

## Sommario

La dieta mediterranea (MD) è stata segnalata come un approccio nutrizionale per la prevenzione di disturbi metabolici che possono causare l'obesità, il diabete e la steatosi epatica. Questa proprietà è stata ampiamente assegnata all'acido oleico e composti polifenolici presenti nell'olio d'oliva (OO), la principale fonte di grasso della dieta mediterranea. Nonostante, ci sono delle controversie per quanto riguarda le conseguenze di una ingestione esagerata dell'olio extra vergine d'oliva (EVOO).

Il consumo prolungato di diete ricche in grassi può indurre l'obesità, resistenza all'insulina e la steatoepatite non alcolica (NASH). La disfunzione della dinamica mitocondriale e lo stress del reticolo endoplasmatico (ER stress) sono stati associati all'istituzione di questi disturbi. Il meccanismo può coinvolgere la prevalenza del processo di fissione sul processo di fusione mitocondriale eppure lo stress del reticolo endoplasmatico, con la attivazione della risposta a proteine malpiegate (UPR) e di conseguenza la stimolazione delle vie infiammatorie. I grassi della dieta producono effetti diversi per quanto riguarda il loro grado di lipotossicità. I grassi saturi sono considerati quelli più nocivi mentre il grasso monoinsaturo acido oleico è stato ritenuto protettivo contro la lipotossicità. Benché i dati rispetto ai meccanismi coinvolti così come la relazione dose-risposta sono ancora inconcludente.

Dato che il fegato è un organo chiave per la manutenzione dell'omeostasi metabolica eppure abbastanza suscettibile alle modificazioni dietetiche, valutare gli effetti del consumo di diete ricche in grassi nel fegato è rilevante. Con l'obiettivo di stabilire questi aspetti, abbiamo utilizzato sia un approccio in vivo che in vitro.

Lo studio con animale di questa ricerca ha verificato parametri come il peso corporeo, parametri sierici ed epatici dopo un consumo prolungato di diete costituite di due quantità diverse di olio d'oliva: una dieta con quantità normale di grasso ed un'altra con alto contenuto di grassi. In modo da analizzare ampiamente il metabolismo epatico, un studio di proteoma è stato utilizzato.

Topi di due mesi di età sono stati alimentati per 12 settimane con diete normolipidiche (9,5% della energia totale di grassi) contenendo olio di soia (dieta controllo, C), oppure EVOO (dieta NO) o una dieta EVOO hiperlipidica (HO, 39% della energia totale di grassi). Il peso corporeo e l'ingestione di alimenti sono stati misurati settimanalmente e i parametri sierici sono stati analizzati attraverso metodi enzimatici.

L'analisi proteomica è stata realizzata per LC-MS/MS e i dati proteomici sono stati analizzati per one-way ANOVA e per il test post-hoc Tukey e per la correzione di Benjamini-Hochberg. L'analisi di arricchimento delle vie è stata realizzata con il test di Fisher e corretta per l'approccio di Bonferroni.

Il consumo prolungato della dieta ricca di grassi (gruppo HO) ha represso l'ingestione di alimenti ed energia, ha ridotto i trigliceridi sierici mentre ha mantenuto gli schemi normali di guadagno di peso corporeo, adiposità corporea e livello di glucosio nel sangue. Nonostante, questa dieta ha aumentato il livello di colesterolo totale nel sangue eppure la massa epatica, oltre una tendenza al rialzo del contenuto di grasso nel fegato.

L'analisi proteomica del fegato ha identificato 2318 proteine e, dopo l'applicazione del criterio di inclusione, 487 proteine sono stati quantificati. Queste proteine sono stati assegnate in 27 vie arricchite in modo significativo, di cui 7 vie sono stati modificate nel gruppo HO rispetto ad entrambi C e NO gruppi (metabolismo di lipidi, metabolismo di acidi grassi, gluconeogenesi, metabolismo degli aminoacidi e derivati, ciclo dell'acido citrico, catena di trasporto degli elettroni e ossidazioni biologiche).

L'esame delle vie proveniente dei dati proteomici ha suggerito una stimolazione della ossidazione degli acidi grassi in entrambi mitocondri e perossisomi e inibizione della sintesi dei lipidi a partire dall'acidi grassi di catena lunga (LCFA) e dell'attività gluconeogenica nel gruppo HO. All'opposto, sebbene il gruppo NO non ha presentato nessuna modificazione significativa nel studio proteomico epatico, questo gruppo ha presentato riduzione nel grasso e guadagno di peso corporeo, riduzione nel livello di trigliceridi e glucosio sierici, senza presentare ipercolesterolemia. Secondo i dati del studio proteomico, questi risultati ci permette la ipotesi della occorrenza di impostazioni metabolici parzialmente efficaci nel fegato dei topi del gruppo HO al fine di evitare gli effetti dannosi dovuti da un'ingestione prolungata di una dieta ricca in grassi.

D'altra parte, già che gli effetti benefici della dieta NO non sono stati assegnati agli effetti nel metabolismo epatico, si suggerisce che altri tessuti potrebbe aver partecipato di modo più rilevante.

Tenendo presente le indicazioni sperimentali di metabolismo mitocondriale alterato per il consumo della dieta HO, abbiamo realizzato esperimenti in vitro con le cellule HepG2 in modo da analizzare le conseguenze di dosi crescenti di oleato e palmitato negli aspetti della dinamica mitocondriale, della viabilità delle cellule, nell'apoptosi eppure nella UPR.

Gli acidi grassi saturo (palmitato) e monoinsaturo (oleato) sono stati somministrati in cinque dosi diverse (10, 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ ) e gli effetti sulle proteine coinvolti nei processi di dinamica mitocondriale sono stati analizzati, in un modello di culture cellulare (cellule epatiche, HEPG2) per 24 ore. Sono state condotte analisi di western blot per determinare il contenuto di proteine coinvolte nella fissione mitocondriale (DRP1, dynamin-related protein 1) e nella fusione mitocondriale (Mfn2, Mitofusin 2, marcatore del processo di fusione delle membrane mitocondriali esterne e Opa 1, Optic Atrophy 1, marcatore del processo di fusione delle membrane mitocondriali interne e del corretto ripiegamento delle creste mitocondriali).

Entrambi acidi grassi hanno ridotto la viabilità cellulare nelle dosi di 250 $\mu\text{M}$  e 500 $\mu\text{M}$ , e le dosi più elevate hanno innescato effetti più evidenti. Le due dosi più elevate di entrambi oleato e palmitato hanno causato aumento simile della attività apoptotica della Caspase 3.

I livelli della proteina GRP78 sono stati alzati solamente con la dose più bassa e con la dose più alta di palmitato, mentre nessuna differenza è stata indotta per oleato. I livelli della proteina MFN2 non sono stati modificati per nessun trattamenti, nonostante c'era una tendenza di aumento con tutte le dosi di oleato, mentre solamente le dosi di 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  di palmitato hanno promosso una tale tendenza. I livelli di OPA1 e DRP1 non sono stati modificati per nessun trattamento o dosi.

Questi risultati mostrano che l'acido grasso saturo ha promosso l'induzione della UPR ed una tendenza della fissione mitocondriale con le dosi basse, mentre le dosi più alte hanno causato tossicità con riduzione della viabilità cellulare.

Diversamente, l'acido grasso monoinsaturo ha promosso una tendenza di induzione della fusione mitocondriale con le dosi basse, associato con bassa tossicità anche con le dosi alte. Questo tipo di ricerca può aiutare a capire le vie cellulari attivate per nutrienti con effetti protettivi contro malattie metaboliche.

## ABSTRACT

The Mediterranean diet (MD) has been pointed out as a nutritional approach to prevent metabolic disturbances leading to obesity, diabetes and liver steatosis. These properties have been largely attributed to oleic acid and polyphenol compounds present in olive oil (OO), the main fat source of MD. However, there are controversies regarding the consequences of excessive extra virgin olive oil (EVOO) intake.

Prolonged high-fat feeding may induce obesity, insulin resistance, and non-alcoholic fatty liver disease. Dysfunction of mitochondrial dynamics along with endoplasmic reticulum (ER) stress, have been suggested to play a role in the establishment of these disturbances. The mechanism seems to involve a prevalence of the fission process over the fusion process, and endoplasmic reticulum stress, with activation of the unfolded protein response (UPR) and consequent stimulation of inflammatory pathways.

The dietary fats differ in their lipotoxicity degree, with saturated fatty acids being considered more harmful, while the monounsaturated oleic acid has been suggested to protect against lipotoxicity. However, data on the mechanisms involved as well as on the existence of a dose-dependency are not conclusive. Given that the liver is a key organ for the maintenance of the metabolic homeostasis and is highly susceptible to dietary manipulations, focusing on the consequences of high-fat feeding on this tissue is of relevance. With the aim of evaluating these aspects, we used both *in vivo* and *in vitro* approaches.

The animal study examined body, serum, and hepatic parameters after the prolonged intake of diets containing either normolipidic or hyperlipidic amounts of EVOO. To perform a broad analysis of liver metabolism, a proteomic approach was used.

Two months-old swiss mice were fed for 12 weeks with either normolipidic diets (9.5% energy from fat) containing soy oil (control diet, C) or EVOO (NO diet) or a high fat EVOO diet (HO, 39% energy from fat). Body weight and food intake were measured weekly and serum parameters were analyzed by enzymatic methods. Liver proteome was analyzed by LC-MS/MS and the proteomic data were analyzed by one-way Anova followed by Tukey post-hoc and Benjamini-Hochberg correction. Pathway enrichment analysis was performed with Fisher's test and corrected by the Bonferroni approach.

The high-fat intake of EVOO diet (HO group) inhibited food and energy intake, decreased serum triglycerides while it preserved normal patterns of body weight gain, body adiposity, and glucose levels. However, it increased total cholesterol levels and liver mass and tended to increase hepatic fat content. The proteomic analysis of the liver identified 2318 proteins and, after application of the inclusion criteria, 487 proteins were quantified. They were allocated in 27 pathways significantly enriched, of which 7 pathways were altered in the HO group, in comparison to both C and NO (lipid metabolism, fatty acids metabolism, gluconeogenesis, metabolism of amino acids and derivatives, citric acid cycle, electron transport chain, and biological oxidations). The examination of the pathway analysis derived from the proteomic data suggested stimulation of both mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids, and inhibition of lipid synthesis from LCFA and of gluconeogenesis in the HO group. On the other hand, although the NO group failed to show significant alteration of the liver proteome, it presented reduced body fat, body weight gain, and serum triglycerides and glucose levels, with no evident hypercholesterolemia.

The results allow the hypothesis that the hepatic metabolic adjustments in the HO indicated by the proteomic analysis, were partially successful in avoiding/counteracting the detrimental outcomes of a long term high fat feeding. Contrastingly, since the beneficial effects of the NO diet could not be attributed to overt effects on hepatic metabolism, it is suggested that other tissues may have had a more relevant participation.

Because of the indications of altered mitochondrial metabolism by the high EVOO intake, we performed *in vitro* experiments in HepG2 cells to analyze the consequences of crescent doses of either oleate or palmitate on aspects of mitochondrial dynamics, cell viability, apoptosis, and ER-UPR response. To this end, HEPG-2 cells were treated for 24 hours with 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M or 500  $\mu$ M of either palmitate or oleate. The effects on apoptosis and cell viability were evaluated by the caspase-3 activity and MTT assay, respectively. Western blotting analysis was performed to evaluate the protein content of: a) mitofusin 2 (MFN2) and optic atrophy 1 (OPA1), markers of mitochondrial fusion process; b) dynamin-related protein 1 (DRP1), marker of mitochondrial fission process; and c) 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78), marker of early ER stress.

Both fatty acids reduced cell viability at doses of 250 $\mu$ M and 500 $\mu$ M, and the highest dose had more pronounced effects. The two highest doses of either palmitate or

oleate caused similar increases of Caspase-3 apoptotic activity. GRP78 levels were increased only by palmitate at the lowest and highest doses while no differences were induced by oleate. The levels of MFN2 were not significantly affected by the treatments, although a trend to increased values was observed with all oleate doses, while only the doses of 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M and 500  $\mu$ M of palmitate promoted such a trend. OPA1 and DRP1 levels were not significantly affected by any treatment or dose.

The results showed that the saturated fatty acid elicited a condition of UPR induction and mitochondrial fission trend starting at low doses, whereas a high toxicity with marked reduction of cell viability were elicited at high doses. Differently, the monounsaturated fatty acid tended to induce mitochondria fusion at low doses associated with low toxicity even at high doses. This kind of study can help to understand cellular pathways activated by nutrients with protective effects towards metabolic diseases.