, i mitocondri ottenuti da animali ipotiroidei trattati acutamente con T2 non mostrano differenze significative nei parametri rispetto a quelli degli ipotiroidei di controllo. Tali parametri non risultano significativamente differenti rispetto ai controlli ipotiroidei anche quando la T2 viene somministrata cronicamente.

TABELLA 1

Effetto della somministrazione acuta di T2 a ratti ipotiroidei sulle vie respiratorie mitocondriali FADH2 dipendenti

	P+I	P+I+T21h	P+I+T2+1W
STATO 4 nmoli O/min mg prot	92±10	120±7*	124±6*
STATO 3 nmoli O/min mg prot	370±20	497±25*	510±30*
RCR	4.02±0.3	4.14±0.2	4.11±0.2

I valori riportati rappresentano la media ± ES di 5 differenti preparazioni mitocondriali. Le differenze sono ritenute significative quando $P < 0.05$. * $P < 0.05$ vs P+I.

TABELLA 2

Effetto della somministrazione acuta di T2 a ratti ipotiroidei sulle vie respiratorie mitocondriali NADH dipendenti

	P+I	P+I+T21h	P+I+T2+1W
STATO 4 nmoli O/min mg prot	13.1±0.8	12.3±1.0	12.6±1.2
STATO 3 nmoli O/min mg prot	120.3±15	120.4±10	127.3±10
RCR	9.18±0.8	9.7±0.6	10.1±0.9

I valori riportati rappresentano la media ± ES di 5 differenti preparazioni mitocondriali.

Effetto della T2 sull'efficienza della fosforilazione ossidativa e coinvolgimento degli acidi grassi nel suddetto effetto.

Durante lo stato 4 della respirazione mitocondriale respirano unicamente per bilanciare la proton leak. Poiché è possibile discriminare tra proton leak basale e proton leak indotta dagli acidi grassi ho ritenuto interessante valutare lo stato 4 della respirazione ed il controllo respiratorio (indice dell'efficienza della fosforilazione ossidativa) in presenza ed in assenza di acidi grassi liberi. Quest'ultima condizione è stata ottenuta aggiungendo BSA al mezzo di isolamento e respirazione dei mitocondri. Come si può dedurre dalla tabella 3, la somministrazione acuta della T2 a ratti ipotiroidei induce un incremento dello stato 4 della respirazione, che risulta maggiore quando le misure vengono effettuate in presenza di acidi grassi endogeni (stato4-BSA) rispetto alla condizione in cui lo Stato 4 è stato determinato in presenza di BSA (stato4+BSA). D'altro canto lo stato 3 della respirazione mitocondriale non è significativamente influenzato dalla presenza o dall'assenza di BSA come non lo è l'effetto della T2 sullo stato 3 della respirazione. Da ciò consegue che in presenza di acidi grassi endogeni la T2 induce una riduzione del rapporto del controllo respiratorio ($\text{stato3}/\text{stato4}$), indice di una riduzione dell'efficienza della fosforilazione ossidativa.

TABELLA 3**Stato 4, stato 3, e RCR di mitocondri isolati da ratti P+I e P+I+T2**

	P+I	P+I+T2
STATO 4+ BSA nmoli O/min mg prot	85±12	100±16 (+17% vs P+I)
STATO 3+ BSA nmoli O/min mg prot	405±58	514±60*
RCR+BSA nmoli O/min mg prot	4.8±0.4	5.1±0.4
STATO 4- BSA nmoli O/min mg prot	154±17	218±17* (+41% vs P+I)
STATO 3- BSA nmoli O/min mg prot	360±30	456±16*
RCR+BSA nmoli O/min mg prot	2.3±0.2	2.1±0.1

I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti preparazioni mitocondriali. Le differenze sono ritenute significative quando $P < 0.05$. * $P < 0.05$ vs P+I.

L'effetto della T2 sull'efficienza della trasduzione energetica mitocondriale è stata confermata con studi più approfonditi in cui si è determinato la cinetica della proton leak in presenza di acidi grassi endogeni e in presenza della BSA, ossia di un chelante degli acidi grassi liberi.

In condizioni in cui le determinazioni sono state effettuate in presenza di acidi grassi endogeni (fig 25), la somministrazione acuta di T2 a ratti ipotiroidei determina una stimolazione della cinetica della proton-leak.

Infatti, i mitocondri isolati dal muscolo di ratti P+I+T21h devono respirare di più rispetto a quelli di ratti P+I per mantenere lo stesso potenziale di membrana, ossia per bilanciare il rientro di protoni verso la matrice attraverso la proton leak.

Per valutare se gli acidi grassi svolgessero un ruolo chiave nell'induzione della proton-leak da parte della T2, le cinetiche della proton leak sono state determinate anche in presenza di BSA. La BSA inibisce significativamente la cinetica della proton leak sia nei ratti ipotiroidei sia in quelli ipotiroidei trattati acutamente con T2, ed abolisce le differenze tra i due gruppi sperimentali. Infatti come mostra la figura 25 si osserva che le due curve relative ai mitocondri P+I e P+I+T2 determinati in presenza di BSA si sovrappongono; tali dati indicano, quindi il ruolo cruciale degli acidi grassi liberi nel mediare il disaccoppiamento mitocondriale indotto dalla T2.

Gli effetti indotti dalla somministrazione acuta di T2 sulla proton leak sono evidenti anche dopo somministrazione cronica della stessa iodotironina. Analogamente a quanto appena descritto non gli acidi grassi svolgono un ruolo chiave nel mediare l'effetto disaccoppiante di T2 (dati non mostrati).

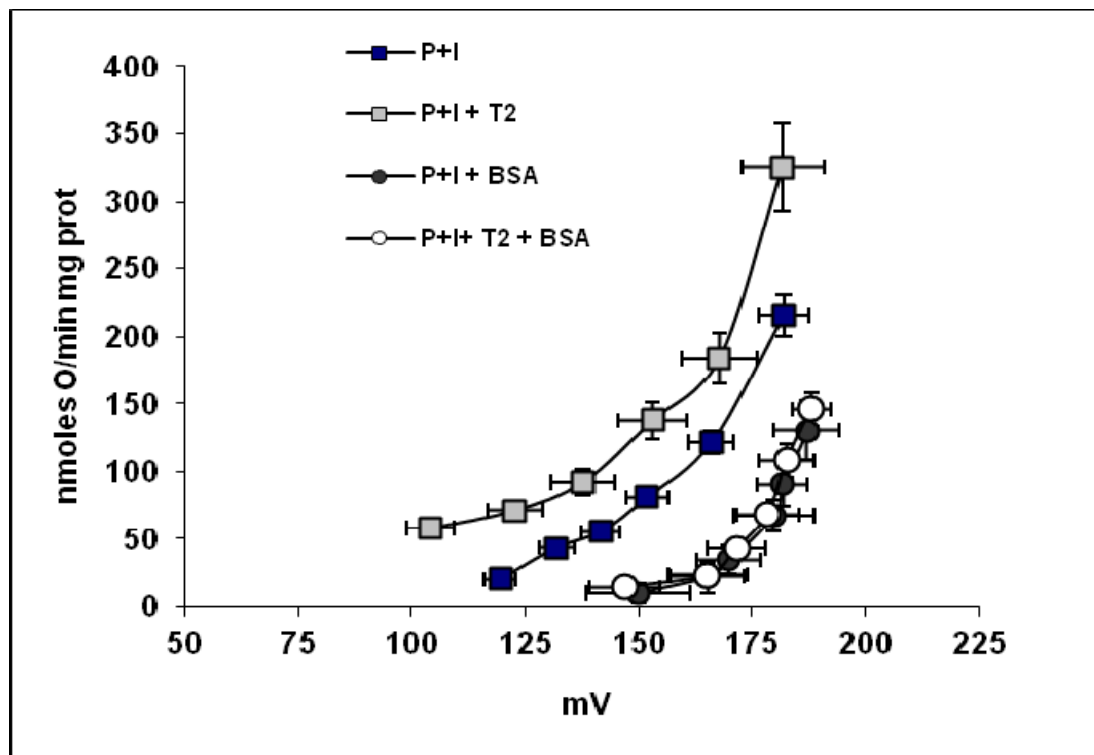


Figura 25: Risposta cinetica della proton leak alla variazione del potenziale della membrana mitocondriale interna in mitocondri di muscolo scheletrico in presenza di acidi grassi endogeni e in presenza di BSA 1% (chelante degli acidi grassi liberi). I valori sono la media \pm ES di 5 differenti esperimenti

Effetti della T2 sul contenuto di trigliceridi nel muscolo gastrocnemio di ratto

I livelli dei trigliceridi estratti da muscolo gastrocnemio di ipotiroidei risultano essere $0,99 \pm 0,04$ mg/g di tessuto. La somministrazione acuta di T2 ad animale ipotiroidei determina un leggero incremento dei livelli di trigliceridi di circa il 14% che raggiungano il valore di $1,13 \pm 0,045$ mg/g tessuto. Tale fenomeno è transiente,

infatti, la somministrazione cronica di T2 a ratti ipotiroidei ne riduce significativamente i livelli di trigliceridi tissutali -42%.(fig 26)

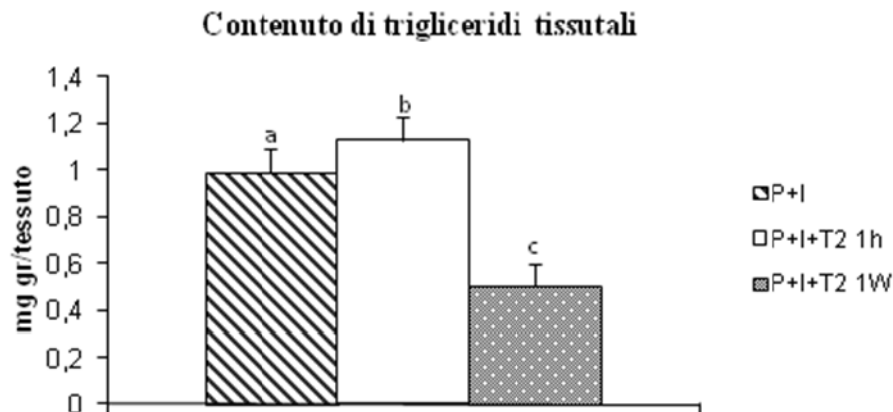


Figura 26:Contenuto tissutale di trigliceridi in gastrocnemio isolato da animali ipotiroidei (P+I)ed ipotiroidei trattati acutamente (P+I+T2 1h) e cronicamente (P+I+T2 1 w) con T2. I valori rappresentano la media \pm ES di sei esperimenti per ogni gruppo. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$.

Per quanto riguarda i livelli tissutali di FFA determinato sui lipidi estratti da muscolo scheletrico risulta essere $43,19 \pm 1$ mg/g tessuto. La somministrazione di T2 a ratti ipotiroidei, induce una riduzione del contenuto tissutale di FFA del 24%. Il fenomeno, tuttavia, è transiente, infatti comparando i livelli di FFA misurati in

seguito a trattamento cronico di T2 e quelli relativi ad animali ipotiroidei non si osservano significative variazioni (fig 27)

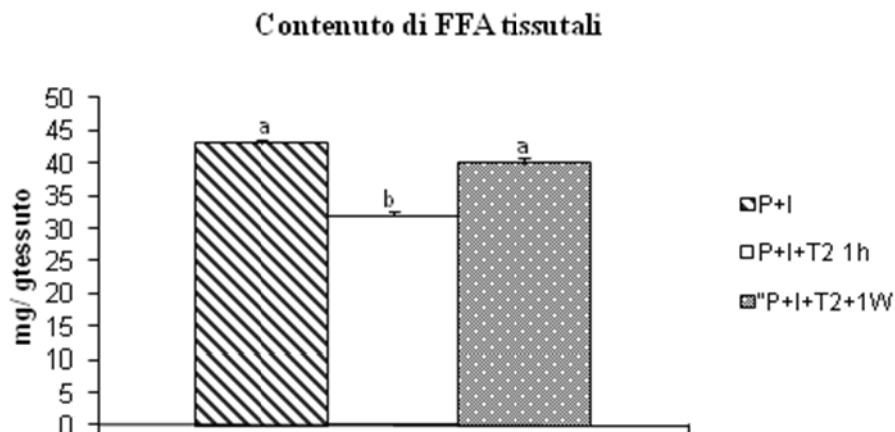


Figura 27: Contenuto tissutale di FFA in gastrocnemio isolato da animali ipotiroidei (P+I) ed ipotiroidei trattati acutamente (P+I+T2 1h) e cronicamente (P+I+T2 1 w) con T2. I valori rappresentano la media \pm ES di sei esperimenti per ogni gruppo. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$.

Effetto della somministrazione di T2 a ratti ipotiroidei sul contenuto proteico totale, sarcoplasmatico e mitocondriale di FAT/CD36.

Dato il ruolo chiave svolto dalla proteina FAT/CD36 nel metabolismo lipidico del muscolo scheletrico, è stato valutato se tale proteina potesse essere bersaglio della T2, in particolare si è ritenuto interessante focalizzare l'attenzione sia sui livelli totali tissutali di tale proteina sia sulla sua distribuzione subcellulare.

In primis si è valutato quelli che sono i livelli di mRNA relativi a FAT/CD36. Come si osserva dalla figura 28 .i livelli di mRNA di questa proteina diminuiscono inseguito al trattamento cronico della T2, rispetto ai controlli P+I.

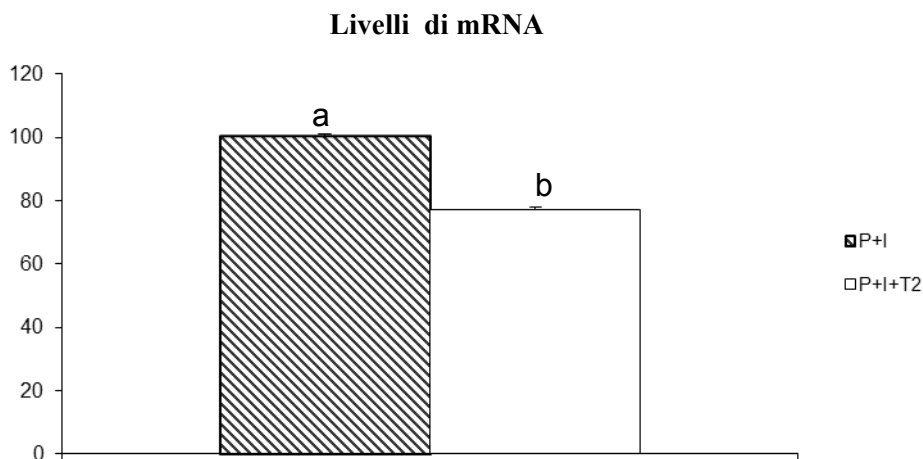


Figura 28: Quantificazione dei livelli di mRNA di FAT/CD36 determinati mediante RT-PCR in muscolo scheletrico di ratti ipotiroidei (P+I), ipotiroidei trattati con T2 per una settimana (P+I+T2+1W).Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$

In figura 29 sono riportati i livelli proteici totali di FAT/CD36, determinati attraverso western immunoblotting. Come si osserva in figura. 29. la somministrazione cronica di T2 a ratti ipotiroidei, riduce significativamente i livelli totali di di FAT/CD36 rispetto agli animali ipotiroidei(-40%vs P+I).

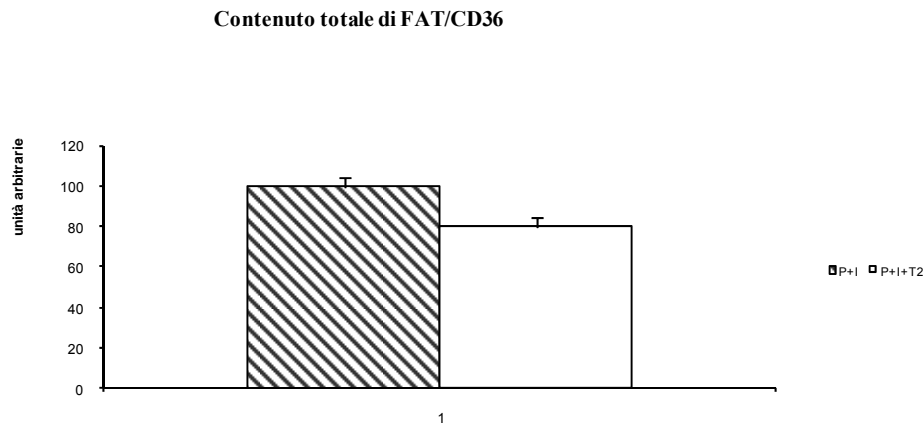
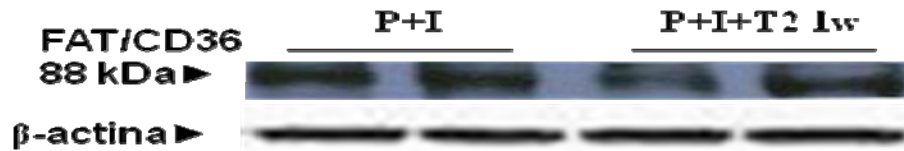


Figura 29: Analisi Western Immunoblot dei livelli della proteina FAT/CD36. Ogni lane contiene 60 µg di proteine di ogni singolo ratto. Nell'istogramma viene quantizzato ogni segnale relativo al valore ottenuto negli animali ipotiroidici. Ogni valore indica la media ± ES ottenuta utilizzando 5 animali per ogni gruppo sperimentale.

Data la presenza di FAT/CD36 sia sulla membrana sarcoplasmatica che a livello mitocondriale, prima di determinare il contenuto di FAT/CD36 sui mitocondri isolati e su una frazione arricchita di membrana plasmatica, in primis si è escluso che la preparazione mitocondriale fosse contaminata da membrane di origine sarcoplasmatica ed endoplasmatica. Analogamente si è verificato che la frazione arricchita di membrana sarcoplasmatica potesse essere contaminata da mitocondri.

A tale scopo su campioni di membrana plasmatica e su mitocondri isolati sono stati valutati la presenza di proteine marker quali la subunità α della pompa Na⁺/K⁺

ATPasi, presente a livello sarcoplasmatico e la proteina disaccoppiante UCP3, proteina presente unicamente a livello della membrana mitocondriale interna. Inoltre per escludere la contaminazione della preparazione mitocondriale con membrane di origine endoplasmatica, è stata valutata la presenza di SCD1, classicamente presente a livello del reticolo endoplasmatico.

In figura 30 è rappresentato il western immunoblotting relativo ai livelli della subunità α della pompa Na^+/K^+ ATPasi determinato sia sui campioni di membrana plasmatica sia sui campioni mitocondriali. Tale proteina è presente esclusivamente a livello della membrana plasmatica; la sua completa assenza dalla preparazione mitocondriale indica che quest' ultima non è stata contaminata da membrane sarcolemmatiche.

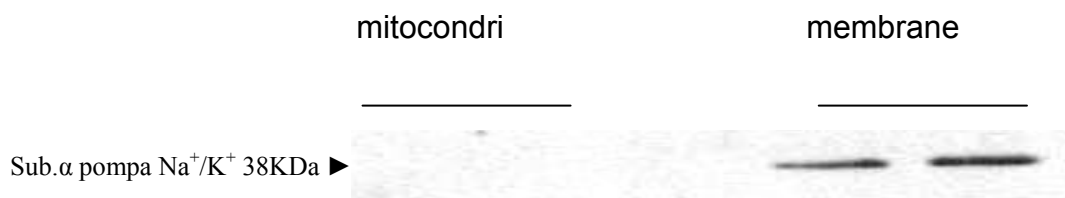


Figura 30 : Western immunoblotting relativo ai livelli della sub α della pompa Na^+/K^+ ATPasi in lisati ottenuti da mitocondri e membrane plasmatiche.

Il western immunoblotting relativo a UCP3 (figura 31) dimostra che tale proteina è presente a livello mitocondriale ma non a livello della membrana sarcoplasmatica.

Ciò ci permette di affermare che la preparazione di membrane di origine sarcoplasmatica non è contaminata da mitocondri.

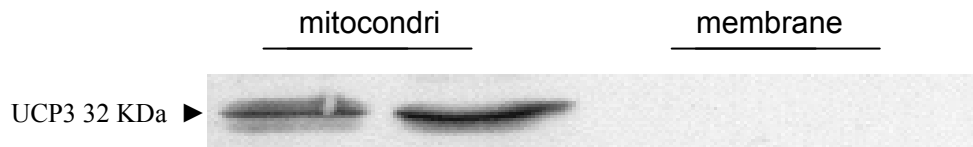


Figura 31: Western immunoblotting relativo ai livelli della proteina UCP3 in lisati ottenuti da mitocondri e membrane plasmatiche.

La preparazione mitocondriale non risulta contaminata neanche da membrane del reticolo endoplasmatico dato che la prima è priva di SCD1. (fig 32)



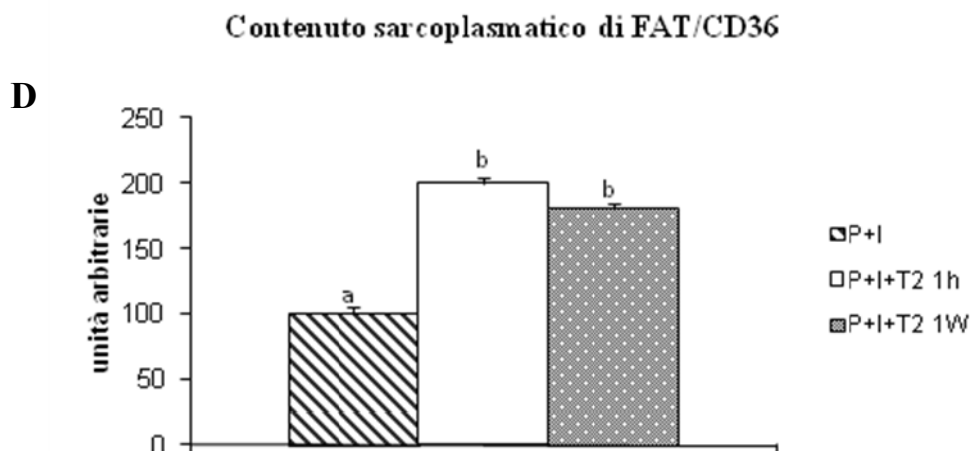
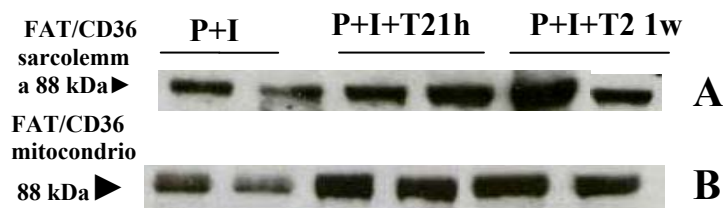
Figura 32 : Western immunoblotting relativo ai livelli della proteina SCD1 in lisati ottenuti da mitocondri e membrane plasmatiche.

La somministrazione della T2 ad animali ipotiroidei influenza anche la redistribuzione della proteina all'interno della cellula. Infatti, già dopo 1 ora dalla somministrazione della iodotironina, si riscontra un significativo incremento dei livelli sarcoplasmatici di FAT/CD36 (+68%), un simile effetto si osserva anche dopo trattamento cronico con T2. Questi dati indicano che la T2, induce la traslocazione di

FAT/CD36 dal compartimento endosomiale verso il sarcolemma, incrementando l'uptake tissutale di acidi grassi.

Inoltre per quanto riguarda i livelli mitocondriali di FAT/CD36, la somministrazione di T2 a ratti ipotiroidei li incrementa significativamente. In particolare in una sola ora dalla sua somministrazione la T2 induce un notevole incremento (+ 550%) rispetto ai controlli ipotiroidei. Tale stimolazione si mantiene anche in seguito ad una somministrazione cronica della stessa iodotironina.

La rapida redistribuzione della proteina FAT/CD36 a livello mitocondriale indotta dalla T2, potrebbe influenzare la capacità della T2 di ossidare acidi grassi.



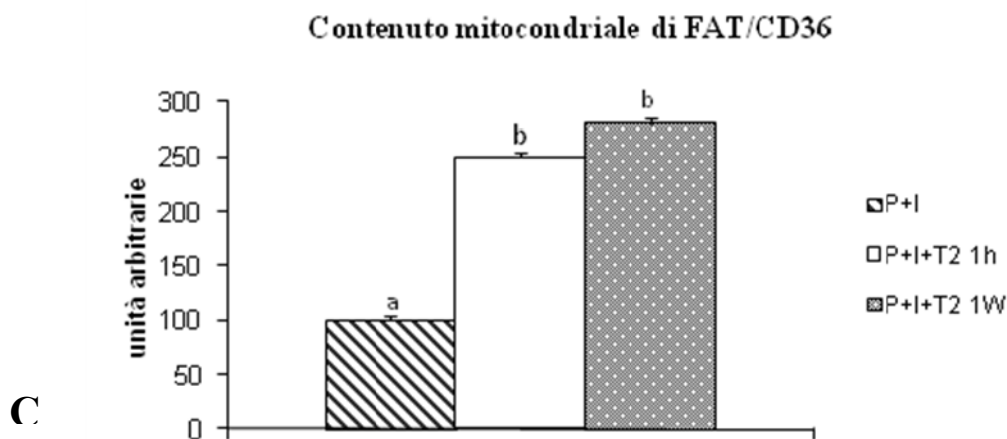


Figura 33: In alto è rappresentato western immunoblotting rappresentativo dei livelli sarcoplasmatici e mitocondriali di FAT/CD36 di animali, ipotiroidei (P+I), ipotiroidei trattati acutamente con T₂ (P+I+T2 1h) e ipotiroidei trattati concronicamente con T₂ (P+I+T2 1w). In basso è rappresentata la quantificazione densitometrica dei valori. I valori rappresentano la media ± ES ottenuti utilizzando sei animali per ogni gruppo sperimentale. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, con P<0,05.

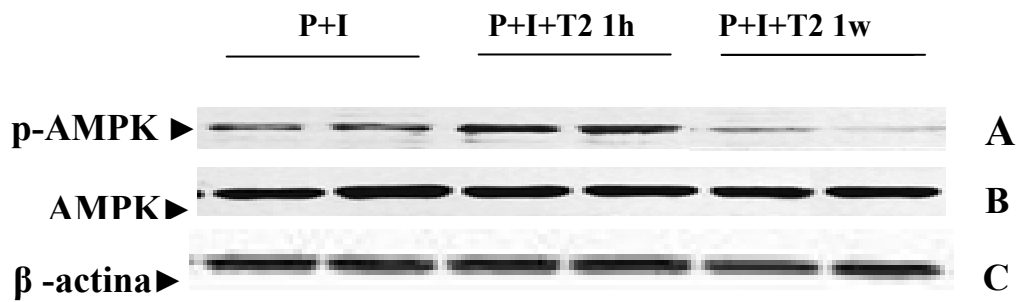
La T2 rapidamente attiva la via AMPK-ACC-malonilCoA nel muscolo gastrocnemio di ratti ipotiroidei

E' stato determinato se la via metabolica AMPK-ACC-malonil-CoA potesse essere coinvolta nell'effetto della T₂ nel dirigere la partizione lipidica del muscolo gastrocnemio verso l'ossidazione. A tale scopo sono stati valutati i livelli totali di AMPK e della sua forma attiva, ossia della sua forma fosforilata (residuo di serina 78). Inoltre sono stati determinati i livelli totali e della forma fosforilata dell'acilCoA carbossilasi (ACC) quale bersaglio di AMPK.

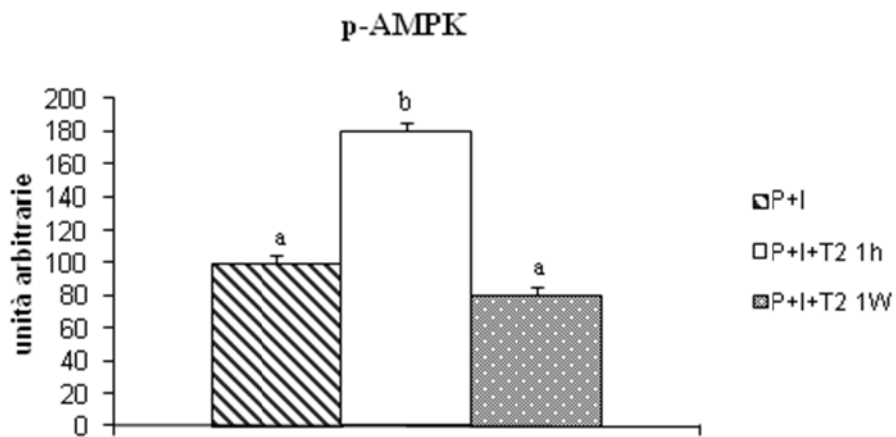
Per quanto riguarda AMPK, dalla figura 36 si evince che dopo un ora dalla somministrazione di T₂, i livelli di AMPK fosforilati risultano incrementati rispetto ai controlli ipotiroidei (+ 80). D'altro canto in seguito a trattamento cronico con T₂ i

livelli di AMPK fosforilati si riducono e diventano non significativamente differenti da quelli osservati nei ratti ipotiroidei

I livelli totali di AMPK non subiscono variazioni indotte dalla T2.



D



E

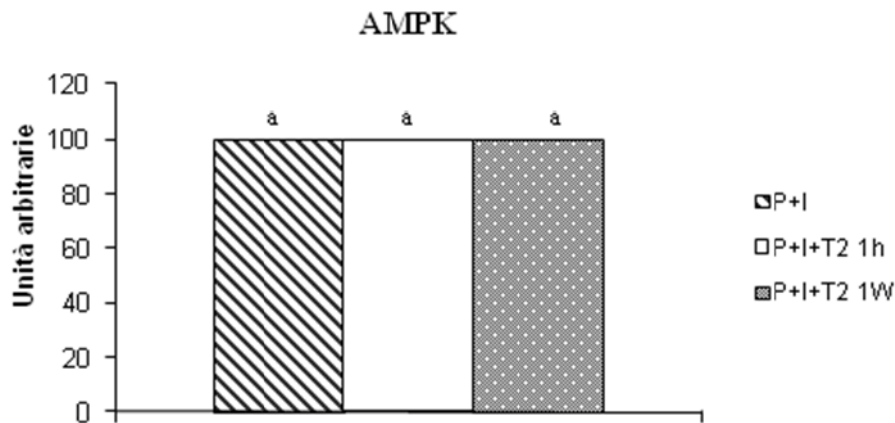
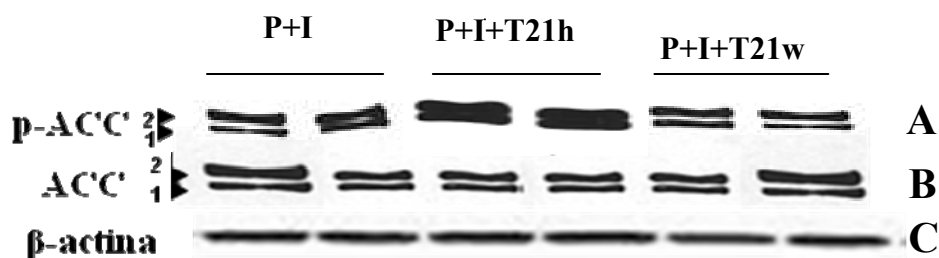
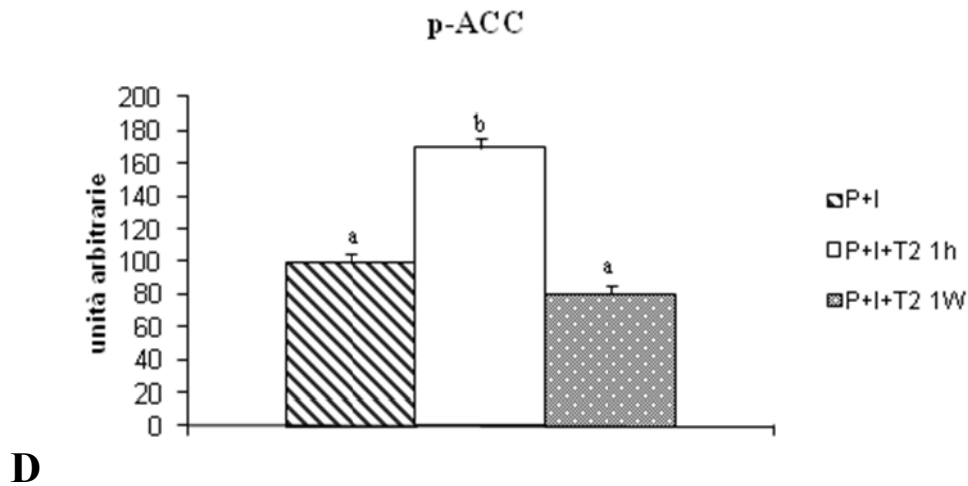


Figura 34: In alto è rappresentato il Western immunoblotting rappresentativo della forma fosforilata di AMPK (P-AMPK) (A) e della sua forma totale (AMPK) (B) determinata in lisati di gastrocnemio isolato da animali di controllo ipotiroidei (P+I) ed ipotiroidei trattati acutamente (P+I+ T2 1h) e cronicamente (P+I+T2 1 w) con T₂ e normalizzazione con β -actina.(C).In basso gli istogrammi rappresentano il rapporto tra forma fosforilata(D) e forma totale di AMPK (E) in ogni gruppo sperimentale. I valori rappresentano la media \pm ES ottenuti utilizzando cinque animali per ogni gruppo sperimentale. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$.

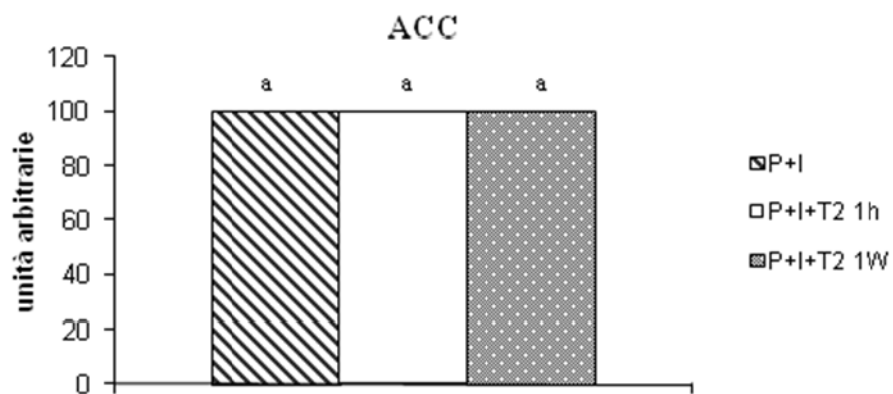
La forma fosforilata di ACC, bersaglio di AMPK, segue lo stesso andamento della chinasi AMPK fosforilata. Infatti come è possibile evidenziare dalla figura 35, ACC viene rapidamente fosforilata, nel residuo di serina 128, in seguito alla somministrazione acuta di T₂, ma in seguito a trattamento cronico i livelli si riducono e raggiungono valori simili a quelli degli animali ipotiroidei.

Anche in questo caso non si riscontrano variazioni dei livelli totali di ACC.





D



E

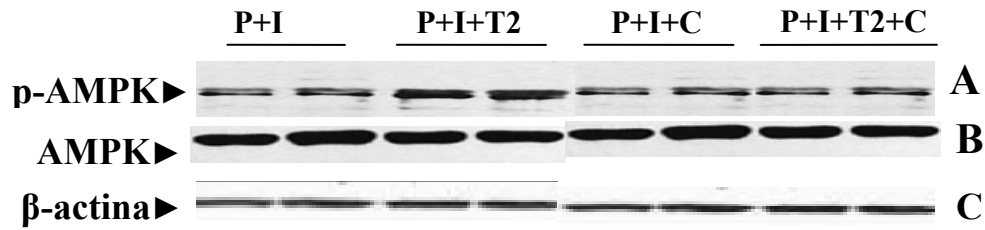
Figura 35: In alto è rappresentato il Western immunoblotting rappresentativo della forma fosforilata di p- ACC (A)e della sua forma totale (B) determinata in lisati di gastrocnemio isolato da animali di controllo ipotiroidici (P+I) ed ipotiroidici trattati acutamente (P+I+ T2 1h) e cronicamente (P+I+T2 1 w) con T₂ e normalizzazione con β -actina.(C)

In basso gli istogrammi rappresentano il rapporto tra forma fosforilata(D)e forma totale di (E) in ogni gruppo sperimentale. I valori rappresentano la media \pm ES ottenuti utilizzando cinque animal per ogni gruppo sperimentale. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statistiche significative, $P < 0,05$.

Coinvolgimento della via AMPK-ACC-malonil-CoA nei rapidi adattamenti del metabolismo lipidico del muscolo scheletrico indotti dalla T2.

Si è poi valutato se i rapidi adattamenti del metabolismo lipidico, osservati in seguito a somministrazione di T2 (attivazione dell'importo e l'ossidazione degli acidi grassi nei mitocondri, redistribuzione cellulare di FAT/CD36, attivazione della proton leak) potessero essere o meno il risultato dell'attivazione di AMPK. A tal fine si è scelto di valutare gli effetti esercitati dalla T2 in condizioni sperimentali in cui l'attivazione AMPK era prevenuta. L'inibizione della fosforilazione di AMPK è stata possibile somministrando il Compound C sia agli animali ipotiroidei di controllo sia a quelli trattati con T2.

In primis si è valutato se il Compound C fosse in grado di prevenire l'attivazione di AMPK da parte della T2. In figura 36 è mostrato il western immunoblotting dei livelli di AMPK totale e fosforilata in animali ipotiroidei (P+I), ipotiroidei trattati con T2 (P+I+T2), ipotiroidei trattati con Compound C (P+I+C) ed ipotiroidei trattati con T2 e con Compound C (P+I+T2+C). Come è possibile osservare la somministrazione di T2 ad animali ipotiroidei induce la fosforilazione di AMPK, ma tale fosforilazione è prevenuta dalla simultanea somministrazione di Compound C, indicando che il trattamento effettuato con tale composto è risultato efficace.



D

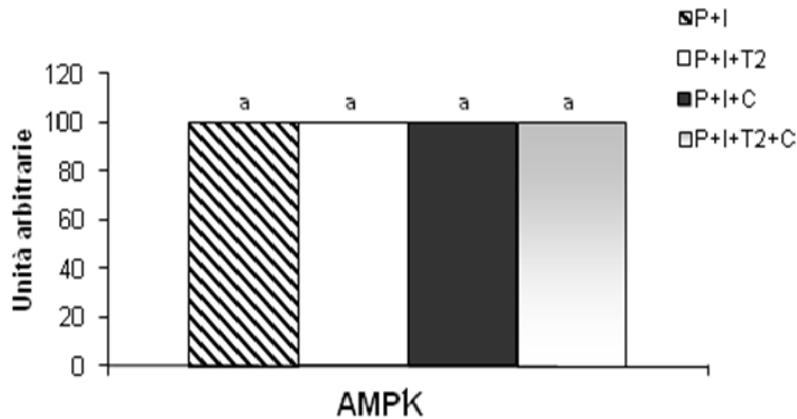
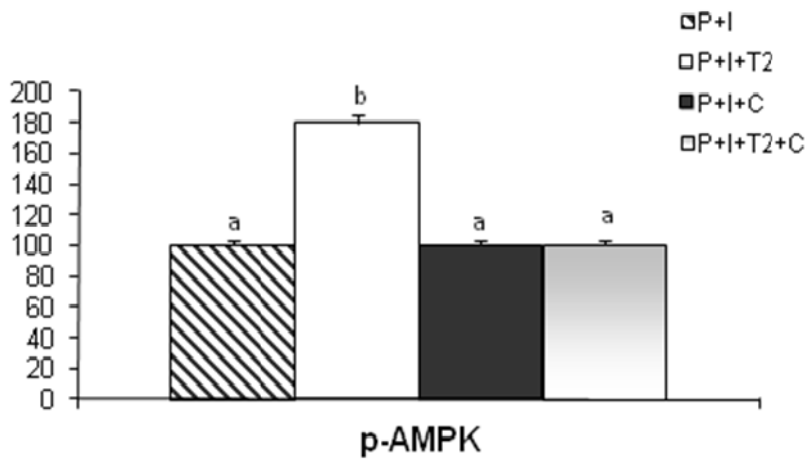


Figura 36 : Effetto del Compound C sulla prevenzione dell'attivazione di AMPK da parte della T2. Western immunoblotting rappresentativi dei livelli di AMPK fosforilati (A), totali (B) determinati in ratti ipotiroidici (P+I) , ipotiroidici trattati con T2(P+I+T2), ipotiroidici trattati con compound C (P+I+C) ed ipotiroidici trattati con T2 e compound C (p+I+T2+C). In C sono rappresentati i livelli di β -actina; utilizzati per la normalizzazione dei campioni .In D ed e sono riportati gli istogrammi che mostrano la quantificazione dei dati . I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti esperimenti, ciascuno effettuato in duplicato. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statisticamente significative, $P < 0.05$).

Come si evince dalla figura 37, che rappresenta l'attività di CPT negli stessi gruppi sperimentali l'attivazione di CPT indotta dalla T2 è prevenuta dalla presenza del compound C. Infatti non sono state riscontrate differenze nell'attività di CPT nei mitocondri isolati da animali P+I+C E P+I+T2+C. Il compound C, inoltre, previene anche l'induzione da parte della T2 dell'ossidazione del palmitoil-CoA (fig 38), che notoriamente, per essere utilizzato come substrato per le ossidazioni mitocondriali, richiede l'importo nel mitocondrio mediato da CPT. Tali dati indicano che l'attivazione della via AMPK-ACC-malonilCoA è quindi alla base dell'effetto della T2 sull'incrementato importo e la successiva ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale. Il compound C, tuttavia, non modifica la capacità della T2 di attivare le vie respiratorie FADH dipendenti come è possibile dedurre dalla respirazione mitocondriale determinata utilizzando succinato come substrato. (fig 39)

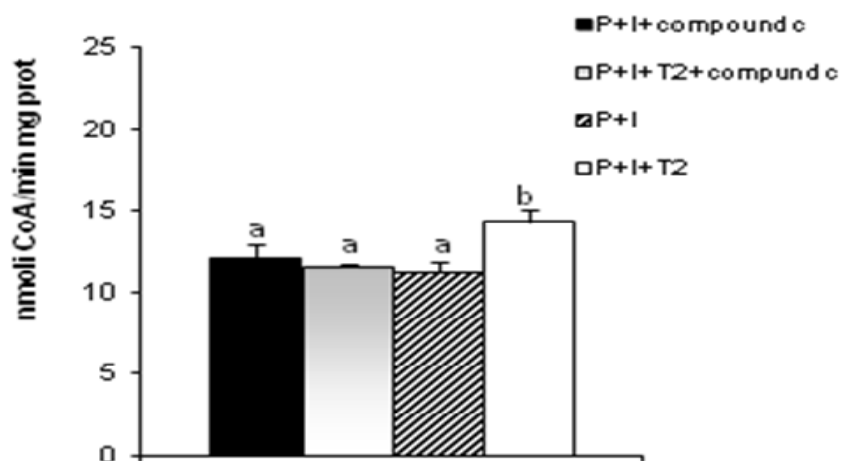


Figura 37: Effetti della somministrazione di T2 a ratti ipotiroidei sull'attività di CPT determinati in presenza ed in assenza di Compound C. I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti esperimenti, ciascuno effettuato in duplicato. Istogrammi marcati con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative

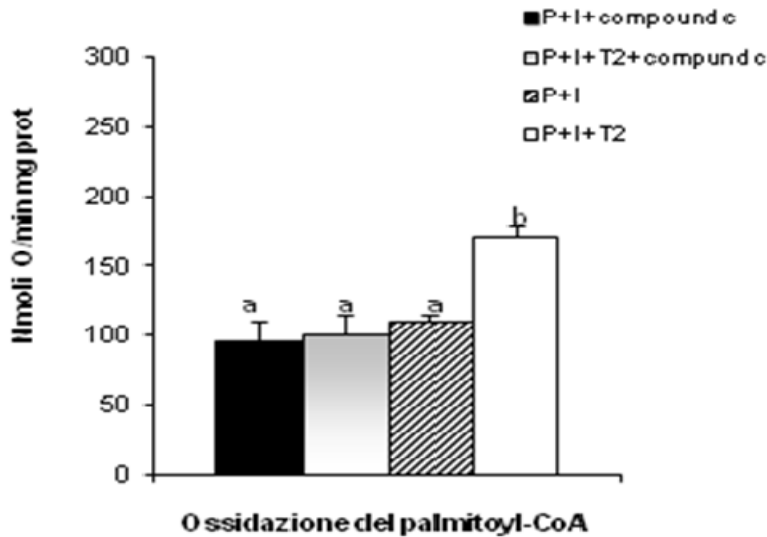


Figura 38: Effetti della somministrazione di T2 a ratti ipotiroidei sull'ossidazione del pamitoil CoA osservati in presenza e in assenza di Compound C. I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti esperimenti, ciascuno effettuato in duplicato. . Istogrammi marcati con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative

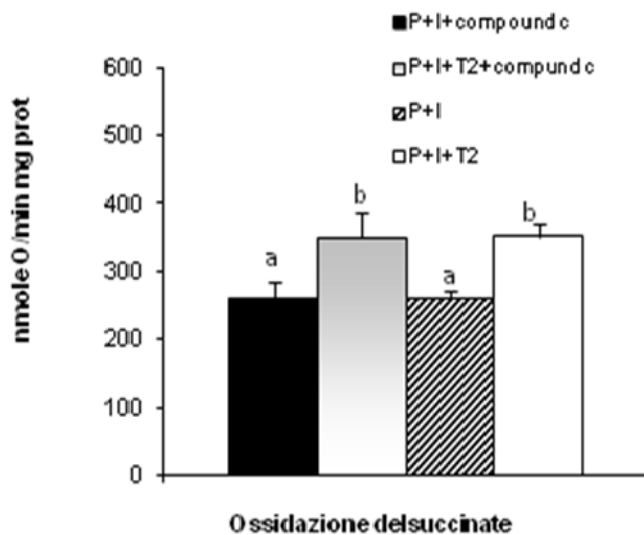
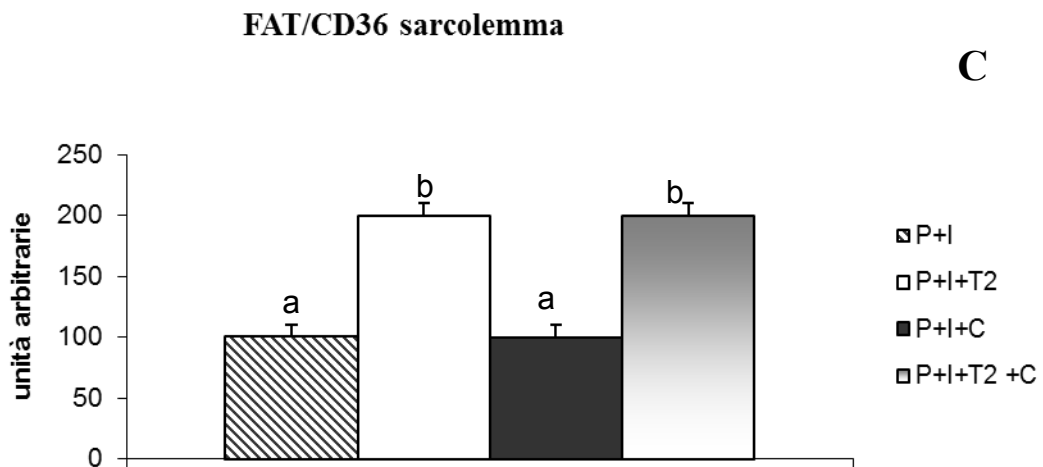
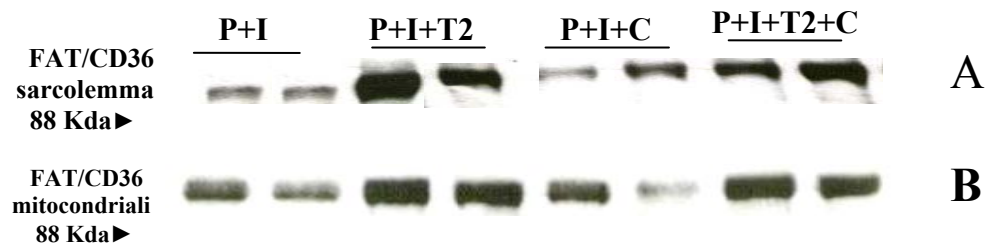
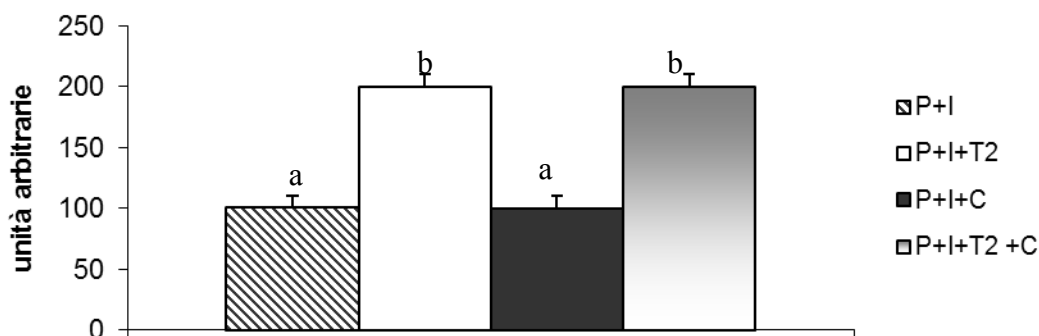


Figura 39 : Effetti della somministrazione di T2 a ratti ipotiroidei sulla via FADH dipendente osservati in presenza e in assenza di Compound C. I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti esperimenti, ciascuno effettuato in duplicato. . Istogrammi marcati con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative

Come si osserva dalla figura 40 anche gli adattamenti metabolici che vedono coinvolta la redistribuzione di FAT/CD36 non sono influenzati dalla attivazione di AMPK. Infatti, la presenza di compound C non previene la capacità della T2 di incrementare i livelli sarcoplasmatici e mitocondriali della proteina.



FAT/CD36 mitocondri



D

Figura 40: Effetto del Compound C sulla capacità della T2 di incrementare i livelli sarolemali e mitocondriali di FATCD36. Western immunoblotting rappresentativi dei livelli di FATCD36 a livello del sarcolemma(A), e mitocondriali(B) determinati in ratti ipotiroidei (P+I), ipotiroidei trattati con T2(P+I+T2), ipotiroidei trattati con compound C (P+I+C) ed ipotiroidei trattati con T2 e compound C (P+I+T2+C). In D ed e sono riportati gli istogrammi che mostrano la quantificazione dei dati. I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti esperimenti, ciascuno effettuato in duplicato. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statisticamente significative, $P < 0.05$).

Per valutare se il disaccoppiamento mitocondriale indotto dalla T2 fosse il risultato di dell'attivazione di AMPK, è stato determinato se il compound C potesse prevenire l'effetto stimolatorio della T2 sulla cinetica della proton leak.

Come mostrato in figura 41, si può notare che la cinetica della proton leak misurata in mitocondri isolati da ratti P+I+T2+compound C è stimolata rispetto a quella dei mitocondri P+I+C, in quanto la prima è spostata verso l'alto. Inoltre le cinetiche della proton leak determinate in mitocondri provenienti da ratti P+I ed P+I+C sono completamente sovrapponibili indicando che il compound C non influenza la cinetica della proton leak degli animali ipotiroidei. Analogamente, si può osservare che non ci

sono differenze nella cinetica della proton leak tra mitocondri di ratti P+I+T2 e ratti P+I+T2+C. Tali dati indicano che l'attivazione della proton leak da parte della T2 è indipendente dalla via AMPK-ACC-malonil-CoA. .

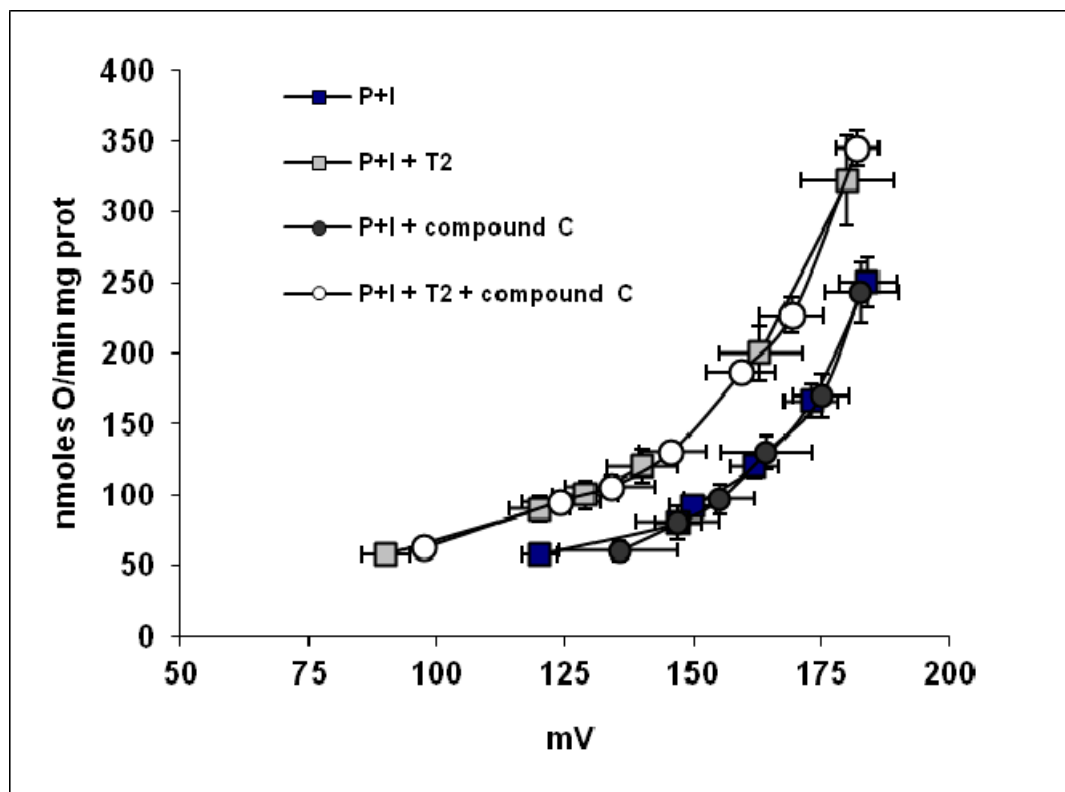


Figura 41: Effetto del Compound C sulla cinetica della proton leak indotta dalla T2 in animali ipotiroidei (hypo) e in animali ipotiroidei trattati con T2 (P+I+T2).I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti esperimenti, ciascuno effettuato in duplicato.

Effetto della T2 sull'attività mitocondriale della PLA2

Per valutare se un incremento degli acidi grassi mitocondriali potesse spiegare il rapido effetto della T2 sulla proton leak, si è determinato la capacità della iodotironina di attivare l'enzima fosfolipasi A2 mitocondriale, in quanto questo enzima è in grado di idrolizzare i lipidi delle membrane e liberare acido arachidonico. Come riportato in figura 42 è possibile osservare che la somministrazione acuta di T2 comporta un notevole incremento dell'attività di della PLA2 (+120%), che sembra, pertanto, garantire la presenza di elevati livelli mitocondriali di acidi grassi in presenza di T2.

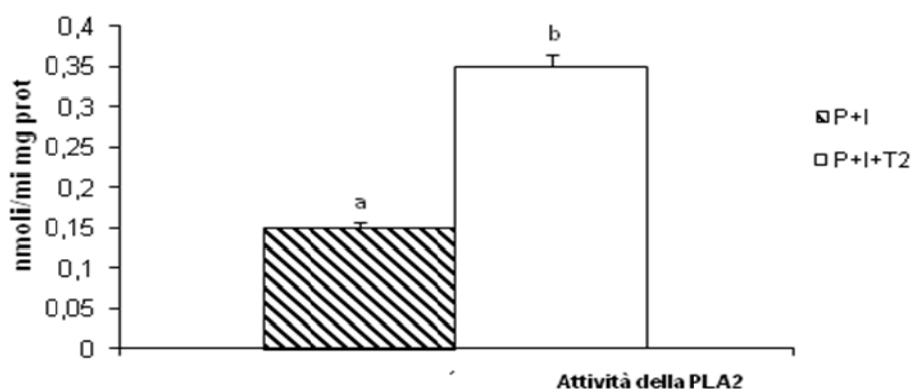


Figura 42 :Variazione dell'attività della PLA2 in animali ipotiroidei trattati con T2 (P+I+T2) rispetto ad animali ipotiroidei di controllo (P+I).I valori riportati rappresentano la media \pm ES di 5 differenti esperimenti, ciascuno effettuato in duplicato. Le colonne contrassegnate con lettere differenti indicano variazioni statisticamente significative, $P < 0.05$).

DISCUSSIONE

Nonostante il grado di malnutrizione esistente sul pianeta, secondo l'organizzazione mondiale della sanità, l'obesità rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica mondiale. Essa è considerata una malattia cronica determinata da un eccessivo accumulo di tessuto adiposo e da un'alterazione del bilancio energetico; la stessa è associata a complicanze a carico dei sistemi scheletrico, respiratorio, cardiocircolatorio e riproduttivo. Tale patologia è legata ad abitudini alimentari e stili di vita scorretti, ovvero iperalimentazione e sedentarietà eccessiva. Nonostante una dieta sana, accompagnata da esercizio fisico costituisca le basi per la terapia preventiva e curativa dell'obesità, in alcuni soggetti tali interventi non sono sufficienti ed è necessaria una terapia farmacologica.

L'utilizzo di farmaci in grado di incrementare la velocità metabolica a riposo, di attivare l'ossidazione dei grassi ed allo stesso tempo di rendere inefficiente tale processo, permetterebbe di indurre la riduzione di peso nei pazienti obesi, evitando l'insorgenza di problemi associati all'utilizzo di farmaci anoressizzanti. Un tale tipo di farmaco avrebbe anche il vantaggio di promuovere la perdita di massa grassa piuttosto che di massa magra e di favorire il miglioramento di patologie associate ad un accumulo ectopico di grassi (quali ad esempio la steatosi epatica e l'insulino-resistenza). La nota capacità degli ormoni tiroidei di incrementare la spesa energetica e di produrre un calo ponderale ne ha favorito l'utilizzo come farmaco anti-obesità. Tuttavia, la perdita di peso indotta era attribuibile sia a riduzione dell'adiposità che della massa magra dell'individuo. Inoltre, poiché la somministrazione prolungata di

ormone tiroideo induceva tireotossicosi ed alterazioni a carico del sistema cardiovascolare, scheletrico e muscolare l'uso della T3 come farmaco antiobesità è stato abolito; l'attenzione si è così spostata sullo sviluppo di analoghi dell'ormone tiroideo, che ne preservino l'efficacia anti-obesità ed che al contempo non inducono tireotossicosi. (Baxter JD, Webb P .2009)

Gli studi effettuati negli ultimi 15 anni hanno rivelato che la T2, un metabolita della T3, considerato per molti anni solo un prodotto di inattivazione della T3, è una iodotironina biologicamente attiva che presenta attività eccito-metabolica significativa. Essa, quando somministrata a ratti ipotiroide è in grado di incrementare la velocità mitocondriale di ossidare i substrati e la capacità ossidativa dei tessuti metabolicamente attivi (*Lombardi e coll 1998, Lanni e coll 1996, Moreno e coll 1997*). Tali effetti si riflettono in un incremento della spesa energetica dell'animale "in toto" (*Lanni e coll 1996, Moreno e coll 1997*). Quando somministrata a ratti alimentati con una dieta iperlipidica, la 3,5-T2 ne riduce il guadagno di peso corporeo, il contenuto della massa grassa, i livelli di trigliceridi e di colesterolo (*Lanni 2005, de Lange 2011*). In tali animali la T2 previene anche l'insorgenza della steatosi epatica e dell'insulino resistenza, patologie strettamente associate all'obesità ed all'accumulo ectopico di trigliceridi nei tessuti cosiddetti "magri". Dal punto di vista clinico, è di cruciale importanza che la somministrazione cronica di T2 non induce tireotossicosi. Infatti gli animali che ricevono T2 non presentano alterazioni a carico dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (*Lanni e coll 2005*) , del sistema cardiovascolare e non manifestano riduzione del contenuto proteico corporeo (*de*

Lange e coll 2005), alterazioni che, come citato precedentemente, si riscontrano in seguito a somministrazione cronica di T3. Quanto descritto suggerisce l'uso farmacologico della T2 al fine di contrastare l'obesità e le patologie ad essa associate che sono generalmente conseguenti ad accumulo ectopico di grassi.

In questo contesto è di notevole importanza individuare i tessuti bersaglio della T2 ed i meccanismi molecolari attraverso i quali la stessa iodotironina esercita i suoi effetti biologici .

I risultati ottenuti durante il dottorato di ricerca hanno permesso di individuare il muscolo scheletrico come tessuto bersaglio della T2, di cui ne influenza il metabolismo lipidico.

I dati riportati nella presente tesi indicano che la T2 è in grado di incrementare il metabolismo di riposo e la produzione di calore dell'animale in toto, tali effetti, evidenti già dopo un giorno di trattamento con la iodotironina, confermano quanto già presente in letteratura a riguardo (*Moreno1997*). La T2, inoltre, incrementa l'utilizzo dei lipidi come substrati energetici per le ossidazioni cellulari, come deducibile dalla riduzione del quoziente respiratorio (fig 16), ed il muscolo scheletrico è coinvolto in tale processo.

In particolare, la T2 influenza il metabolismo lipidico di tale tessuto attivando l'importo degli acidi grassi nei miociti, la loro ossidazione a livello mitocondriale, allo stesso tempo la T2 rende inefficiente l'ossidazione degli stessi acidi grassi.

Per quanto riguarda l'importo degli FFA nei miociti, è da considerare che questo processo dipende sia dalla loro concentrazione serica sia dalla presenza di proteine di

trasporto presenti sulla membrana sarcoplasmatica, tra cui svolge un ruolo chiave FAT/CD36 (*A. Bonen e coll., 2008*). L'effetto della T2 sull'importo degli FFA sembra essere dovuto principalmente ad una up-regolazione dei livelli sarcoplasmatici di FAT/CD36, piuttosto che alla mobilizzazione degli acidi grassi dai depositi adiposi che ne influenza la disponibilità per i vari tessuti, come è possibile evincere dai livelli serici di glicerolo che non sono influenzati dal trattamento cronico con T2 (fig 19). L'up-regolazione dei livelli sarcoplasmatici di FAT/CD36 è molto rapido, in quanto si verifica in 1 ora dalla somministrazione in vivo di T2 a ratti ipotiroidei; ciò suggerisce che tale iodotironina influenza la ridistribuzione cellulare di FAT/CD36, promuovendone la traslocazione dai depositi intracellulari verso il sarcolemma.

I dati riportati indicano anche che la T2 incrementa l'ossidazione degli acidi grassi mitocondriali, tale processo è evidente qualsiasi sia il substrato utilizzato: palmitato, palmitoil-CoA, palmitoil carnitina.

E' ben noto che l'importo degli acidi grassi nel mitocondrio è una tappa limitante nel processo di ossidazione degli acidi grassi. Questo può essere modulato variando 1) la disponibilità degli substrati per l'acil-CoA sintetasi e per la carnitina palmitoil-transferasi 2) l'attività del complesso della carnitina palmitoil transferasi (ed in particolare dell'enzima carinitina palmitoil tranferasi 1

Per quanto concerne il primo punto, negli ultimi anni sta emergendo il ruolo cruciale svolto da FAT/CD36 (*Smith e coll 2011*.) che, quando localizzato a livello della membrana mitocondriale esterna, legherebbe gli FFA e gli acil-CoA e ne aumenterebbe la disponibilità rispettivamente per l'Acil-CoAsintetasi e per CPT1. I

dati ottenuti a riguardo indicano che, analogamente a quanto si osserva per i livelli di FAT/CD36 sarcoplasmatici, la T2 promuove una rapida traslocazione di FAT/CD36 dai depositi intracellulari verso i mitocondri (fig 33), incrementando, quindi, la disponibilità di substrati lipidici da importare nel mitocondrio. Tale processo, essendo anche associato ad una maggiore attività del complesso della carnitina palmitil transferasi (fig 23), consente, quindi, di ottimizzare e velocizzare l'uptake mitocondriale di acidi grassi, tappa limitante l'ossidazione mitocondriale.

L'induzione dell'ossidazione dei substrati lipidici da parte della T2 è maggiore quando viene utilizzata palmitoil-CoA come substrato (+104%) rispetto a quando viene usata palmitoil carnitina (+80%). E' da considerare che l'ossidazione del palmitoil-CoA richiede l'intervento di CPT1, mentre l'ossidazione della palmitoil carnitina è indipendente da CPT1. Tali risultati avvalorano l'evidenza che CPT1 è un bersaglio della T2; inoltre l'evidenza che la T2 influenza significativamente anche l'ossidazione della palmitoil-carnitina suggerisce la presenza di altri bersagli della T2 a valle di CPT1. Infatti, la T2 è in grado di influenzare le vie respiratorie mitocondriali coinvolte nell'ossidazione del FADH, come possibile dedurre dall'effetto stimolatorio della T2 sulla capacità mitocondriale di ossidare il succinato (+rotenone) come substrato (tabella 1). D'altro canto l'inefficacia della T2 di influenzare la respirazione mitocondriale quando questi utilizzano piruvato(+malato) come substrato sembra escludere che le vie respiratorie NADH dipendenti possano essere bersaglio della T2 (tabella 2).

E' stato riportato che, nel mitocondrio, una riduzione del rapporto CoA-SH/acetil-CoA porta ad un accumulo di metaboliti intermedi della beta ossidazione che possono causare una inibizione della stessa beta ossidazione a più livelli (*Eaton S. e coll., 200*). Inoltre, la presenza di un eccesso di acil-CoA nella matrice mitocondriale sembra inibire lo scambio ADP/ATP e promuovere l'apoptosi dei miociti (*Shrago E, e coll., Mutomba MC e coll.,1995*). Un incrementato importo degli acidi grassi può drasticamente ridurre i livelli di CoA-SH, richiesti per supportare l'incrementata beta ossidazione. Tuttavia i dati riportati nella presente tesi indicano che l'aumentato importo degli acidi grassi nel mitocondrio è associato ad una incrementata attività della tioesterasi mitocondrial MTE-1, un enzima in grado di catalizzare l'idrolisi di acil-CoA in acido grasso libero e CoA. Nella loro globalità questi dati suggeriscono che la T2 promuove le reazioni che incrementano l'utilizzazione mitocondriale degli acidi grassi prevenendo:

- 1) la deplezione del pool di CoA libero mitocondriale
- 2) un'inibizione a feedback sulla beta ossidazione operata dai suoi stessi prodotti.

Oltre ad attivare l'ossidazione degli acidi grassi, la somministrazione di T2 a ratti ipotiroidei rende inefficiente l'ossidazione dei substrati a livello mitocondriale, e quindi anche quella degli acidi grassi. Infatti, la T2 attiva la proton leak mitocondriale ossia il rientro dei protoni attraverso la membrana mitocondriale interna verso la matrice non associato a sintesi di ATP. Attivando la proton leak, parte dell'energia che si libera dall'ossidazione dei substrati non viene utilizzata per la sintesi di ATP, bensì viene dissipata sotto forma di calore. Ciò comporta che, per sostenere le

richieste energetiche cellulari, una maggiore quantità di substrati deve essere ossidata (fig 25). L'effetto della T2 sulla proton leak dipende dalla presenza di acidi grassi liberi come mostrato in figura 25, infatti è abolito nel caso in cui gli acidi grassi endogeni mitocondriali vengono chelati dalla BSA. Tale dato è avvalorato dall'evidenza che la capacità della T2 di stimolare lo stato 4 della respirazione (cioè la respirazione mitocondriale in cui la fosforilazione di ADP ad ATP è assente e i mitocondri consumano ossigeno per bilanciare il rientro dei protoni verso la matrice) è circa il doppio quando valutato in presenza degli acidi grassi endogeni rispetto alla condizione in cui questi vengono chelati dalla BSA presente nel mezzo di incubazione (tabella 3).

Nonostante la T2 promuova un incremento dell'importo degli acidi grassi nel tessuto muscolare , l'aumentata ossidazione a livello mitocondriale, per di più inefficiente, non comporta alterazioni significative dei livelli di acidi grassi liberi intramuscolari e non ne consente la deposizione sotto forma di trigliceridi. Infatti, la somministrazione cronica di T2 a ratti ipotiroidei riduce significativamente i livelli di trigliceridi, suggerendo che la T2 potrebbe anche promuovere la loro degradazione.

E' ben noto che la chinasi AMPK svolge un ruolo chiave nel dirigere la partizione lipidica verso l'ossidazione (Carling D, e coll.,2011; Mofat C e coll.,2010) In particolare l'attivazione della via di segnalazione AMPK-ACC-malonil-CoA porta ad un rapida riduzione dei livelli di malonil-CoA, inibitore del sistema di trasporto della carnitina palmitoil trasferasi ed il conseguente importo degli acil-CoA nel mitocondrio. I dati riportati nella presente tesi indicano che la chinasi AMPK, ed in

particolare la via di segnalazione AMPK-ACC-malonil-CoA, è coinvolta almeno in parte negli effetti della T2 sul lipidico del muscolo scheletrico.

Infatti, la T2 induce rapidamente l'attivazione di AMPK (cioè la sua fosforilazione sul residuo treonina 172.) e l'inattivazione di ACC (mediante fosforilazione sul residuo di serina 79), proteina bersaglio di AMPK, in un'ora dalla sua somministrazione in vivo a ratti ipotiroidei (fig 34;35). La stimolazione della via metabolica AMPK-ACC-malonil-CoA porta ad una rapida riduzione dei livelli di malonil-CoA, inibitore del sistema di trasporto della carnitina palmitoil transferasi ed il conseguente importo degli acil-CoA nel mitocondrio. Gli effetti rapidi, esercitati dalla T2 sul complesso della carnitina palmitoil transferasi, supportano quanto detto (fig 26).

E' da considerare però che gli effetti della T2 su AMPK sono transienti, infatti si verificano dopo 1 ora dalla somministrazione della iodotironina (fig 34), si mantengono alti dopo 24 ore (dati non mostrati) ma, in seguito a somministrazione cronica di T2, non si riscontrano differenze significative nella fosforilazione di AMPK tra ratti ipotiroidei e quelli trattati con T2 cronicamente per una settimana (fig 34). Da quanto detto è possibile ipotizzare che la rapida fosforilazione di AMPK sarebbe solo un segnale di inizio e/o di avvio per l'attivazione dei processi che portano all'ossidazione degli acidi grassi. Altri processi sarebbero coinvolti per il mantenimento a lungo termine dell'aumentata ossidazione degli acidi grassi.

Per valutare quali dei rapidi adattamenti del metabolismo lipidico, osservati in seguito a somministrazione di T2 (ridistribuzione cellulare di FAT/CD36, attivazione

dell'importo degli acidi grassi nei mitocondri, ossidazione mitocondriale degli acidi grassi, attivazione delle vie respiratorie FADH dipendenti, inefficienza della fosforilazione ossidativa) potessero essere il risultato dell'attivazione di AMPK, gli stessi sono stati valutati anche in condizioni sperimentali in cui l'attivazione di AMPK era prevenuta dalla presenza di un suo inibitore: il compound C.

Il compound C, somministrato in vivo, annulla l'effetto stimolatorio della T2 sull'attività di CPT e sull'ossidazione del palmitoil-CoA (fig 37;38), indicando che la via AMPK-ACC-malonilCoA è alla base dell'effetto della T2 sull'incrementato importo e la successiva ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale. D'altro canto, la capacità della T2 di attivare le vie respiratorie mitocondriali FADH dipendenti non è influenzata dalla presenza di compound C, indicando che la stimolazione da parte della T2 di tali vie è indipendente da AMPK.

In letteratura è riportato che l'attivazione di AMPK promuove la traslocazione di FAT/CD36 sulla membrana sarcoplasmatica e sui mitocondri (Holloway, Bonen 2008), ma tale evento può essere innescato anche in seguito ad attivazione di altre chinasi tra cui Akt, MAPK, PKC (*Stefanyk LE e coll.,2011; Luiken JJ, e coll.,2004*). I dati riportati nella presente tesi indicano che l'attivazione di AMPK non è alla base dell'induzione della redistribuzione cellulare di FAT/CD36 da parte della T2 e nonostante il coinvolgimento di una delle chinasi sopra menzionate può essere ipotizzato, questo aspetto necessita ulteriori indagini.

Il meccanismo alla base dell'attivazione di AMPK potrebbe risiedere proprio nell'effetto stimolatorio della T2 sulla proton leak. Infatti, dall'attivazione della

proton leak consegue una minore capacità mitocondriale di sintetizzare ATP e quindi un aumento del rapporto AMP/ATP citosolico, noto essere uno dei principali fattori responsabili dell'attivazione di AMPK (Saha AK e coll., 2006). D'altro canto, come precedentemente descritto, affinché la T2 mostri il suo effetto sulla proton leak è richiesta la presenza degli acidi grassi endogeni mitocondriali. Per questo motivo, la stessa proton leak potrebbe essere una conseguenza dell'attivazione di AMPK. Infatti, l'induzione dell'importo degli acidi grassi attivati nel mitocondrio, mediato da AMPK, risulta essere concomitante ad un incremento dell'attività della tioesterasi mitocondriale. L'attivazione simultanea di questi due processi aumenta i livelli di acidi grassi a lunga catena a nel mitocondrio, ossia gli attivatori della proton leak.

Per valutare se l'induzione della proton leak da parte della T2 fosse “causa” o “effetto” dell'attivazione di AMPK, è stata determinato l'effetto della T2 sulla cinetica della proton leak in condizioni sperimentali in cui l'attivazione di AMPK era prevenuta dal compound C. I dati ottenuti indicano che l'effetto stimolatorio della T2 sulla proton leak è indipendente dall'attivazione di AMPK; è plausibile ipotizzare che l'induzione della proton leak sarebbe, quindi, l'evento alla base dell'attivazione di AMPK.

Poiché l'attivazione della proton leak, indotta dalla T2, richiede la presenza di acidi grassi liberi a lunga catena, ho valutato se tale iodotironina potesse indurre un incremento attraverso l'attivazione della fosfolipasi A2 mitocondriale, un enzima che appunto idrolizza i fosfolipidi di membrana e libera acido arachidonico. L'incremento di questo enzima osservato in un ora dalla somministrazione della T2 a

ratti ipotiroidici, sembra garantire la presenza di elevati livelli mitocondriali di acidi grassi liberi che sarebbero i responsabili dell'effetto della T2 sull'inefficienza della fosforilazione ossidativa mitocondriale.

CONCLUSIONI

In conclusione i dati ottenuti durante il mio dottorato di ricerca indicano che la T2 è una iodotironina in grado di indurre variazioni a carico del metabolismo lipidico del muscolo gastrocnemio ed hanno contribuito a chiarire i meccanismi molecolari alla base di tali variazioni. In particolare, i dati ottenuti hanno permesso di evidenziare che la T2 attiva l'importo degli acidi grassi nel tessuto e la loro successiva ossidazione a livello mitocondriale, la stessa iodotironina rende inefficiente l'ossidazione degli acidi grassi promuovendo processi termogenici a livello mitocondriale. Gli effetti indotti dalla T2 si manifestano molto rapidamente e permangono anche dopo trattamento cronico con la stessa .

Da quanto esposto, insieme alle evidenze già presenti in letteratura, relative all'assenza dell'insorgenza di uno stato tireotossico conseguente ad una somministrazione cronica di T2, è possibile ipotizzare l'uso farmacologico di tale iodotironina per la cura dell'obesità e di patologie associate ad un accumulo ectopico di grassi nel tessuto muscolare, quali ad esempio l'insulino- resistenza.

BIBLIOGRAFIA

Arnold S., Goglia F. and Kadenbach B. (1998) *3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. Eur.J.Biochem; 252(2):325-30*

Aschenbach, W. G., Hirshman, M. F., Fujii, N., Sakamoto, K., Howlett, K. F., and Goodyear, L. J. (2002) *Effect of AICAR treatment on glycogen metabolism in skeletal muscle. Diabetes 51, 567–573.*

Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. (2003) *Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. Mol Cell Endocrinol 213: 1-11.*

Bateman A. (1997).The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci* **22**: 12-13

Baxter JD, Webb P (2009).*Thyroid hormone mimetics: potential applications in atherosclerosis, obesity and type 2 diabetes. Nat Rev Drug Discov.;8(4):308-20*

Bergh JJ, Lin HY, Lansing L et al. (2005). *Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. Endocrinology 146: 2864-2871.*

Bezaire V., Bruce C.R., Heigenhauser G.J., Tandon N.N., Glatz J.F., Luiken J.J., Bonen A. and Spriet L.L. (2006)*Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. Am. J. Physiol Endocrinol Metab. 290: E509-E515*

Bonen A., Luiken J.J., Liu S., Dyck D.J., Kiens B., Kristiansen S., Turcotte L.P., Van Der vusse G.J. and Glatz J.F. (1998). *Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. Am.J.Physiol 275: E471-E478*

Campbell SE, Tandon NN, Woldegiorgis G et al. (2004). *A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. J Biol Chem 279: 36235-36241.*

Carling D, Mayer FV, Sanders MJ, Gamblin SJ (2011). *AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. Nat Chem Biol. 2011 18;7(8):512-8..*

Cao X, Kambe F, Moeller LC et al. (2005). *Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. Mol Endocrinol 19: 102-112.*

Cettour-Rose P, Theander-Carrillo C, Asensio C et al. (2005) *Hypothyroidism in rats decreases peripheral glucose utilisation, a defect partially corrected by central leptin infusion. Diabetologia 48: 624-633.*

Chen, Z., Heierhorst, J., Mann, R. J., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Witters, L. A., Lynch, G. S., Kemp, B. E., and Stapleton, D. (1999) *Expression of the AMP-activated protein kinase beta1 and beta2 subunits in skeletal muscle. FEBS Lett. 460, 343–348.12. Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., House, C. M., Stapleton.*

Cimmino M., Mion F., Goglia F., Minaire Y., Géloen A. (1996). *Demonstration of in vivo metabolic effects of 3,5-Diiodothyronine Journal of Endocrinol 149(2):319-25*

Crute B.E., Seefeld K., Gamble J., Kemp B.E. and Witter L.A. (1998). *Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase J.Biol.Chem; 273(52):35347-35354.*

Davis FB, Tang HY, Shih A et al. (2006) *Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. Cancer Res 66: 7270-7275.*

Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. (2008). *Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. Science Direct 29: 211-218.*

Davis PJ, Tillmann HC, Davis FB, Wehling M. (2002b) *Comparison of the mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone and steroid hormones. J Endocrinol Invest 25: 377-388.*

Davis PJ, Shih A, Lin HY et al. (2000) *Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. J Biol Chem 275: 38032-38039.*

De Lange P., Senese R., Cioffi F., Moreno M., Lombardi A., Silvestri E., Goglia F., Lanni A. (2008) *Rapid activation by 3,5,3'-L-triiodothyronine of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/acetyl-coenzyme A carboxylase and AKT/protein kinase B signalling pathways:relation to changes in fuel metabolism and myosin heavy-chain protein content in rat gastrocnemius muscle in vivo Endocrinology ; 149(12):6462-70.*

De Lange P., Cioffi F., Senese R., Moreno M., Lombardi A., Silvestri E., De Matteis R., Lionetti L., Mollica MP., Goglia F., Lanni A. (2011). *Nonthyrototoxic prevention of diet-induced insulin resistance by 3,5-diiodo-thyronine.* *Diabetes* Nov;60(11):2730-9. Epub 2011 Sep 16

Eaton S (2002) *Control of mitochondrial beta-oxidation flux.* *Prog Lipid Res* 41: 197–239,

Flamant F, Samarut J. (2003) *Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice.* *Trends Endocrinol Metab* 14: 85-90.

Forrest D, Vennström B. (2000) *Functions of thyroid hormone receptors in mice.* *Thyroid* 10: 41-52.

Glass CK. (1994). *Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers.* *Endocr Rev* 15: 391-407

Giardiello F.M., Brensinger J.D., Tersmette A.C., Goodman S.N., Petersen G.M., Booker S.V., Cruz-Correa M. And Offerhaus J.A. (2000) *Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome* *Gastroenterology* 119: 1447-1453

Goglia F., Lanni A., Barth J., Kadenbach B.(1994). *Interaction of diiodothyronines with isolated cytochrome C oxidase* *FEBS Lett.*;346(2-3):295-298

Hardie D.G., (2003). *The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status.* *Endocrinology* ;144(12):5179-83

Hardie D.G. (2005). *New roles for the LKB1-->AMPK pathway* *Curr. Opin. Cell. Biol.*;17(2):167-73

Hardie DG, Sakamoto K. (2006) *AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle.* *Physiology (Bethesda)* 21: 48-60.

Hawley S.A., Davison M., Woods A., Davies S.P., Beri R.K., Carling D. and Hardie D.G. (1996). *Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase.* *J. Biol. Chem.* 271: 27879-27887

Hawley S.A., Boudeau J., Reid J.L., Mustard K.J., Udd L., Makela T.P., Alessi D.R. and Hardie D.G. (2003). *Complexes between the LKB1 tumor suppressor,*

STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **274**(4):28

Hawley S.A., Pan D.A., Mustard K.J., Ross L., Bain J., Edelman A.M., Frenguelli B.G., Hardie D.G. (2005). *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase* *Cell Metab.*; **2**(1):9-19

Holloway GP, Luiken JJ, Glatz JF et al. (2008) *Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview.* *Acta Physiol (Oxf)* **194**: 293-309.

Hörlein AJ, Näär AM, Heizel T et al. (1995) *Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor.* *Nature* **377**: 397-404.

Hudson E.R., Pan D.A., James J., Lucocq J.M., Hawley S.A., Green K.A., Baba O., Terashima T. and Hardie D.G. (2003) *A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias* *Current Biol.*; **13**(10):861-6

Hummerich H., Soboll S., Jucker B.M., Dufour S., Pen J., Cao X. et al. (1989) *Rapid stimulation of calcium uptake into rat liver by L-triiodothyronine* *PNAS* (2000); **97**:6880-6884

Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM et al. (2005) *The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase.* *J Biol Chem* **280**: 29060-29066

Ibrahimi A., Bonen A., Blinn W.D., Hajri T., Li X., Zhong K., Cameron R., Abumrad N.A. (1999). *Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin* *J. Biol. Chem.*; **274**(38):26761-6

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. (2005) *AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.* *Cell Metab* **1**: 15-25.

Kamei Y, Xu L, Heinzl T et al. (1996). *A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors.* *Cell* **85**: 403-414.

Kohrle J., Hesch R.O. and Oertel (1991).M. *Expression of iodothyronine deiodinase in cultured thyroid cells.* *Exp Clin Endocrinol.* 97:182-6.

Laemmli: standard Laemmli gel solutions (1970)

Lanni A., Moreno M., Cioffi M. and Goglia F.(1992) *Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver oxidative capacity.* *Mol.Cell.Endocrinol.* 86(3):143-148.

Lanni A., Moreno M., Lombardi A. and Goglia F. (1998) *3,5-diiodothyronine and 3,5,3'-triiodothyronine both improve cold tolerance of hypothyroid rats but possibly via different mechanism.* *Pflug.Arch. Eur.J.Physiol.* 436: 407.

Lanni A., Moreno M., Lombardi A. and Goglia F (1996). *Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat.* *J. Physiol.* 494(Pt3): 831-7.

Lanni A., Moreno M., Lombardi A., de Lange P., Silvestri E., Ragni M., Farina P., Baccari G.C., Fallahi P., Antonelli A. and Goglia F. (2005) *3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats.* *FASEB J.;*19(11):1552-4.

Lim C.T., Kola B., Korbonits M. and Grossman A.B.(2010) *Ghrelin's role as a major regulator of appetite and its other functions in neuroendocrinology.* *Prog Brain Res.;*182:189-205.

Luiken JJ, Coort SL, Koonen DP, Bonen A, Glatz JF.(2004) *Signalling components involved in contraction-inducible substrate uptake into cardiac myocytes.* *Proc Nutr Soc* 63(2):251-8. Review.

Lombardi A., Lanni A., Moreno M., Brand M.D. and Goglia F (1998) . *Effect of 3,5-di-iodo-L-thyronine on the mitochondrial energy-transduction apparatus.* *Biochem. J.;* 330(Pt1): 521-6.

Lombardi A, Beneduce L, Moreno M, Diano S, Colantuoni V, Ursini MV, Lanni A, Goglia F. (2000)*3,5-diiodo-L-Thyronine regulates glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the rat.* *Endocrinology;* **141(5)**: 1729-34

- Mahlapuu, M., Johansson, C., Lindgren, K., Hjalms, G., Barnes, B. R., Krook, A., Zierath, J. R., Andersson, L., and Marklund, S. (2004)** *Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle.* *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E194–E200.
- Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM et al. (2006)** *Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway.* *Nucl Recept Signal* 4.
- Mollica M.P., Lionetti L., Moreno M., Lombardi A., De Lange P., Antonelli A., Lanni A., Cavaliere G., Barletta A. and Goglia F. (2009).** *3,5-Diiodo-L-thyronine, by modulating mitochondrial functions reverses hepatic fat accumulation in rats fed a high-fat diet.* *J. Hepatol*; 51 (2):363-70
- Moreno M., Lanni A., Lombardi A. and Goglia F. (1997).** *How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines.* *J. Physiol* ;505(Pt2):529-38
- Moreno M., Silvestri E., Lombardi A., Visser T.J., Goglia F. and Lanni A. (2003)** *Identification of 3,5-diiodothyronine-binding proteins in rat liver cytosol by photoaffinity labelling.* *Endocrinology*; 144(6):2297-303
- Mutomba MC, Yuan H, Konyavko M, Adachi S, Yokoyama CB, Esser V, McGarry JD, Babior BM, Gottlieb RA.(2000)** Regulation of the activity of caspase by L-carnitina and palmitoyl carnitina. *Febs* 28;478(1-2):19-25.
- Noy N., Donnelly T.M. and Zakim D. (1986).** *Physical-chemical model for the entry of water-insoluble compounds into cells. Studies of fatty acid uptake by the liver* *Biochemistry* 25:2013-2021
- O'Reilly I. and Murphy M.P. (1992)** *Studies on the rapid stimulation of mitochondrial respiration by thyroid hormones.* *Acta Endocrinol Dec*; 127(6): 542-546.
- Park H., Kaushik V.K., Constant S., Prentki M., Przybytkowski E., Ruderman N.B. and Saha A.K. (2002)** *Coordinate regulation of malonyl-CoA-decarboxylase sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA-carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise*

J. Biol. Chem. **277(36)**:32571-32577

Pfahl M. (1993). *Nuclear receptor/AP-1 interaction. Endocr Rev* **14**: 651–658.

Polekhina G., Gupta A., Michell B.J., Van Denderen B., Murthy S., Feil S.C., Jennings I.G., Campbell D.J, Witters L.A., Parker M.W., Kemp B.E. and Stapleton D. (2003). *AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen* *Current Biol.*; **13(10)**:867-871

Saha A.K., Schwarsin A.J., Roduit R., Masse F., Kaushik V., Tornheim K., Prentki M. and Ruderman N.B.(2000). *Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside* *J. Biol Chem.* **275(32)**:24279-83.

Scapin S, Leoni S, Spagnuolo S, Gnocchi D, De Vito P, Luly P, Pedersen JZ, Incerpi S. (2009a) *Short-term effects of thyroid hormones during development: focus on signal transduction* *Steroid [Epub ahead of print]*

Scapin S, Leoni S, Spagnuolo S, Fiore AM, Incerpi S. (2009b) *Short-term effects of thyroid hormones on Na⁺/K⁺-ATPase activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on signal transduction* *Am. J. Physiol Cell Physiol.*; **296(1)**: C4-12

Shrago E, Woldegiorgis G, Ruoho AE, DiRusso CC. 1995 *Fatty acyl-CoA esters as regulators of cell metabolism. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **52**: 163–166, 31.

Smith BK, Jain SS, Rimbaud S, Dam A, Quadrilatero J, Ventura-Clapier R, Bonen A, Holloway GP.(2011). *FAT/CD36 is located on the outer mitochondrial membrane, upstream of long-chain acyl-CoA synthetase, and regulates palmitate oxidation.* *Biochem J.* Jul 1; **437(1)**:125-34.

Stapleton, D., Mitchelhill, K. I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B. J., Teh, T., House, C. M., Fernandez, C. S., Cox, T., Witters, L. A., and Kemp, B. E. (1996) *Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily.* *J. Biol. Chem.* **271**, 611–614.

Stefanyk LE, Gulli RA, Ritchie IR, Chabowski A, Snook LA, Bonen A, Dyck DJ.(2011). *Recovered insulin response by 2 weeks of leptin administration in high-fat*

fed rats is associated with restored AS160 activation and decreased reactive lipid accumulation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011 Jul;301(1):R159-71.

Steinberg, G. R. and Kemp, B. E. (2009) *AMPK in health and disease. Physiol. Rev. 89, 1025–1078*

St. Germain D.L. and Galton V.A. (1997)*The deiodinase family of selenoproteins Thyroid ;7(4):655-68*

Tagami T, Madison LD, Nagaya T, Jameson JL. (1997) *Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. Mol Cell Biol 17: 2642-2648.*

Taylor, E. B., An, D., Kramer, H. F., Yu, H., Fujii, N. L., Roeckl, K. S., Bowles, N., Hirshman, M. F., Xie, J., Feener, E. P., and Goodyear, I. J. (2008) *Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. J. Biol. Chem. 283, 9787–9796.*

Toyoda T., Tanaka S., Ebihara K., Masuzaki H., Hasaba K., Sato K., Fushiki T., Nakao K. And Hayashi T. (2006)*Low-intensity contraction activates the alpha1-isoform of 5'-AMP-activated protein kinase in rat skeletal muscle Am. J. Physiol Endocrinal Metab.;290(3):E583-90*

Visser T.J. Metabolism of thyroid hormone. (1988) In: Coke BA, King RJB, Van der Molen HJ (eds) *Hormones and their actions, part I.* Elsevier, Amsterdam p81.

Williams GR, Bassett JH.*Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. J Endocrinol. 2011 Jun;209(3):261-72.*

Winder W.W., Hardie D.G. (1996).*Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise Am. J. Physiol ;270(2Pt1):E299-304*

Woods A., Dickerson K., Heath R., Hong S.P., Momcilovic M., Jahnstone S.R. Carlson M. and Carling D. (2005).*Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells Cell. Metab. 2(1):21-33*

Yen PM. (2001) *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action.*
Physiol Rev **81**: 1097-1142.