

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore: Prof. Rosario Rizzuto

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Tesi di Laurea Magistrale

EFFETTI DI UNA DIETA CHETOGENICA SULLA
RISPOSTA METABOLICA E MUSCOLARE
ALL'ESERCIZIO FISICO

Relatore:

Ch.mo Prof. Antonio Paoli

Laureando:

Giovanni Cantoni

Correlatrice:

Prof.ssa Tatiana Moro

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUZIONE	5
1.1 La dieta chetogenica.....	5
1.1.1 Definizione.....	5
1.1.2 Cenni storici	6
1.1.3 Aspetti biochimici e fisiologici della chetogenesi.....	7
1.1.4 Regolazione della chetogenesi	11
1.1.5 Utilizzi terapeutici	13
1.1.6 Effetti collaterali.....	16
1.2 Dieta chetogenica e resistance training	20
1.2.1 Ipertrofia muscolare.....	20
1.2.2 Forza muscolare	25
1.2.3 Stato attuale delle conoscenze.....	28
2 SCOPO DELLO STUDIO	33
3 MATERIALI E METODI	35
3.1 Disegno dello studio.....	35
3.2 Soggetti.....	36
3.3 Programma delle visite	37
3.3.1 Visita 1	37
3.3.2 Visita 2	37
3.3.3 Visita 3	39
3.3.4 Visita 4.....	40
3.3.5 Visita 5	40
3.4 Intervento dietetico.....	41
3.4.1 Run-in	41
3.4.2 Gruppo di dieta chetogenica (KD)	42
3.4.3 Gruppo di controllo (WD).....	42
3.4.4 Dieta standardizzata per le giornate di test in acuto	43
3.4.5 Monitoraggio aderenza alla dieta	45
3.5 Protocolli di allenamento.....	46

3.5.1	Run-in	46
3.5.2	Intervento	46
3.6	Analisi dei campioni.....	47
3.6.1	Campione bioptico.....	47
3.6.2	Campione ematico	48
3.7	Statistica.....	48
4	RISULTATI	49
4.1	Composizione corporea	49
4.2	Forza muscolare	52
4.3	Rapporto Forza/Muscolo	53
4.4	Metabolismo.....	54
4.5	Parametri ematici.....	55
5	DISCUSSIONE	59
6	CONCLUSIONI.....	65
	BIBLIOGRAFIA	67

RIASSUNTO

Introduzione

La dieta chetogenica è un regime alimentare caratterizzato da apporto elevato di lipidi, adeguato di proteine e con una forte riduzione dell'introduzione di carboidrati. Così come fa il digiuno, la dieta chetogenica induce uno stato metabolico chiamato chetosi, in cui il corpo utilizza come fonte energetica primaria i corpi chetonici derivati dalle riserve di grassi. Trova i maggiori utilizzi in ambito terapeutico, come nel trattamento dell'epilessia, e nello sport, principalmente come strategia di dimagrimento. Nell'ultimo decennio si è sviluppato un particolare interesse per questo approccio nutrizionale nell'ambito dell'allenamento con sovraccarichi. In letteratura gli studi in questo campo sono tuttavia contrastanti e non sono ancora mai state svolte delle sperimentazioni atte ad indagare come la chetosi influisca, a livello molecolare, sulla risposta muscolare all'esercizio con sovraccarichi.

Scopo dello studio

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di valutare, attraverso l'analisi di dati preliminari, l'effetto di una dieta chetogenica sulle risposte metaboliche e muscolari all'esercizio con sovraccarichi. In particolare, l'obiettivo principale è analizzare la via di segnale legata ai meccanismi di aumentata sintesi proteica, in un contesto di chetosi fisiologica. Outcome secondario è inoltre esaminare il comportamento della forza muscolare nella medesima circostanza.

Materiali e metodi

Un gruppo di sette soggetti di sesso maschile, sani, di età compresa fra i 18 e i 50 anni e con un'esperienza di allenamento con sovraccarichi continuativa di almeno due anni sono stati divisi in due gruppi intervento: un gruppo assegnato alla dieta chetogenica (KD) e un gruppo assegnato alla dieta bilanciata (WD). Dopo due settimane di run-in hanno iniziato a seguire per cinque settimane la dieta assegnata. Durante questo periodo hanno eseguito un programma di allenamento con sovraccarichi identico per i due gruppi. Ad inizio e fine intervento sono stati

sottoposti a una biopsia del muscolo vasto laterale del quadricipite femorale destro in tre occasioni: T0 (basale, prima dell'esercizio), T1 (dopo 6 ore dall'esercizio) e T2 (a 24 ore dall'esercizio). Il campione biotico è stato poi analizzato in termini di signaling molecolare e immunoistochimica (quantità di glicogeno, dimensione fibre, ecc). I soggetti sono stati sottoposti a valutazione della composizione corporea mediante DEXA e BIA. Sono stati inoltre effettuati test di forza massimale isometrica e dinamica, hd-EMG e CSA. Questi dati sono stati infine completati da esami ematochimici, analizzati attraverso un test Two-way ANOVA per misure ripetute e presentati mediante media e deviazione standard. Le differenze sono state considerate significative a $p < 0,05$.

Risultati

La componente di massa grassa è diminuita significativamente nel gruppo chetogenico ($p=0.049$) così come la percentuale di massa grassa ($p=0.040$) mentre il gruppo di controllo ha presentato una tendenza a rimanere costante; la massa magra è rimasta invariata in entrambi i gruppi. Il peso corporeo è diminuito nel gruppo KD con una debole tendenza alla significatività ($p=0.085$) mentre nel gruppo WD è rimasto invariato. La forza muscolare è aumentata, seppur non significativamente, in entrambi i gruppi sia per la componente dinamica che per quella isometrica. Il gruppo KD ha presentato una diminuzione significativa del testosterone libero ($p=0.008$) mentre il gruppo WD lo ha aumentato.

Conclusioni

Il lavoro di tesi ha confermato la dieta chetogenica come strategia di perdita di massa grassa con concomitante mantenimento di massa magra. Dato inoltre l'aumento della forza riscontrato, si può quindi suggerire questo approccio alimentare negli atleti al fine di perdere peso. Tuttavia, trattandosi di un'analisi preliminare occorre attendere l'avanzamento dello studio, sia per numero di partecipanti che per analisi molecolari, per trarre conclusioni definitive.

ABSTRACT

Background

The ketogenic diet is a dietary regime characterized by a high intake of lipids, adequate protein intake, and a significant reduction in carbohydrates. Similar to fasting, the ketogenic diet induces a metabolic state called ketosis, where the body primarily uses ketone bodies derived from fat reserves as its energy source. Its major applications are found in therapeutic settings, such as in the treatment of epilepsy, and in sports, primarily as a weight loss strategy. Over the last decade, there has been a particular interest in this nutritional approach in the context of resistance training. However, studies in this field in the literature are conflicting, and no experiments have yet been conducted to investigate how ketosis affects, at a molecular level, the muscular response to resistance exercise.

Purpose

The aim of this thesis is to evaluate, through the analysis of preliminary data, the effect of a ketogenic diet on metabolic and muscular responses to resistance exercise. In particular, the main objective is to analyze the signaling pathway related to mechanisms of increased protein synthesis in a context of physiological ketosis. Additionally, a secondary outcome is to examine the behavior of muscle strength under the same circumstances.

Methods

A group of seven healthy male subjects, aged between 18 and 50 years old, with a continuous resistance training experience of at least two years, were divided into two intervention groups: one group assigned to the ketogenic diet (KD) and one group assigned to the balanced diet (WD). After a two-week run-in period, they began following their assigned diet for five weeks. During this period, they followed an identical resistance training program for both groups. At the beginning and end of the intervention, they underwent a biopsy of the lateral vastus muscle of the right femoral quadriceps on three occasions: T0 (baseline, before exercise), T1 (6 hours after exercise), and T2 (24 hours after exercise). The biopsy samples were

then analyzed in terms of molecular signaling and immunohistochemistry (glycogen quantity, fiber size, etc.). The subjects underwent evaluation of body composition using DEXA and BIA. Additionally, maximal isometric and dynamic strength tests, hd-EMG, and CSA were performed. These data were further complemented by hematological examinations, analyzed using a Two-way ANOVA for repeated measures, and presented as mean and standard deviation. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

The fat mass component significantly decreased in the ketogenic group ($p=0.049$), as did the percentage of fat mass ($p=0.040$), while the control group showed a tendency to remain constant; lean mass remained unchanged in both groups. Body weight decreased in the KD group with a weak trend towards significance ($p=0.085$), while it remained unchanged in the WD group. Muscle strength increased, although not significantly, in both groups for both dynamic and isometric components. The KD group showed a significant decrease in free testosterone ($p=0.008$), while the WD group increased it.

Conclusions

The thesis work has confirmed the ketogenic diet as a strategy for fat loss while maintaining lean mass. Furthermore, given the observed increase in strength, this dietary approach can be suggested for athletes aiming to lose weight. However, since this is a preliminary analysis, further progress in the study, both in terms of the number of participants and molecular analyses, is necessary to draw definitive conclusions.

1 INTRODUZIONE

1.1 La dieta chetogenica

1.1.1 Definizione

La dieta chetogenica (KD) è un regime alimentare costituito da un apporto elevato di lipidi, un adeguato contenuto proteico ma da livelli insufficienti di carboidrati per le esigenze metaboliche. L'obiettivo principale della dieta è mimare il digiuno, inducendo uno stato metabolico chiamato chetosi, in cui il corpo produce e utilizza corpi chetonici come fonte primaria di energia al posto del glucosio derivato dai carboidrati [1].

Affinché una dieta possa essere definita chetogenica, il requisito è che i carboidrati introdotti quotidianamente siano al di sotto dei 30–50 g/giorno o del 5-10% dell'apporto energetico giornaliero totale [2]. In letteratura sono state studiate diete ipoglicidiche con diverse proporzioni di macronutrienti, contenuto energetico e durata del protocollo. Per fare chiarezza, la più recente proposta di definizione e classificazione di questo approccio alimentare suggerisce di utilizzare l'apporto calorico totale, descrivendo così tre tipologie:

- VLCKD (dieta chetogenica a bassissimo contenuto calorico) con meno di 700-800 kcal/giorno, apporto di carboidrati < 30–50 g/giorno, apporto di lipidi fino a 30-40 g/giorno e apporto proteico da 0,8 a 1,2 g/giorno kg di peso corporeo al giorno
- LCKD (dieta chetogenica a basso contenuto calorico) con almeno 700-800 kcal/giorno, ma inferiore al dispendio energetico totale del fabbisogno calorico giornaliero, assunzione di carboidrati < 30–50 g/giorno, assunzione di lipidi > 30-40 g/ giorno;
- ICKD (dieta chetogenica isocalorica) con apporto calorico in linea con il fabbisogno giornaliero, apporto di carboidrati < 30–50 g/giorno, apporto lipidico > 70–80% dell'apporto calorico giornaliero [3]

Per raggiungere queste proporzioni la selezione degli alimenti è di fondamentale importanza: il successo di una dieta chetogenica è strettamente legato alle scelte alimentari quotidiane. I grassi rappresentano la primaria fonte di energia, perciò, alimenti come olio d'oliva extra vergine, avocado, noci, semi e burro devono essere inclusi. Allo stesso tempo è necessario introdurre un quantitativo sufficiente di proteine, per questo opzioni di proteine di origine animale come carni, pollame, pesce, uova e latticini sono scelte eccellenti. Verdure crocifere come cavolo, broccolo e cavolfiore sono ammesse e apprezzate per il loro alto contenuto di nutrienti, tra cui vitamine, minerali e composti fitochimici benefici per la salute. Anche tutte le verdure a foglia verde sono ammesse. La scelta di frutta è invece più limitata, a causa del suo contenuto di carboidrati, è concesso, ad esempio, un consumo moderato di frutti di bosco [4]. Sono invece vietati, tutti gli alimenti ricchi di carboidrati come pasta, pane, dolci. Trattandosi di una forte restrizione alla comune alimentazione, per aumentare l'aderenza al piano dietetico, vengono spesso utilizzati, sebbene con attenzione, alcuni prodotti commerciali che imitano il gusto dei carboidrati ma ne hanno un contenuto molto basso [5].

1.1.2 Cenni storici

La dieta chetogenica ha radici profonde nella storia umana, con influenze provenienti da pratiche antiche come il digiuno. Negli anni '20, il dottor Russell Wilder sviluppò la prima versione moderna di dieta chetogenica presso la Mayo Clinic come alternativa al digiuno per trattare l'epilessia nei pazienti pediatrici. Infatti, basandosi sull'osservazione che il digiuno riduceva la frequenza delle crisi epilettiche, Wilder progettò una dieta che lo potesse emulare. Essa era caratterizzata da un'elevata assunzione di grassi, moderata di proteine e bassa di carboidrati, inducendo così il corpo in uno stato di chetosi [6].

Il digiuno, nel corso della storia, è stato praticato per motivi spirituali, religiosi e terapeutici in culture in cui questi aspetti spesso si fondevano. Ad esempio, nel tempo di Quaresima nel Cristianesimo e durante il Ramadan nell'Islam assume un significato di purificazione e connessione spirituale. Ancora più curiosamente, nel passo del Vangelo secondo Matteo 17:21, Gesù Cristo guarisce un ragazzo epilettico (indemoniato) e riferendosi alla malattia afferma: "Ma questa specie non esce se

non con la preghiera e il digiuno.” [1]. La somiglianza sia per la cura che per la malattia trattata fra questo aneddoto religioso e il lavoro del dottor Wilder è particolarmente interessante.

La dieta chetogenica ha, in parte, ereditato questa connessione storica con il digiuno, cercando di replicare i suoi effetti fisiologici attraverso la limitazione di carboidrati. Tornando al secolo scorso, dopo un iniziale entusiasmo dalla scuola della Mayo Clinic, con l'avvento di farmaci antiepilettici più efficaci, l'interesse per la dieta chetogenica diminuì. Si dovette aspettare fino agli anni '60 quando, tramite il lavoro pionieristico di Cahill e colleghi, vennero descritti i meccanismi biochimici e fisiologici alla base di questa alimentazione [7]. Negli anni '80 la dieta chetogenica riconobbe una rinascita di interesse grazie allo studio del dottor Robert Atkins raccolto nel suo libro “Dr. Atkins' Diet Revolution” (pubblicato nel 1972) nel quale promuoveva la dieta chetogenica come chiave per la perdita di peso [8]. Negli anni successivi, questo e altri regimi alimentari simili si sono consolidati nel mondo dello sport e del fitness forti dei risultati che riescono a dare: oggi gli effetti della dieta chetogenica sull'esercizio fisico rappresentano un forte argomento di interesse scientifico. A fianco a questo, gli ultimi anni hanno visto la rivalutazione della dieta chetogenica in ambito terapeutico dove tutt'oggi sta continuando ad essere studiata nella cura di diverse patologie come, ad esempio, diabete di tipo 2, NAFLD, oltre alla già citata epilessia. La motivazione dietro questa ricerca è spesso quella di ridurre gli effetti collaterali delle più comuni cure farmacologiche mediante approcci multidisciplinari drug-free [9].

1.1.3 Aspetti biochimici e fisiologici della chetogenesi

Nel contesto del metabolismo energetico, la dieta gioca un ruolo cruciale nel determinare la fonte primaria di combustibile per il corpo umano. Normalmente, a riposo, il nostro organismo consuma una miscela di grassi e carboidrati (circa 70% grassi e 30% carboidrati). Normalmente il glucosio oltre a fornire energia all'organismo in generale è essenziale per il cervello e altri tessuti glucosio-dipendenti che non sono in grado di utilizzare i grassi per scopi energetici. Infatti il cervello non riesce ad utilizzare efficacemente i grassi poiché, questi infatti non sono in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica [7]. Il metabolismo di

questo combustibile è un processo complesso che coinvolge diverse tappe chiave all'interno delle cellule. La glicolisi, che avviene nel citoplasma cellulare, rappresenta la prima fase: durante questa via metabolica, una molecola di glucosio viene scomposta in due molecole di acido piruvico attraverso una serie di reazioni enzimatiche. Questo processo genera una prima formazione di ATP, la principale forma di energia utilizzata dalla cellula, mentre il piruvato può seguire diverse vie a seconda delle condizioni cellulari. In presenza di ossigeno sufficiente, entra nei mitocondri dove viene processato dal complesso enzima piruvato deidrogenasi (PDC) per la formazione di acetyl-CoA e NADH. L'acetyl-CoA è quindi introdotto nel ciclo di Krebs, noto anche come ciclo degli acidi tricarbossilici. Qui, questa molecola viene combinata con una di ossalacetato per formare acido citrico. Il ciclo procede attraverso una serie di reazioni che rilasciano e trasferiscono elettroni per la riduzione di NAD⁺ e FADH⁺ in NADH e FADH₂. Questi elettroni vengono successivamente utilizzati nella catena di trasporto degli elettroni per la sintesi di ATP mentre il ciclo si conclude con la riformazione di ossalacetato [10].

In questo modo l'ossalacetato rappresenta un fattore chiave e limitante per l'attuazione del ciclo di Krebs: deve essere continuamente rigenerato affinché il ciclo possa proseguire. Le vie anaplerotiche sono processi biochimici che riforniscono le molecole intermedie, come l'ossalacetato, garantendo un flusso costante nel ciclo di Krebs. Un'importante via anaplerotica è la carbossilazione dell'acido piruvico mediato dall'enzima piruvato carbossilasi. Questa reazione avviene nel citosol, richiede come cofattore la biotina e richiede piruvato (ottenuto dalla glicolisi o da altre fonti) non come fonte energetica diretta ma per fornire ossalacetato all'impianto di produzione energetica. L'ossalacetato può anche essere generato da altre fonti attraverso vie anaplerotiche che coinvolgono intermedi del metabolismo degli aminoacidi o altri precursori metabolici [11]. Ulteriori aspetti da considerare sulla preziosità di questo elemento sono l'incapacità dell'organismo di immagazzinarlo (essendo instabile alla normale temperatura cellulare) e il suo consumo anche in altre importanti vie, una su tutte la gluconeogenesi [10].

Il catabolismo degli acidi grassi è un processo essenziale per la produzione di energia cellulare, soprattutto durante il digiuno e l'esercizio fisico intenso. La beta-ossidazione è il processo chiave attraverso il quale gli acidi grassi vengono

scomposti per produrre acetil-CoA, il quale poi può essere utilizzato nelle cellule per produrre energia. Gli acidi grassi legati ai trigliceridi vengono rilasciati tramite il processo di lipolisi e possono attraversare le membrane cellulari e mitocondriali. All'interno dei mitocondri la beta-ossidazione può iniziare e richiede un investimento energetico necessario alla formazione di una molecola di acil-CoA usando come substrato un acido grasso e una molecola di coenzima A. Questo intermedio viene quindi trasportato nella matrice mitocondriale, dove viene ossidato per la produzione di FADH₂ e NADH, e infine ripetutamente scisso per formare, reagendo con altri CoA, molecole di acetil-CoA. In condizioni fisiologiche queste vengono quindi incluse nel ciclo di Krebs [10].

Durante la dieta chetogenica, il metabolismo subisce significative modifiche a causa della riduzione drastica dell'apporto di carboidrati. Quando si consumano pochi carboidrati, i livelli di glucosio nel sangue diminuiscono, portando il corpo a cercare alternative per soddisfare il suo fabbisogno energetico. Inizialmente l'organismo attinge alle riserve di glicogeno per convertirlo in glucosio necessario all'energia. Questo fenomeno prende il nome di glicogenolisi e avviene soprattutto nel fegato e nei muscoli: mentre nei muscoli questa via è utilizzata principalmente per dare direttamente energia alle fibre muscolari durante attività fisica intensa, la produzione epatica è volta a risanare i livelli di glucosio nel sangue [12]. Tuttavia, le riserve di glicogeno sono limitate e, una volta esaurite, il corpo passa a processi di gluconeogenesi per produrre glucosio da fonti non-carboidratiche. Anche questa via metabolica avviene principalmente nel fegato, e in misura minore nei reni, e utilizza come precursori sostanze come aminoacidi derivati dalla degradazione delle proteine, glicerolo proveniente dalla lipolisi e lattato. La gluconeogenesi, come precedentemente accennato, necessita dell'ossalacetato per funzionare: attraverso la fosfoenolpiruvato carbossichinasi viene convertito in fosfoenolpiruvato (PEP). Il PEP è un composto chiave nella via che porta a questa produzione endogena di glucosio [1], [10].

Mentre queste due vie cercano di soddisfare il fabbisogno essenziale di glucosio per i tessuti glucosio-dipendenti, il catabolismo degli acidi grassi viene incaricato nella produzione di energia a lungo termine. La beta-ossidazione viene fortemente stimolata traducendosi in una elevata produzione di acetil-CoA [13]. L'aumento di

questa molecola e la parallela povertà di ossalacetato, investito nella gluconeogenesi e ridotto dal mancato apporto di carboidrati nella dieta, genera uno squilibrio nel corretto funzionamento del ciclo di Krebs risultando in un accumulo di acetil-CoA [14].

Questo surplus di acetil-CoA rappresenta il punto di partenza di una via metabolica alternativa chiamata chetogenesi. La chetogenesi è il processo attraverso il quale il corpo produce i corpi chetonici (KB), molecole utilizzate come fonte di energia sostitutiva del glucosio [14]. I chetoni nella fisiologia umana sono tre: l'acetoacetato, il beta-idrossibutirrato e l'acetone. Negli epatociti l'eccesso di acetil-CoA viene trasformato in acetoacetato e successivamente in beta-idrossibutirrato e acetone. Due molecole di acetil-CoA vengono catalizzate dall'enzima tiocinasi a produrre acetoacetil-CoA. Viene aggiunta una terza molecola di acetil-CoA attraverso l'enzima HMGCoA sintasi (HMGCS) per formare il 3-idrossi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA). Questo viene quindi scisso in acetoacetato e in acetil-CoA attraverso l'enzima HMG-CoA liasi. Una parte dell'acetoacetato viene ridotta a beta-idrossibutirrato dalla BHB deidrogenasi mitocondriale mentre una minima parte si converte in acetone tramite l'enzima acetoacetato decarbossilasi [14]. I corpi chetonici lasciano gli epatociti e si immettono nel flusso sanguigno per raggiungere i tessuti periferici. In particolare, essi possono attraversare la barriera ematoencefalica e raggiungere il sistema nervoso centrale. Qui, e in altri vari tessuti, vengono riconvertiti in acetil-CoA e diventano quindi substrato per il ciclo di Krebs, generando ATP e fornendo energia alle cellule. Sebbene alcune cellule nervose richiedano ancora una piccola quantità di glucosio, il cervello si adatta all'uso dei chetoni e nello stato di digiuno o dieta chetogenica può essere considerato cheto-dipendente [15]. Una molecola di KB produce più energia di una molecola di glucosio, hanno inoltre costanti di dissociazione simili: è favorito l'utilizzo dei chetoni quando la loro concentrazione è di almeno 4 mmol/l [13]. Curioso il fatto che, nonostante sia il maggior produttore di corpi chetonici, il fegato non abbia il corredo enzimatico per utilizzarli come fonte energetica: questo può essere spiegato con l'evitamento di inutili cicli di produzione-consumazione all'interno degli epatociti [16]. Il principale corpo chetonico prodotto è l'acetoacetato ma il chetone predominante nel sangue, nonché

forma preferita utilizzata dai tessuti per produrre energia, è il beta-idrossibutirrato [1]. L'acetone invece non è una forma di energia efficace come gli altri due e può essere eliminato attraverso la respirazione e in misura minore con l'urina. La sua presenza dell'espriato, infatti, può causare l'odore caratteristico noto come "alito chetonico" [9]. Complessivamente questo cambiamento metabolico prende il nome di "cheto-adattamento" e in sintesi prevede: aumento della produzione di chetoni, miglioramento del loro utilizzo e conseguente aumento dell'efficienza energetica, riduzione della glicolisi e della dipendenza da carboidrati. Questo fenomeno non è immediato, la tempistica dipende da numerosi fattori, varia da persona a persona e in genere richiede 3-5 giorni [1]. I meccanismi dietro a questa trasformazione energetica non sono del tutto ancora chiariti, una delle ipotesi più forti riguarda l'effetto di biogenesi mitocondriale e di diminuzione del danno mitocondriale nei tessuti ossidativi [17]

Questa transizione verso un diverso modello di utilizzo dell'energia può essere monitorata attraverso gli effetti sui valori ematici. Innanzitutto, l'elemento caratterizzante è l'induzione della chetosi. Se in condizioni di dieta equilibrata la chetonemia è molto bassa (<0.3 mmol/L), durante la dieta chetogenica aumenta considerevolmente senza mai superare le 8mmol/L. Questa è una condizione che viene descritta come "chetosi fisiologica" essendo un normale e corretto adattamento del corpo a condizioni di insufficiente apporto glucidico [18]. La concentrazione di corpi chetonici, infatti, non è tale da ledere l'equilibrio acido-base sanguigno. Viceversa, si distingue dalla "chetosi patologica diabetica" dove la chetonemia si innalza anche oltre le 20 mmol/l causando un abbassamento dannoso del pH. La dieta chetogenica ha importanti risvolti anche sulla glicemia. Con i processi prima descritti si verifica un abbassamento della concentrazione di glucosio nel sangue pur restando sempre nei limiti fisiologici (65-80 mg/dL) e i valori di insulina vengono mantenuti bassi [1]

1.1.4 Regolazione della chetogenesi

La chetogenesi è un processo complesso ed è orchestrata da diversi ormoni responsabili della regolazione del metabolismo energetico e dell'omeostasi glucidica. In primo luogo, è regolata dal rapporto fra gli ormoni pancreatici insulina

e glucagone. L'insulina ha un effetto inibitorio della chetogenesi ed è prodotta in risposta ad alti livelli di glicemia: essa favorisce l'attivazione dell'acetil-CoA carbossilasi, aumentando i livelli di malonil-CoA. Questo composto è alla base della creazione degli acidi grassi, ma ha anche il potere di bloccare l'azione della carnitina-palmitoil transferasi 1, impedendo così il processo di ossidazione degli acidi grassi [19]. Durante una dieta chetogenica o periodi di digiuno si verifica l'opposto e viene limitata la funzione inibitoria dell'insulina. In questa circostanza, infatti, è promossa la produzione e l'attività del glucagone che a sua volta ha un effetto facilitante sulla beta-ossidazione e sulla chetogenesi. Questa facilitazione prevede l'attivazione della via di AMPK e l'inattivazione dell'attività dell'acetil-CoA carbossilasi. Questi permettono l'attività della carnitina-palmitoil transferasi 1 e avviene l'ossidazione degli acidi grassi. Da qui la produzione di acetil-CoA necessario alla chetogenesi [19]. Mentre i processi descritti regolano l'ingresso degli acidi grassi liberi nel mitocondrio, il glucagone svolge un altro importante ruolo rappresentato dall'attivazione della lipasi ormone-sensibile (HSL) nel tessuto adiposo. Questo enzima favorisce la mobilizzazione dei triacilgliceroli depositati nel tessuto adiposo per formare gli acidi grassi liberi che, attraverso il flusso sanguigno legati all'albumina, possono quindi raggiungere gli altri tessuti [10]. Anche il cortisolo contribuisce alla produzione di chetoni durante situazioni di stress o mancato apporto glucidico prolungato. Inoltre, gli ormoni tiroidei, gestendo il metabolismo basale, possono influenzare positivamente la produzione di chetoni come fonte energetica. Anche l'adrenalina e la noradrenalina, prodotte dalla ghiandola surrenale in risposta a stress e attività fisica, contribuiscono alla fornitura di energia stimolando la beta ossidazione degli acidi grassi, e conseguentemente la chetogenesi, durante periodi di maggiore richiesta metabolica [20].

In dettaglio, la reazione limitante della chetogenesi è quella catalizzata dall'enzima HMG-CoA sintasi (HMGCS), la sua produzione è uno degli elementi chiave nella regolazione della chetogenesi. La trascrizione di questo catalizzatore così importante è controllata da diverse vie. Una prima via riguarda l'attivazione di FOXA2, acetilato e promosso dal glucagone mentre viene fosforilato e ostacolato dall'insulina. FOXA2 viene anche acetilato e attivato da SIRT1. La seconda via di regolazione trascrizionale di HMGCS coinvolge l'attività promuovente di PPAR α .

che attiva FGF21 (il fattore di crescita dei fibroblasti 21). Questo conduce all'attivazione metabolica della cellula verso la chetogenesi. Questa via sembra essere inibita a livello epatico da mTORC1 e pertanto, durante la KD e il digiuno, la via di mTOR viene tenuta spenta. L'attività di HMGCS2 è anche regolata post-traduzionalmente mediante succinilazione e acetilazione [21].

1.1.5 Utilizzi terapeutici

Recentemente, nella letteratura scientifica si è raccolta un'ampia quantità di evidenze che indicano un possibile ruolo terapeutico delle diete chetogeniche in numerose patologie. L'importanza dell'approccio multidisciplinare nel trattamento delle malattie è consolidata da anni e include anche l'approccio alimentare. Tuttavia, la possibilità che la modifica dell'assunzione di cibo possa essere utile per ridurre o eliminare i metodi di trattamento farmaceutici, che spesso durano tutta la vita con effetti collaterali significativi, richiede un'indagine seria [9].

Come accennato precedentemente, la dieta chetogenica compie il suo esordio nell'ambito medico negli anni '20 come opzione per il trattamento della epilessia. Abbandonata a favore dell'utilizzo di farmaci antiepilettici, negli ultimi anni è tornata oggetto di trial clinici dagli anni '90 ad oggi. Un recente articolo del 2021 ricorda le linee guida dell'utilizzo della KD come uno dei quattro trattamenti principali per l'epilessia resistente ai farmaci, insieme ai più recenti AED, alla chirurgia dell'epilessia e alla neuromodulazione. Come ulteriore punto di forza l'approccio nutrizionale è reversibile, poco costoso e facilmente accessibile a differenza delle chirurgie. Questo ne fa un ottimo alleato nella cura di questa malattia [6]. Nonostante un costante aumento della nostra conoscenza dei meccanismi alla base della KD, non è ancora del tutto chiaro come la dieta sia clinicamente efficace nei disturbi convulsivi. È probabile che molteplici meccanismi partecipino in modi interconnessi alla produzione di effetti anticonvulsivanti, nonché di effetti neuroprotettivi, in maniera parallela e sinergica fra loro [22].

Questi risultati hanno alimentato l'interesse di trial clinici su altre patologie neurologiche: sebbene si tratti di dati preliminari, gli iniziali risultati appaiono positivi. I corpi chetonici, infatti, sono stati osservati come mediatori primari per

prevenire l'invecchiamento e la neurodegenerazione nella malattia di Alzheimer, agendo attraverso il potenziamento della funzione mitocondriale. Inoltre, sembra che la KD abbia un ruolo per ridurre la formazione di placche di amiloide- β e sostituire il glucosio con fonti alternative di energia nel cervello, mitigando così i potenziali sviluppi della malattia. È stata utilizzata anche in pazienti affetti da sindrome di Down e disturbo dello spettro autistico dove si è visto un miglioramento dei punteggi nelle scale di valutazione dell'autismo [23]

Il più importante capitolo dell'uso terapeutico della dieta chetogenica riguarda la perdita di peso e il miglioramento della composizione corporea dove esiste un consenso generale sugli effetti positivi di questa strategia nutrizionale nella perdita di massa grassa. Tuttavia, rimane aperta la questione dei meccanismi coinvolti in questi risultati. Un recente articolo del 2023 espone tre principali strumenti che tentano di spiegare questi effetti [24]:

1. Riduzione spontanea dell'apporto calorico: un soggetto sottoposto a KD tende ad assumere meno calorie nella giornata rispetto a un non-KD. Questo comportamento può essere spiegato dalla sinergia di tre fenomeni. In primo luogo, la relativamente aumentata quota di proteine assunte con la dieta aumenta il senso di sazietà [25]. In secondo luogo, la KD influisce sulla regolazione ormonale dell'appetito: durante una fase di dimagrimento il corpo esprime l'aumento di appetito tramite una maggior produzione di ormone grelina ed è stato notato che nei soggetti sottoposti a dieta chetogenica questo aumento è inferiore rispetto a una dieta bilanciata [26]. Infine, è stato descritto che i corpi chetonici potrebbero avere un effetto diretto sulla soppressione dell'appetito in particolar modo il beta idrossibutirrato [27].

2. Aumento del dispendio energetico a riposo (REE): si tratta di un aspetto ancora in aperta discussione. Studi condotti hanno notato un aumento, limitato seppur importante, del metabolismo basale in pazienti obesi sottoposti a KD mentre ricerche a lungo termine (60-90 giorni) non hanno dato lo stesso risultato. Questo farebbe pensare che, più un aumento diretto dato dalla dieta, sia un risultato della conservazione della massa magra nella concomitante riduzione della grassa. Il muscolo scheletrico, infatti, costituisce il 40% del peso totale e svolge molti ruoli

metabolici fondamentali e durante la KD, nonostante la degradazione proteica svolta dalla gluconeogenesi, risulterebbe più conservato dato dal forte switch metabolico verso l'ossidazione dei grassi. In sintesi, questo aumento del metabolismo basale, nonostante la sua natura e presenza non ancora ben definite, sarebbe sicuramente un fattore positivo nella perdita di peso [28], [29], [30].

3. Aumento del tasso di lipolisi: come spiega la teoria biochimica, i regimi KD migliorano l'ossidazione dei grassi e quindi abbassano il quoziente respiratorio (RQ). Questo potrebbe essere uno dei meccanismi più importanti del KD sulla perdita di grasso [31]. Tuttavia, è bene sottolineare che il calo di peso non è dato solo dalla perdita di massa grassa. Anche la massa magra è soggetta a degradazione, nonostante la protezione descritta al punto precedente, e durante i primi giorni, il principale contributore è la perdita di acqua legata ai depositi di glicogeno muscolare. L'escrezione urinaria di chetoni e sodio è particolarmente aumentata in questo periodo e richiede un aumento della diuresi [32].

Il calo di peso ha anche un importante risvolto sulla resistenza insulinica in pazienti che ne sono affetti. Inoltre, è in via di ricerca un possibile effetto diretto mediato dalla KD su questa condizione patologica: il contenuto di carboidrati a digeribilità limitata è capace di abbassare i livelli di glucosio e di insulina nel sangue; oltre a ciò, i corpi chetonici sembrano avere la capacità di impattare direttamente sulla segnalazione dell'insulina [24].

La dieta chetogenica si è dimostrata efficace anche in diverse forme nella prevenzione e nel trattamento delle malattie cardiovascolari. Presenta vantaggi significativi nel profilo lipidico rispetto ad altre diete, con un notevole potenziale antinfiammatorio e cardioprotettivo. Questi benefici derivano dalle proprietà antinfiammatorie della chetosi, dall'eliminazione degli zuccheri semplici, dalla limitazione dei carboidrati totali e dall'apporto di acidi grassi omega-3. Inoltre, i corpi chetonici agiscono come una sorta di "carburante di salvataggio" per il cuore sotto stress, influenzandone il metabolismo. La dieta chetogenica migliora anche la funzione dell'endotelio vascolare, ritardandone l'invecchiamento e contribuendo positivamente alla pressione sanguigna e ad altri fattori di rischio cardiovascolare attraverso la perdita di peso [33].

È stata indagata la possibile correlazione fra KD e steatosi epatica non alcolica: come recentemente descritto da una revisione del 2023 di Paoli e Cerullo emerge l'effetto diretto e cruciale della chetosi nell'attivazione di fattori chiave di pathway volti a migliorare la funzionalità del fegato, proteggere dallo stress ossidativo e regolare l'infiammazione. Inoltre, il benessere epatico trae beneficio dalla promozione della mitocondriogenesi, la regolazione della dinamica mitocondriale e l'ottimizzazione dei percorsi bioenergetici indotte dalla KD [34].

L'abbassamento del quoziente respiratorio ha prodotto un risvolto interessante circa l'insufficienza respiratoria. Infatti, un alto contenuto di grassi nella dieta chetogenica provoca chetosi e acidosi metabolica, che porta a una riduzione della produzione metabolica di anidride carbonica per un dato consumo di ossigeno. A livello polmonare questa condizione determina una riduzione della pressione parziale di anidride carbonica arteriosa e ad una diminuzione della ventilazione polmonare: questi effetti possono essere utili come terapia aggiuntiva nella gestione dei pazienti con insufficienza respiratoria, nonostante sia un tema ancora da dimostrare [35]. Infine, sono state descritte in letteratura iniziali prove emergenti di efficacia del regime chetogenico nel trattamento di acne, sindrome dell'ovaio policistico e cancro [9].

1.1.6 Effetti collaterali

La dieta chetogenica è considerata una strategia alimentare generalmente sicura non esente, tuttavia, da possibili rischi [36]. È essenziale quindi esaminare criticamente gli effetti collaterali fisici e metabolici che potrebbero derivare da questo cambiamento nutrizionale.

La complicanza precoce più comune è la disidratazione. Questa si manifesta con secchezza delle fauci, mal di testa, vertigini/ipotensione ortostatica e disturbi visivi: si consiglia l'assunzione di almeno 2 litri di liquidi (non zuccherati) al giorno nelle prime settimane di regime dietetico. L'escrezione urinaria di corpi chetonici e l'insufficiente apporto di micronutrienti possono causare disturbi elettrolitici, come iponatriemia e ipomagnesemia, nei primi giorni di dieta. Studi indicano che nei soggetti con equilibrio sodico costante, la natriuresi iniziale è temporanea e si verifica solitamente tra il secondo e il sesto giorno, con il picco intorno al quarto

giorno. Dopo questa fase, si assiste a un ritorno a un bilancio sodico positivo, mantenuto per l'intero periodo di KD. A differenza della natriuresi, la kaliuresi, di entità limitata e variabile, accompagna l'adattamento nei giorni cinque al sette, seguita da un ritorno a un bilancio positivo del potassio. In caso di sintomi legati all'ipotensione, è raccomandato l'aumento dell'assunzione di sale, quando non vi sono controindicazioni. L'integrazione con magnesio può essere utile nel ridurre crampi muscolari, difficoltà nel sonno e irritabilità [36], [37].

Inizialmente, la riduzione drastica dell'apporto di carboidrati può portare a una diminuzione dei livelli di glucosio nel sangue, causando ipoglicemia. Tale fenomeno è spesso transitorio e legato al fatto che il corpo sta adattando la sua fonte principale di energia da carboidrati a grassi [38]. Durante questa fase, la gluconeogenesi potrebbe non essere ancora completamente attiva per compensare la mancanza di carboidrati: la diminuzione dell'assunzione di carboidrati porta a una rapida e significativa riduzione dei livelli di triacilgliceroli nel fegato, il che a sua volta riduce la produzione di glucosio epatico [39]. I sintomi dell'ipoglicemia possono includere debolezza, stanchezza, irritabilità, sudorazione e fame intensa. Tuttavia, è importante notare che molti pazienti sperimentano questi sintomi senza che i loro livelli di glucosio raggiungano livelli clinicamente ipoglicemici. Per gestire l'ipoglicemia iniziale durante la VLCKD, si consiglia di introdurre gradualmente la dieta, consentendo al corpo di adattarsi progressivamente alla riduzione dei carboidrati. L'assunzione di bevande contenenti carboidrati, come il succo d'arancia, può essere un rimedio efficace per alleviare i sintomi se i livelli di glucosio nel sangue scendono al di sotto di 40 mg/dL. Una letargia temporanea può presentarsi nei primi giorni del protocollo. Tuttavia, se la sensazione di stanchezza persiste per più di qualche giorno, è consigliabile sottoporsi a indagini mediche, poiché potrebbe essere un sintomo non solo dell'adattamento metabolico, ma anche di disidratazione, eccessiva chetosi o carenze nutrizionali e agire sulla causa [36].

L'odore sgradevole dell'alito, la cosiddetta "alitosi", è un effetto collaterale comune durante la VLCKD ed è dato da un aumento dei livelli di acetone nell'espriro. Questo può compromettere la normale vita quotidiana e quindi ridurre la compliance del soggetto sulla terapia dietetica. Per gestirlo, si consiglia di masticare gomme alla

menta a basso contenuto calorico o senza zucchero, che possono contribuire a ridurre l'odore sgradevole e fornire una sensazione di freschezza [36].

Un capitolo importante dei possibili eventi avversi nel breve termine è rappresentato dai disturbi gastrointestinali. La diarrea è il sintomo più frequente, ma generalmente è di natura transitoria e gestibile, talvolta con l'uso temporaneo di farmaci antidiarroici. Questo potrebbe essere dovuto a un assorbimento difettoso e a un'intolleranza ai grassi. L'elevato contenuto di grassi nella dieta iperlipidica chetogenica può prolungare il tempo di svuotamento gastrico, favorendo la comparsa di malattia da reflusso gastroesofageo, nausea e vomito. Modifiche nella composizione del menu, come l'assunzione frequente di piccole quantità di cibo e l'utilizzo intermittente di farmaci gastrointestinali come antiemetici, regolatori del tratto gastrointestinale e antiacidi, possono contribuire a gestire questi sintomi. La costipazione può derivare da un ridotto apporto di fibre e/o da una riduzione del volume di cibo. Può essere controllata efficacemente assicurando un adeguato apporto di liquidi e/o utilizzando lassativi di massa a basso contenuto calorico e clisteri intermittenti. L'aggiunta di integratori di fibre alimentari può migliorare la costipazione aumentando il numero di movimenti intestinali. Per coloro che presentano già costipazione, malattia diverticolare o emorroidi, è consigliabile considerare un supplemento di fibra alimentare fin dall'inizio della dieta [36], [40]. La pancreatite acuta, sebbene rara, è una complicanza grave e potenzialmente letale, spesso associata all'ipertrigliceridemia. L'epatite è un'altra complicanza rara che può avere esiti fatali, soprattutto in presenza di farmaci antiepilettici concomitanti. In entrambi i casi, la sospensione della VLCKD e un adeguato trattamento di supporto sono necessari per un recupero efficace [38], [41].

In meno dell'1% dei soggetti studiati sottoposti a questa dieta sono stati descritti attacchi di artrite gottosa acuta: è noto che l'acido urico sierico aumenta negli individui che seguono regimi chetogenici. Sono stati inoltre osservati cambiamenti negativi transitori del profilo lipidico come aumento del colesterolo LDL, sebbene questo aspetto sia poco confermato [36].

A lungo termine il corretto apporto proteico svolge un ruolo chiave nella prevenzione di possibili complicanze. Una di queste può di fatto essere

l'ipoproteinemia, dovuta al consumo proteico effettuato dalla gluconeogenesi, o la perdita di capelli. In questi casi si consiglia un aumento relativo dell'introito proteico durante la dieta (es. passare da 1 g/kg/giorno a 1,5 g/kg/giorno) [42].

Come altre metodiche che permettono una perdita di peso rapida, anche la dieta chetogenica aumenta il rischio di formazione di calcoli biliari. Questo avviene a causa della sovrassaturazione della bile con colesterolo, che porta alla cristallizzazione del colesterolo e alla formazione di calcoli, nonché all'insufficiente svuotamento della cistifellea dovuto alla ridotta motilità [43].

Nonostante sembri che il metabolismo del calcio sia conservato nella dieta chetogenica a basso contenuto di carboidrati e calorie (VLCKD), ci sono poche evidenze che suggeriscono un impatto negativo sulla densità minerale ossea (BMC) e sulla densità minerale ossea (BMD) in specifiche regioni come il collo femorale e il grande trocantere. Questo effetto sembra essere proporzionale alla riduzione del peso corporeo, inclusi la massa grassa e magra. Tuttavia, sebbene non vi siano prove che suggeriscano un aumento del rischio di fratture a lungo termine, si raccomanda una elevata assunzione di vitamina D durante la KD [44].

Per quanto riguarda il danno renale il possibile effetto è solo se la dieta chetogenica viene considerata iperproteica, aspetto non propriamente corretto in quanto la KD è solo relativamente ricca di proteine (per l'abbassamento della quota di carboidrati) [9]. Chiarito questo concetto, l'alto livello di escrezione di azoto conseguente al metabolismo proteico può di fatto comportare un aumento della pressione glomerulare e iperfiltrazione [42]. Un ulteriore aspetto che può indurre danno renale indirettamente è il possibile aumento della pressione arteriosa causata da amminoacidi acidificanti aumentati in circolo. È descritta anche l'insorgenza di urolitiasi causata da malassorbimento dei grassi, disidratazione e acidosi cronica. Tuttavia, il rischio di acidosi è pressoché nullo in quanto la concentrazione di corpi chetonici non supera mai le 8 mmol/L [9].

Alla luce di queste informazioni la dieta chetogenica non risulta adatta a soggetti con malattia renale cronica, in stato di gravidanza e allattamento al seno, sotto uso di inibitori del cotrasportatore sodio/glucosio 2 (SGLT2) e affetti da angina instabile. Risultano invece a maggior rischio di insorgenza di effetti collaterali i

soggetti diabetici, obesi, affetti da sindrome metabolica e da insufficienza renale subclinica [9], [24], [36]

Infine, non da trascurare è la possibile influenza psicologica che una dieta così restrittiva può avere su chi la pratica, soprattutto nel caso di giovani atleti. Infatti, si tratta di soggetti in via di formazione psico-fisica suscettibili alle pressioni di genitori/allenatori/compagni di squadra e potrebbero sviluppare tendenze perfezionistiche disadattive [1].

1.2 Dieta chetogenica e resistance training

1.2.1 Ipertrofia muscolare

Il tessuto muscolare scheletrico gioca un ruolo cruciale nel controllo del metabolismo dell'organismo, nell'abilità di eseguire compiti funzionali e nelle performance fisiche. La capacità del tessuto muscolare di adattarsi a vari stimoli è una caratteristica fondamentale. L'ipertrofia muscolare è l'aumento delle dimensioni delle fibre muscolari, fenomeno che può manifestarsi in risposta all'esercizio con sovraccarichi. Comprendere i meccanismi molecolari di questo adattamento muscolare è fondamentale per contrastare il processo opposto, ovvero l'atrofia muscolare, la quale è associata a diverse condizioni patologiche (disuso, cancro, lesioni della denervazione, invecchiamento) [45]. La dimensione del muscolo scheletrico è il risultato dell'equilibrio tra la sintesi proteica muscolare (MPS) e la disgregazione proteica muscolare (MPB): il bilancio proteico netto (NPB). Un NPB positivo è condizione necessaria per l'accrescimento delle proteine muscolari e, di conseguenza, la crescita delle dimensioni delle fibre muscolari. L'NPB è determinato da numerosi fattori, tra cui spiccano lo stato ormonale, l'alimentazione e l'allenamento con sovraccarichi (resistance training) [13].

1. Ruolo ormonale

Numerosi sono gli ormoni che hanno un effetto ben documentato sull'ipertrofia muscolare [46]. L'IGF1 è un potente fattore di crescita prodotto sotto il controllo dell'ormone della crescita (GH) sia a livello epatico con funzione endocrina sia a livello muscolare con funzione paracrina/autocrina. Questo mediatore agisce legandosi al suo target, il recettore IGF1R e attivando la via di segnalazione di

Akt/mTOR. Questa via è considerata la più importante via anabolica muscolare. Similmente, anche l'insulina può attivare la medesima via. Nonostante esista il recettore specifico per questo ormone (IR), sia Insulina che IGF1 possono legarsi a entrambi i loro recettori. La cascata di signaling risulta la medesima con la fosforilazione del substrato del recettore dell'insulina (IRS) e la conseguente attivazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K). Questo enzima fosforila i fosfolipidi di membrana producendo fosfoinositide-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 così prodotto catalizza l'azione della PDK1 per l'attivazione di Akt e dei suoi conseguenti effetti [47]. Un'altra famiglia ormonale importante è quella degli androgeni, in particolare per quanto riguarda il testosterone. Il testosterone viene prodotto principalmente dalle cellule di Leydig nei testicoli e in minima parte dalle ovaie e dalla corteccia surrenale. Questo ormone, come in generale gli androgeni, ha un potente effetto anabolico ed è il principale responsabile della netta distinzione di massa muscolare presente nei due sessi. Le cellule bersaglio si interfacciano con gli androgeni mediante dei specifici recettori di membrana chiamati recettori degli androgeni (AR). Gli androgeni esplicano i loro effetti nel muscolo scheletrico attraverso due principali vie con risultato finale comune, ossia l'attivazione della via di Akt/mTOR. Questo può avvenire indirettamente, mediante una via genomica, con la upregulation della trascrizione e della produzione di IGF1R o direttamente attivando Akt [48]. Entrambe le vie sono state dimostrate da studi in vivo su topi. Gli androgeni hanno anche un ruolo nella stimolazione delle cellule staminali satelliti verso la proliferazione e la differenziazione in miociti [46]. Sono stati menzionati altri fattori di crescita ormonali nel controllo dell'ipertrofia muscolare sebbene non siano stati ancora chiariti né l'effettiva importanza né i dettagli della via di segnalazione. Le principali informazioni attuali sono state ricavate da studi di topi in vivo. Alcuni di questi sono:

- l'Osteocalcina: derivata dall'osso, sembrerebbe avere un ruolo endocrino di collegamento sulla relazione muscolo-osso-muscolo. Durante l'esercizio, l'interleuchina 6 (IL-6) rilasciata dal muscolo scheletrico potrebbe agire sugli osteoblasti, innescando il rilascio di osteocalcina bioattiva. Questa a sua volta andrebbe a favorire l'anabolismo muscolare [49].

- l'asse Follistatina-Miostatina: La miostatina (GDF8) è un membro della superfamiglia TGF β e agisce come regolatore negativo della massa muscolare legandosi al recettore dell'attivina di tipo II (ActRII). La follistatina, un inibitore endogeno, neutralizza il suo effetto, agendo come segnale pro-ipertrofico. L'inattivazione della miostatina o la sovraespressione della follistatina induce ipertrofia muscolare, con un cambio nella composizione delle fibre muscolari da lento a veloce. La fosforilazione di Smad3, innescata dal legame della miostatina al suo recettore, interferisce con la via Akt/mTOR, mentre la follistatina attiva questa via e favorisce la sintesi proteica [50].
- BMP: le proteine morfogenetiche ossee (BMP) sono altri membri della superfamiglia TGF β , ma hanno effetti opposti sulla crescita muscolare rispetto alla miostatina. In particolare, è stato dimostrato che la sovraespressione di BMP7 induce ipertrofia muscolare nel topo mediata dalla via Smad1/5/8. Tuttavia, è una via strettamente dipendente dalla contemporanea attivazione di Akt/mTOR [51].

2. Ruolo alimentazione

L'alimentazione gioca un ruolo fondamentale nel controllo dei processi ipertrofici per due aspetti chiave: l'introito calorico totale e l'apporto proteico. Un sufficiente introito calorico totale è imprescindibile per l'inibizione delle vie proteolitiche come la via di AMPK/PGC1 α . Questa via nel muscolo, infatti, ha due potenti effetti: da un lato inibisce la via di mTOR bloccando la biosintesi proteica e dall'altro promuove l'autofagia e la proteolisi [13]. Un corretto apporto proteico è stato dimostrato essere fondamentale per la crescita muscolare. Sebbene la quantità di proteine assunte nell'arco della giornata risulti il fattore più determinante, il tipo e la fonte di queste sono importanti, così come i tempi di ingestione e la distribuzione nell'arco dell'intera giornata. Una volta ingerite, nello stato post-prandiale solo il 10% viene effettivamente utilizzato nella biosintesi de novo nel muscolo scheletrico mentre il 50% viene estratto dai tessuti splancnici e il restante 40% viene catabolizzato contribuendo alla produzione di energia, all'urea o alla sintesi dei neurotrasmettitori. Le proteine di origine animale, soprattutto quelle del siero del latte, risultano ancor oggi di qualità superiore a quelle di origine vegetali (come, ad esempio, la soia) nel favorire la risposta muscolare. Una quantificazione di introito

proteico modello è stata proposta come l'assunzione di 20 g di proteine di alta qualità (circa 0,3 g/kg/pasto) per stimolare al massimo la sintesi proteica muscolare dopo un singolo pasto e se ripetuti ogni 3 ore durante la giornata. Variazioni a questo quantitativo teorico possono riguardare atleti particolarmente pesanti, soggetti anziani e dopo un allenamento intenso contro resistenze. L'ottimizzazione di tali condizioni favorisce un bilancio proteico netto positivo, che a lungo termine può comportare un aumento della massa muscolare [52].

3. Ruolo esercizio con sovraccarichi

L'esercizio con sovraccarichi contribuisce all'aumento della massa muscolare sia negli esseri umani che negli animali. Il fatto che solo le contrazioni contro un carico siano efficaci suggerisce un coinvolgimento della segnalazione meccanica. Sono stati scoperti e studiati particolari meccanicocettori localizzati principalmente a livello della membrana plasmatica. I segnali meccanici generati dalla contrazione muscolare o dallo stiramento passivo vengono trasmessi attraverso due complessi multiproteici che attraversano la membrana plasmatica e collegano la matrice extracellulare (ECM) con il citoscheletro intracellulare: il complesso glicoproteico della distrofina (DGC) e il complesso di adesione dell'integrina [46]. Queste strutture sono presenti in modo significativo nelle aree ad elevata trasmissione di forza longitudinale o laterale, come le giunzioni miotendinee e i costameri. La loro funzione è in primo luogo di agire come ammortizzatori, stabilizzando il sarcolemma durante i processi di contrazione e allungamento muscolare, e in secondo luogo di agire da impalcatura per le proteine di segnalazione. Risultano quindi potenzialmente coinvolte nella facilitazione dell'effetto pro-ipertrofico generato dall'attività contrattile contro un carico elevato. Una possibile via ipertrofica studiata coinvolge la perossinitrite generata da nNOS (sintetasi del biossido di azoto neuronale, una componente di DGC) che attiva il canale cationico Trpv1, inducendo un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , che successivamente attiva mTOR [53]. Un'altra possibile connessione tra la distrofina e l'ipertrofia muscolare si basa sulla scoperta che i recettori dell'insulina si associano a cluster ricchi di DGC nei costameri e questa associazione favorisce la segnalazione insulinica attraverso la via PI3K/Akt/mTOR [54]. Anche il possibile aumento di acido fosfatidico (PA) sembrerebbe essere coinvolto nel legame fra

stimolazione meccanica e ipertrofia: PA viene prodotto in maggiori quantità sotto stress meccanico dall'enzima diacilglicerolo chinasi-zeta essendo essa controllata dalla $\gamma 1$ -sintrofina (componente di DGC). L'acido fosfatidico riesce a facilitare la via di mTOR sia allostericamente catalizzandola sia inibendo un inibitore endogeno di mTOR chiamato FKBP38 [55]. Un altro possibile elemento di comunicazione fra questi processi è GPR56, un membro della famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G di adesione. Questo sembra guidare l'ipertrofia muscolare a valle di una via $G\alpha 12/13$ -Rho che porta all'attivazione di mTOR e all'aumento della sintesi proteica. Inoltre, risulta controllato dal fattore di crescita PGC-1 α 4 [56]. Infine, sono stati descritti meccanosensori incorporati in diverse posizioni nel sarcomero che sembrano avere un ruolo nell'attivazione della via ipertrofica. Questi includono proteine situate nella banda I, nella banda M e nel disco Z: in risposta a una stimolazione meccanica il dominio chinasi della titina controlla l'espressione genica muscolare e il turnover proteico tramite derepressione del fattore di trascrizione SRF [57].

Questi tre fattori macroscopici convergono nel dettaglio molecolare. In questo livello la regolazione dell'ipertrofia muscolare è articolata e complessa. Ad oggi la comunità scientifica è d'accordo nel descrivere le seguenti come le vie metaboliche principali [13], [58]:

- IGF-1/Akt/mTOR: è la via principale anabolica che coinvolge mTOR. Nello specifico, l'IGF-1 si lega al suo recettore che a sua volta fosforila il substrato del recettore dell'insulina (IRS) che attiva la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K). PI3K fosforila i fosfolipidi di membrana, portando alla formazione di fosfoinositide-3,4,5-trifosfato (PIP3) che funge da sito di aggancio per due chinasi, chinasi fosfoinositide dipendente 1 (PDK1) e Akt. PDK1 attiva Akt che da un lato inibisce la degradazione proteica reprimendo i membri delle proteine membri della famiglia Forkhead box di classe O (FOXO) e dall'altro stimola la sintesi proteica tramite mTOR e glicogeno sintasi chinasi 3b (GSK3b). mTOR forma due complessi proteici, mTORC1 sensibile alla rapamicina con Raptor e mTORC2 insensibile alla rapamicina con Rictor. mTORC2 fosforila Akt alla serina 473 per la sua massima attivazione, mentre mTORC1 fosforila S6K1 che attiva la proteina ribosomiale S6 e altre proteine per stimolare la sintesi proteica.

- FOXO/MuRF1: i fattori trascrizionali della famiglia dei FOXO presenti nel muscolo (FOXO 1, FOXO 3, FOXO 4) controllano numerosi geni che inducono all'atrofia muscolare: in condizioni di stress come il digiuno o il disuso, i FOXO promuovono l'espressione dei geni Murf1 e Atrogin-1 e favoriscono la disgregazione proteica. Vengono inibiti da Akt tramite fosforilazione quando prevalgono le vie anaboliche.
- AMPK/PGC1 α : AMPK è un sensore intracellulare di energia, attivato quando il rapporto intramuscolare AMP:ATP aumenta, per promuovere la produzione di energia. La sua attivazione inibisce mTORC1 e pertanto ha un significato catabolico: ostacola la crescita muscolare e ha un impatto negativo su quei processi che consumano ATP, come la sintesi proteica. AMPK esplicita questa inibizione attraverso differenti vie: una prima riguarda la fosforilazione diretta di mTORC1 in uno o entrambi i suoi siti di attacco, una seconda tramite fosforilazione indiretta mediata dal complesso della sclerosi tuberosa 2 (TSC2), una terza bloccando il legame a valle del fattore di allungamento eEF2 al ribosoma. Inoltre, sembra che l'attivazione dell'AMPK possa promuovere il passaggio dallo stato glicolitico a quello più ossidativo della fibra muscolare, attraverso il recettore gamma coattivatore-1 alfa (PGC-1) che promuove la biogenesi mitocondriale [13], [58].

In somma sintesi, l'ipertrofia muscolare è la conseguenza del bilancio proteico netto. Questo è dato dalla somma algebrica tra sintesi e disgregazione proteica muscolare. A livello di pathway molecolare possono essere rappresentate, molto semplificando, la prima da mTOR e la seconda da AMPK. La sintesi è favorita dagli ormoni anabolici (insulina, IGF1, androgeni), corretto apporto calorico e proteico ed esercizio fisico con sovraccarichi. La disgregazione è indotta dagli ormoni catabolici (glucagone, cortisolo, ormoni tiroidei), scarso introito proteico, dieta ipocalorica e dal disuso.

1.2.2 Forza muscolare

La forza muscolare è definita come la capacità di esercitare una forza su un oggetto o una resistenza esterna, questo è possibile grazie all'azione del Sistema Neuromuscolare [59]. Il Sistema neuromuscolare è composto dal Sistema Nervoso,

definito anche sistema neurale e dalla parte muscolare o sistema miogeno. Il muscolo si contrae e produce movimento in quanto viene eccitato da uno stimolo che parte dall'area motoria del cervello e si trasmette attraverso il midollo spinale, da qui attraverso un motoneurone arriva sulle fibre muscolari. L'unità fondamentale di questo sistema è l'unità motoria. Essa è costituita da un motoneurone alfa situato nel corno anteriore del midollo spinale, che riceve lo stimolo dal cervello, dal suo assone, che si unisce ad altri assoni formando il nervo motorio, e da tutte le fibre muscolari scheletriche innervate dai terminali assonici del neurone, comprese le giunzioni neuromuscolari tra il neurone e le fibre. Siccome il numero di motoneuroni è molto inferiore al numero di fibre muscolari ogni cellula nervosa è deputata all'innervazione di più fibre. D'altro canto, ciascuna fibra muscolare presenta una sola giunzione neuromuscolare, il che esclude l'interazione reciproca delle unità motorie. La forza muscolare è quindi il risultato della sinergia fra la componente neurogena e quella miogena.

Mentre la componente miogena indica la quantità e la qualità di tessuto muscolare, la componente neurogena è rappresentata dal reclutamento e dal coordinamento delle fibre ad opera delle unità motorie. Le fibre muscolari possono essere distinte essenzialmente in due tipologie: il tipo I, a contrazione rapida, e il tipo II, a contrazione lenta. Il tipo II a sua volta viene classificato in due sottocategorie: il tipo IIa, ossidativo, e il tipo IIx, glicolitico, per un totale di tre specie di fibre muscolari. Motoneuroni alfa di dimensioni maggiori fanno capo a unità motorie con una popolazione composta esclusivamente da fibre muscolari a contrazione rapida, mentre motoneuroni alfa di dimensioni inferiori fanno capo a unità motorie con una popolazione composta esclusivamente da fibre muscolari a contrazione lenta. La dimensione del motoneurone è correlata alla soglia di attivazione motoria: tanto è più grande, maggiore è lo stimolo nervoso necessario alla sua stimolazione. Secondo il principio dimensionale di Henneman, le unità motorie vengono reclutate in modo ordinato: questo impone che quando i requisiti di produzione di forza aumentano, le unità motorie vengono reclutate in base all'entità della loro produzione di forza, reclutando per prime le piccole unità motorie. Una volta esauste, vengono quindi reclutate le grandi e lente unità motorie [60]. Esistono due modalità di reclutamento delle unità motorie: il reclutamento spaziale e il

reclutamento temporale. Il primo consiste nel reclutamento di un numero crescente di fibre muscolari mentre il secondo si esprime attraverso il reclutamento di un numero maggiore di fibre muscolari per unità di tempo. Questi due processi sono sinergici e complementari finalizzati a regolare i processi di coordinazione intramuscolare. A fianco di questa caratteristica intramuscolare esistono altri fenomeni che permettono l'efficacia del movimento e la regolazione della forza esercitata. Uno di questi è il coordinamento intermuscolare ad opera di un numero elevato di strutture a livello del sistema nervoso centrale e periferico (tanto a livello della corteccia motoria primaria, quanto a livello dei centri di controllo sottocorticali) che permettono la simultanea contrazione dei muscoli agonisti e rilassamento dei muscoli antagonisti del movimento prescelto (60).

La componente neurogena è soggetta a modificazioni nel corso della vita. La plasticità neuronale rappresenta la capacità del sistema nervoso di adattarsi e modificare la sua struttura e funzione in risposta all'esperienza. Nell'ambito della forza muscolare, la plasticità neuronale gioca un ruolo fondamentale nell'ottimizzazione delle connessioni neuronali per migliorare l'efficienza del controllo motorio e potenziare la forza muscolare. Quando avviene in seguito a un programma di esercizio fisico questo processo, noto come apprendimento motorio, è supportato dalla formazione di nuove sinapsi o dalla modifica di quelle esistenti [61].

L'esercizio aumenta la circolazione di diversi fattori neurotrofici [61]. Uno fra questi è il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF), una proteina-segnaletica che aiuta a sostenere la sopravvivenza dei neuroni esistenti e incoraggiando la crescita e la differenziazione di nuovi neuroni e sinapsi [62]. In seguito all'esercizio con sovraccarichi viene maggiormente rilasciato nel sangue anche il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), il quale è un elemento essenziale per la neoangiogenesi che media anche la neurogenesi [63]. Infine, l'allenamento con sovraccarichi sembrerebbe coinvolgere vie del neurotrasmettitore GABA nei processi di miglioramento dell'efficienza del reclutamento delle unità motorie [61]. Questa stessa molecola potrebbe anche essere un determinante della alimentazione sulla componente nervosa della forza muscolare. Il GABA può essere infatti prodotto in maniera endogena mediante una via chiamata "Shunt-GABA" dal ciclo

di Krebs e integrato dalla dieta come fonte esogena [64]. Numerosi dati dimostrano che il contenuto di GABA è solitamente più elevato nelle piante che negli animali e la sua concentrazione è nell'ordine di mg/g a seconda della matrice vegetale, dello stadio di sviluppo e delle condizioni di lavorazione post-raccolta. Negli animali, il GABA è stato trovato a livelli significativamente elevati nel cervello e nel sistema nervoso centrale e in alcuni tessuti periferici specifici come i muscoli del bestiame nell'ordine di $\mu\text{g/g}$. Anche gli alimenti prodotti da diversi tipi di animali, come uova, latte o miele, mostrano un notevole contenuto di GABA senza alcuna fase di lavorazione [65].

1.2.3 Stato attuale delle conoscenze

Nel vasto panorama delle metodologie per ottimizzare la salute e la performance fisica, l'abbinamento di dieta chetogenica e allenamento con sovraccarichi rappresenta un campo di ricerca affascinante e in continua evoluzione. Considerati i ben conclamati effetti sulla perdita di peso, la dieta chetogenica è stata adottata come strategia dimagrante negli ambienti sportivi. In particolare, il merito del suo successo è dovuto alla riduzione della massa grassa grazie all'aumento dell'efficienza di ossidazione lipidica e all'aumento del senso di sazietà. Sport con categorie di peso, estetici o che ricercano il miglior rapporto peso/potenza, infatti, beneficiano enormemente della riduzione della componente lipidica. Tuttavia, resta ancora da chiarire la relazione fra la dieta chetogenica e la massa magra per trarre conclusioni su questa pratica di alimentazione. Difatti, sulla carta, dieta chetogenica e allenamento con sovraccarichi sembrerebbero agli antipodi. Mentre il resistance training attiva vie anaboliche muscolari, rappresentate in particolar modo dalla via di Akt/mTOR, la KD conduce a una disattivazione delle stesse. La restrizione energetica data dalla KD porta all'accumulo di AMP⁺ che attiva l'enzima AMPK che induce l'inibizione di mTOR [1]. La realtà sperimentale appare invece più complessa. Un primo studio pionieristico è stato condotto nel 2012 dal gruppo del professor Paoli su un gruppo di ginnasti professionisti sottoposti a 30 giorni di dieta chetogenica mentre seguivano la loro consueta routine d'allenamento. Alla fine del periodo era emerso un calo di peso complessivo e di massa grassa e, a differenza dell'aspettativa teorica, un mantenimento della massa magra e della forza

muscolare. Questo risultato è stato giustificato dall'elevato apporto proteico della dieta che andava così a bilanciare l'effetto catabolizzante della KD [66]. Nel 2018 risultati simili sono stati raggiunti anche in un esperimento condotto da Greene e altri. Quattordici atleti di sollevamento pesi agonistici di livello intermedio ed elite hanno consumato una dieta abituale e una LCKD in ordine casuale, ciascuno per 3 mesi in un disegno crossover. Al termine della sperimentazione è stato riscontrato che durante il periodo LCKD l'incremento di peso complessivo e di massa magra è stato significativamente inferiore rispetto a quello del periodo di dieta abituale nonostante abbiano ottenuto prestazioni di forza (sollevamento) paragonabili [67]. In tempi più recenti il gruppo di Paoli ha effettuato nel 2021 uno studio di casi KD e controlli non-KD partendo da un gruppo di bodybuilder competitivi. Dopo un periodo di 2 mesi di intervento dietetico è stata osservata la perdita di massa grassa e magra nei KD mentre i controlli avevano prodotto nuovo muscolo. D'altro canto, entrambi i gruppi avevano migliorato la forza con quantità significativamente maggiori di BDNF nei soggetti sottoposti alla chetosi fisiologica [68]. Nello stesso anno Paoli e colleghi hanno osservato la perdita di massa grassa e la contemporanea preservazione di massa magra e forza muscolare in un gruppo di calciatori semiprofessionisti sottoposti a 1 mese di dieta chetogenica [69]. Risultati differenti e sorprendenti sono stati invece raccolti da Wilson e altri nel 2017. Seguendo l'iter operandi della divisione dei campioni in casi KD e controlli non-KD sono stati studiati venticinque uomini in età universitaria per 11 settimane durante un intervento di allenamento con sovraccarichi. Similmente agli studi descritti in precedenza, entrambi i gruppi hanno migliorato la forza muscolare e diminuito la massa grassa ma è risultato che anche il gruppo KD ha aumentato la massa magra come il gruppo controllo. Inoltre, solo il gruppo KD ha mostrato un aumento della massa magra tra le settimane 10 e 11 [70]. Questo aumento di massa muscolare inaspettato ha generato ulteriore interesse sul rapporto fra chetosi fisiologica e ipertrofia muscolare anche se può essere spiegato da un carico di carboidrati che è stato effettuato nell'ultima settimana di sperimentazione e quindi con conseguente aumento del glicogeno muscolare [18]. Una recente metanalisi del 2022 di tredici studi randomizzati e controllati di Ashtary-Larky e altri ha dimostrato che la combinazione di RT con KD era associata a diminuzioni di tutti gli indici di

composizione corporea, compresa quindi la massa magra. È stato infatti stimato da questo articolo che circa un terzo (34%) della perdita di peso corporeo negli individui che eseguono RT sotto KD sia dovuto alla perdita di massa magra. Sembra, pertanto, che la dieta chetogenica possa essere un approccio pratico al calo ponderale e alla riduzione della massa grassa e che l'allenamento con sovraccarichi abbia un effetto sinergico per questo aspetto. Rimane ancora sotto esame il potenziale effettivo di preservazione della KD, rispetto ad altre diete dimagranti, della massa magra [18]. Questa potrebbe essere più efficacemente preservata grazie a un corretto e cospicuo apporto proteico come dimostrato nello studio sui ginnasti [66] nonostante uno studio del 2020 di Vargas-Molina non abbia riscontrato lo stesso effetto in una popolazione di adulti di mezza età sottoposti a KD con maggior introito di proteine [71]. A fianco a questi studi principalmente di biometria antropometrica un articolo del professor Paoli e altri del 2019 pone l'accento sui meccanismi della relazione fra KD e RT. Innanzitutto, è bene ricordare che queste vie metaboliche non sono ancora ben chiarite e che la maggior parte delle conoscenze attuali molecolari si rifanno a studi condotti su modelli murini e possono essere solo parzialmente rapportate al modello umano. Come accennato precedentemente lo stato di carenza glucidica indotta dalla KD favorisce l'attivazione di AMPK data dall'accumulo di AMP⁺, questo ha effetti inibitori nei confronti della via di Akt/mTOR ma non è l'unico meccanismo descritto [13]. Infatti, è stato osservato l'effetto del beta idrossibutirrato come segnalatore molecolare in funzione di inibitore diretto di Akt e sarebbe quindi responsabile della momentanea resistenza all'insulina del muscolo, per permettere l'utilizzo prioritario del glucosio al cervello, a discapito della crescita e della salute muscolare [72]. Tuttavia, è stato osservato in esperimenti effettuati da Roberts e colleghi che topi che seguivano una dieta chetogenica non hanno subito questi effetti negativi molecolari sulla segnalazione muscolare basale e non hanno manifestato una riduzione legata all'età nella forza di presa dei loro arti anteriori rispetto ai topi di controllo. Questo suggerisce che la dieta chetogenica potrebbe migliorare e conservare la forza durante il processo di invecchiamento [73], [74]. Questi stessi studi hanno anche osservato l'azione inibitoria del beta idrossibutirrato sull'istone deacetilasi (HDAC). L'acetilazione degli istoni gioca un ruolo importante nel

controllo muscolare e gli inibitori dell'HDAC prolungano la durata della vita tramite un meccanismo ancora poco compreso, ma legato all'iperacetilazione degli istoni e di diverse altre proteine. Il ruolo dei corpi chetonici in relazione all'acetilazione degli istoni resta comunque un argomento ancora poco studiato [73], [74]. Il beta idrossibutirrato sembrerebbe avere anche un ruolo nella promozione dell'espressione di BDNF a livello neuronale. Questo fenomeno è stato notato nei topi sia sottoposti a dieta equilibrata sia a dieta chetogenica e descriverebbe quindi una influenza positiva diretta dei corpi chetonici sulla forza muscolare [75]. Un ulteriore aspetto da analizzare riguarda il glicogeno muscolare. Questo è immagazzinato nel muscolo scheletrico assieme ad acqua. Durante una dieta chetogenica vengono introdotti con l'alimentazione molti meno carboidrati e pertanto le scorte di glicogeno si dovrebbero esaurire rapidamente. Quello che si è invece osservato è che il cambiamento di metabolismo indotto dalla KD riduce la degradazione del glicogeno, a fronte del maggior utilizzo dei grassi, sia a riposo che durante l'esercizio. D'altro canto, la disidratazione indotta dalla KD riduce anche l'acqua contenuta nei muscoli e può contribuire alla diminuzione di massa magra [13].

In conclusione, esiste un consenso unanime sugli effetti positivi della dieta chetogenica abbinata al resistance training per quanto riguarda la perdita di peso complessivo e di massa grassa; il mantenimento della forza e la preservazione della massa magra è ancora oggetto di discussione. Dal punto di vista molecolare esperimenti condotti su modelli animali hanno presentato una complessità di meccanismi, anche contrastanti fra di loro, che complicano la semplice opposizione mTOR / AMPK. I risultati contrastanti degli studi antropometrici, la scarsità di informazioni sui pathway metabolici nell'uomo e la mancanza di studi molecolari sull'uomo, specie in acuto all'esercizio fisico, hanno portato all'ideazione di questo progetto di ricerca.

2 SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio e di questo lavoro di tesi è quello di indagare a livello molecolare gli effetti di una dieta chetogenica sulla risposta metabolica e muscolare ad un allenamento con sovraccarichi, in particolar modo l'effetto in acuto dell'allenamento in soggetti sottoposti a questo regime alimentare. L'approccio molecolare permetterebbe di risolvere il contesto di risultati contrastanti descritto in letteratura in merito a KD e ipertrofia.

L'ipotesi soggetta a dimostrazione è che in soggetti sottoposti a dieta chetogenica lo stimolo ipertrofico dettato dall'allenamento con sovraccarichi venga inibito; ossia che l'attivazione acuta della via di Akt/mTOR in seguito al resistance training non sia sufficiente a vincere la disattivazione basale della stessa via data dal cheto-adattamento. Per studiare questo, il progetto ha previsto la raccolta di campioni di muscolo tramite biopsie. Queste sono state effettuate sia prima sia dopo l'intervento in tre tempi per un totale di sei: T0 (basale, prima dell'esercizio), T1 (dopo 6 ore dall'esercizio) e T2 (a 24 ore dall'esercizio) pre e post periodo di dieta. Questi dati sono stati inoltre integrati da analisi ematiche, parametri metabolici e antropometrici. Obiettivo secondario dell'esperimento è la valutazione dell'influenza della dieta chetogenica sulla forza muscolare. In dettaglio, attraverso la tecnica di hd-EMG e test di forza, sono state studiate l'attivazione elettrica del muscolo, la forza isometrica e la forza dinamica.

In particolare, il contenuto di questa tesi contempla l'analisi dei dati preliminari dei soggetti che hanno concluso il ciclo di visite nei primi mesi di sperimentazione. Questo approfondimento è quindi finalizzato a creare feedback precoci utili al gruppo di ricerca sull'andamento di uno studio complesso e prolungato nel tempo come questo.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio

Lo studio è un clinical trial randomizzato, in cui i soggetti sono stati divisi casualmente in due gruppi intervento: dieta chetogenica (KD) o dieta bilanciata di controllo (WD). Dopo un primo periodo di due settimane in cui tutti i partecipanti hanno seguito una dieta standardizzata i partecipanti sono stati divisi nei due gruppi sperimentali e hanno seguito il regime dietetico assegnatogli per altre 5 settimane. Durante tutto il periodo di intervento tutti i partecipanti, indipendentemente dal gruppo di appartenenza, hanno seguito la medesima scheda di allenamento con volume ed intensità prestabiliti dal gruppo di ricerca. In Figura 1 è rappresentato graficamente il disegno di studio.

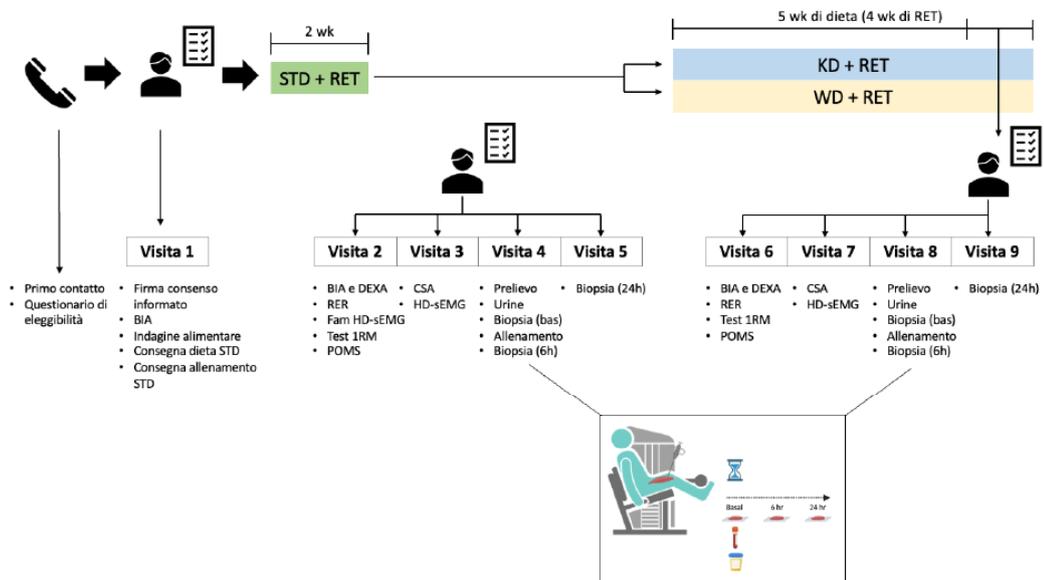


Figura 1: disegno dello studio

3.2 Soggetti

Lo studio si è rivolto a persone sane ed attive, non atleti professionisti, in grado di allenarsi in autonomia e raggiungere il laboratorio di fisiologia di Nutrizione e Fisiologia dell'esercizio nelle date concordate. I soggetti sono stati reclutati attraverso diverse vie come passaparola, pubblicità sui Social Media, volantinaggio nelle palestre e nelle aule universitarie di Padova. Dopo un primo contatto telefonico, i soggetti considerati affini allo studio sono stati chiamati in laboratorio per sottoporsi alla prima visita.

La candidatura dei soggetti ha dovuto soddisfare precise caratteristiche. I criteri di inclusioni utilizzati sono stati:

- genere maschile;
- età compresa fra i 18 e i 50 anni;
- body mass index di minimo 18 e massimo 30 kg/m²;
- stabilità del peso corporeo per almeno i 3 mesi precedenti;
- esperienza continuativa di allenamento con sovraccarichi di almeno 2 anni.

D'altro canto, sono stati delineati forti criteri di esclusione quali:

- aver eseguito una dieta chetogenica nei 6 mesi precedenti;
- assunzione di farmaci steroidei nei 3 mesi precedenti;
- stati acuti infiammatori o di infezioni;
- essere affetti da pre-diabete o diabete secondo i criteri ADA;
- soffrire di patologie croniche cardiovascolari, epatiche, respiratorie e tumori.

Al momento di questo lavoro lo studio è ancora in corso e ha raccolto 7 partecipanti effettivi, poiché è possibile aspettarsi un dropout da parte del 20% del campione il goal di reclutamento è di almeno 30 partecipanti totali, che verranno allocati casualmente nei due gruppi intervento.

3.3 Programma delle visite

Lo studio si è articolato per un totale di 9 visite per ciascun partecipante, suddivise nell'arco di 8 settimane.

3.3.1 Visita 1

Dopo il primo contatto telefonico, i candidati ritenuti interessanti dal gruppo di ricerca sono stati convocati presso il laboratorio di Nutrizione e Fisiologia dell'esercizio per sottoporsi alla prima visita. Durante questa è stato fornito un dettagliato chiarimento riguardo al protocollo di studio, il partecipante è stato invitato a porre domande e, qualora fosse stato sicuro della propria volontà di partecipare, ha proceduto alla firma del consenso informato. Solo da questo momento il candidato è stato considerato come partecipante effettivo e gli è stato assegnato un codice identificativo. In questa occasione il soggetto veniva quindi inserito in maniera randomizzata nel gruppo della dieta chetogenica (KD) o nel gruppo di controllo (WD). Una volta firmato il consenso informato, sono stati svolti nell'ordine i seguenti test: questionario anamnestico, rilevamento di peso e altezza, analisi della composizione corporea mediante bio-impedenzometria (BIA) e colloquio nutrizionale. Al termine della visita, della durata prevista di circa 45 minuti, sono stati consegnati e spiegati i protocolli alimentari e di allenamento elaborati in base ai dati antropometrici del soggetto e alle sue abitudini alimentari. Tali protocolli hanno avuto lo scopo di stabilizzare tutti i partecipanti e di generare un livello iniziale comparabile tra i due gruppi sperimentali durante la fase iniziale di adattamento (run-in).

3.3.2 Visita 2

Dopo due settimane di dieta di adattamento, i partecipanti sono ritornati in laboratorio per lo svolgimento della seconda visita. Questa ha previsto in una durata di circa due ore lo svolgimento dei seguenti test:

- Rilevamento di peso e altezza;

- Analisi della composizione corporea tramite bioimpedenziometria vettoriale (BIA);
- Analisi della composizione corporea mediante DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry);
- Analisi del metabolismo basale e del quoziente respiratorio a riposo (REE e RQ);
- Test di forza 1RM effettuato mediante leg-extension del quadricipite femorale destro;
- Familiarizzazione per test di massima forza volontaria isometrica (MCV) ed elettromiografia ad alta densità (HD-EMG);
- Questionario POMS (Profile of Mood State).

La DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) rappresenta il punto di riferimento per la valutazione della composizione corporea motivo per cui è stata scelta per condurre questa valutazione all'inizio e al termine dell'intervento, limitando l'esposizione alle radiazioni a due sessioni. Il partecipante è stato invitato a sdraiarsi supino sul lettino e a rimanere immobile durante lo svolgimento del test.

Il test per misurare il metabolismo riposo (REE/RQ) richiede che i soggetti si presentino a digiuno, per questo motivo gli appuntamenti sono stati fissati tra le 7:30 e le 9:30 del mattino. La misurazione del metabolismo basale ha richiesto circa 20 minuti in cui il partecipante rimaneva sdraiato supino sul lettino. All'inizio dello studio, per i primi 4 soggetti, è stato utilizzato il dispositivo COSMED Quark RMR, un carrello metabolico per l'analisi del consumo dei gas (VO_2 , VCO_2) sia a riposo che sotto sforzo e dei parametri ventilatori e metabolici correlati. Questo strumento prevedeva la respirazione del soggetto attraverso una maschera.

Il test di forza massimale eseguito sulla leg-extension (1RM) è stato utilizzato per adattare in modo personalizzato la seduta di allenamento acuta prevista nella visita 4, al fine di sottoporre tutti i partecipanti alla stessa intensità di allenamento e registrare la forza massimale dinamica pre-intervento.

Il questionario POMS (Profile of Mood States) è stato somministrato con l'obiettivo di acquisire informazioni sullo stato dell'umore dei partecipanti, considerando che è stato dimostrato che la dieta chetogenica potrebbe influenzare questo aspetto (1).

3.3.3 Visita 3

Due giorni dopo la seconda visita i partecipanti sono stati riconvocati in laboratorio per essere sottoposti ai seguenti test:

- Misura del volume muscolare della coscia (Cross-Sectional Area, CSA);
- Misurazione della massima forza volontaria isometrica (MVC) dei muscoli estensori del ginocchio ed esecuzione di contrazioni sub-massimali (15, 35, 50, 70% MVC); con concomitante hd-EMG.

La CSA ha permesso la valutazione macroscopica della grandezza del muscolo quadricipite femorale. Mediante ecografia è stata catturata una immagine di una sezione trasversale della coscia. Da questa attraverso il software Imagej® è stato possibile calcolare l'area della sezione del muscolo sia nella sua totalità sia per i singoli componenti (vasto laterale, vasto intermedio, vasto mediale e retto femorale). Questa indagine ha consentito da un lato una più approfondita valutazione della composizione corporea regionale della coscia e dall'altro una misura indiretta della forza muscolare.

Mediante il secondo test sono state valutate le capacità di controllo e modulazione della forza prodotta dall'arto inferiore destro. I partecipanti sono stati seduti su una speciale sedia (che simulava una leg extension isometrica) ed è stato chiesto a loro di estendere il ginocchio contro una resistenza. Durante la misurazione della forza muscolare, è stata applicata una matrice di elettrodi sulla superficie cutanea del muscolo vasto laterale, registrando così i segnali mioelettrici durante la contrazione volontaria. La visita è durata circa 90 minuti, con la richiesta ai partecipanti di indossare pantaloncini corti per agevolare le misurazioni elettromiografiche. Questo test ha consentito di valutare eventuali cambiamenti nella forza e nell'attivazione delle unità motorie in seguito all'intervento sperimentale.

3.3.4 Visita 4

Nei giorni successivi alla terza visita è stata organizzata la quarta visita con la collaborazione del reparto di Chirurgia Plastica dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Convocati i partecipanti al mattino a digiuno presso il laboratorio sono state raccolte le urine. Successivamente i soggetti sono stati accompagnati in auto in ospedale per la raccolta del campione ematico tramite prelievo venoso e per la procedura bioptica. Questa è stata eseguita dal personale chirurgo mediante disinfezione della cute, incisione attraverso bisturi sterile, aspirazione del campione muscolare, sutura del sito di accesso. È stata utilizzata anche una terapia anestetica locale mediante iniezione sottocutanea di lidocaina. Si è trattata di una procedura a bassi rischi potendo essere causa di dolore, sanguinamento, lividi, infezioni. In caso di dolore i soggetti sono stati educati all'utilizzo di un farmaco leggero antidolorifico (es. paracetamolo 500) fino alle 48 ore successive alla biopsia. La procedura veniva conclusa con la medicazione dell'incisione. I partecipanti sono quindi stati riaccompagnati in auto al laboratorio dove hanno potuto consumare la colazione standardizzata fornita dal gruppo di ricerca. Successivamente sono stati condotti presso la palestra del dipartimento per l'esecuzione dell'allenamento specifico per gli arti inferiori dalla durata di circa 50 minuti. Lo step successivo è consistito nella somministrazione del pranzo standardizzato. A 6 ore dal termine dell'allenamento, i soggetti sono stati riaccompagnati in ospedale per la seconda biopsia della serie, con procedure analoghe alla prima. I partecipanti sono stati quindi istruiti sulla cena della giornata e congedati.

3.3.5 Visita 5

Il giorno successivo e a distanza di 24 ore dal termine dell'esercizio, i soggetti sono stati sottoposti alla terza ed ultima biopsia della serie. A fine visita sono stati consegnati dal gruppo di ricerca gli effettivi protocolli alimentari e di allenamento da seguire per le successive quattro settimane. In questa occasione i partecipanti sono stati educati al rispetto di ambedue le componenti dell'intervento.

Al termine delle quattro settimane di allenamento, i soggetti hanno proseguito per un'ulteriore settimana nell'intervento dietetico in cui erano stati randomizzati. Durante la quinta settimana, sono state svolte nello stesso ordine le quattro visite effettuate prima dell'inizio dell'intervento per poter quindi raccogliere i dati e i campioni a fine sperimentazione:

- Visita 6: come Visita 2;
- Visita 7: come Visita 3;
- Visita 8: come Visita 4.

3.4 Intervento dietetico

Le diete sono state elaborate utilizzando il software Metadieta®, con la supervisione di biologi nutrizionisti. Caratteristica fondamentale dello studio è stata mantenere uguale l'apporto calorico e proteico delle diete dei due gruppi intervento in ogni fase per evitare fattori confondenti.

3.4.1 Run-in

Durante le prime due settimane del periodo di adattamento, tutti i partecipanti hanno adottato una dieta standard caratterizzata dalla seguente distribuzione nutrizionale: 60% di carboidrati, 20% di grassi e 20% di proteine. L'introito calorico stabilito è stato di 35 Kcal/Kg di peso corporeo con un introito proteico di circa 2 g/Kg. La dieta si è articolata in quattro principali pasti giornalieri: colazione, pranzo, spuntino proteico post allenamento e cena.

La sua composizione si è basata sui principi della dieta mediterranea e ha incluso cereali integrali e raffinati, cinque porzioni di frutta e verdura, due porzioni di latticini, fonti proteiche sia di origine animale che vegetale, con l'olio extravergine di oliva come principale condimento.

Si è trattato di un regime alimentare flessibile in cui il gruppo di ricerca ha potuto personalizzarne la progettazione con il singolo partecipante durante la visita 1: orario dello spuntino proteico, sostituzioni sia all'interno dei singoli pasti che tra

una giornata e l'altra, distribuzione dell'apporto energetico nel corso della giornata sono stati adattati alle esigenze del soggetto pur mantenendo il raggiungimento dell'obiettivo.

3.4.2 Gruppo di dieta chetogenica (KD)

Dalla durata di cinque settimane, l'apporto calorico giornaliero è stato calcolato sulla base di 35 Kcal/kg di peso corporeo e successivamente è stato perfezionato mediante la misurazione del metabolismo basale (REE) effettuata durante la visita 2. L'apporto proteico è stato pianificato a circa 2 g/Kg di peso corporeo. I carboidrati sono stati limitati al di sotto del 5% (meno di 50g al giorno). La restante parte dell'apporto calorico è stata ottenuta dai grassi, costituendo circa il 65/70%. È stata mantenuta l'articolazione nei quattro pasti giornalieri: colazione, pranzo, spuntino proteico post allenamento e cena.

Per garantire il soddisfacimento del fabbisogno di fibra e micronutrienti senza eccedere nell'assunzione di carboidrati, sono stati inclusi nella dieta alcuni prodotti di Tisanoreica®, un'azienda italiana che collabora con l'università nello studio delle diete chetogeniche. La selezione di tali prodotti è stata basata sui valori nutrizionali e sugli ingredienti, con l'obiettivo duplice di raggiungere gli obiettivi previsti di nutrienti e migliorare la palatabilità e l'aderenza alla dieta. I prodotti scelti comprendono biscotti, fette biscottate, pasta, grissini e preparati proteici a ridotto contenuto di carboidrati, ricchi di fibra e micronutrienti. La pianificazione di una dieta settimanale in linea con gli obiettivi prefissati ha consentito di integrare questi prodotti con una frequenza stabilita per evitarne l'abuso. Tali prodotti sono stati forniti ai partecipanti all'inizio dell'intervento per agevolare l'organizzazione dei pasti e promuovere l'aderenza alla dieta.

3.4.3 Gruppo di controllo (WD)

Dalla durata anch'essa di cinque settimane, ha presentato una composizione simile al protocollo dietetico del run-in. L'apporto calorico giornaliero è stato calcolato sulla base di 35 Kcal/kg di peso corporeo e successivamente è stato perfezionato mediante la misurazione del metabolismo basale (REE) effettuata durante la visita 2. Mentre l'apporto proteico è stato uguale a quello del gruppo KD (pari a 2g/kg), i

carboidrati hanno rappresentato circa il 55% del contributo calorico totale e i grassi il rimanente 20%. Anche in questo caso è stata mantenuta l'articolazione nei quattro pasti giornalieri: colazione, pranzo, spuntino proteico post allenamento e cena.

La dieta del gruppo di controllo è stata formulata seguendo i principi della dieta mediterranea, con l'inclusione di cereali integrali e raffinati alternati durante la settimana, fonti proteiche sia animali che vegetali, cinque porzioni di frutta e verdura, e l'utilizzo di olio extravergine di oliva come principale condimento. Particolare impegno è stato richiesto ai partecipanti appartenenti a questo gruppo nel rispettare i quantitativi di cibo richiesti: essendo questa dieta simile alle comuni scelte alimentari della popolazione risultava più facile sfiorare i limiti stabiliti.

3.4.4 Dieta standardizzata per le giornate di test in acuto

Per valutare gli effetti dell'alimentazione sulla risposta muscolare, durante le giornate delle biopsie i soggetti hanno seguito una dieta controllata in base al gruppo di appartenenza. I pasti sono stati uguali sia nel pre-intervento che nel post-intervento e hanno riguardato:

- Cena della sera precedente alla giornata della biopsia;
- Colazione post biopsia a digiuno, fornita direttamente presso il laboratorio;
- Pranzo, fornito direttamente presso il laboratorio;
- Cena della sera precedente alla biopsia a 24h.

Cena precedente alla giornata di biopsia (visita 4 e visita 8)

- Pre-intervento: la cena della sera precedente al giorno del test in acuto iniziale (visita 4) è stata identica per entrambi i gruppi di intervento, caratterizzata da un apporto calorico di circa 12 kcal/kg di peso corporeo, con una distribuzione del 60% di carboidrati, il 20% di grassi e il 20% di proteine. Questa cena presentava similitudini con quelle proposte nella dieta settimanale di run-in, con particolare attenzione alla qualità delle proteine consumate. La selezione degli alimenti comprendeva opzioni come riso o pasta, pane, pollame o pesce, olio extravergine di oliva, verdure miste e un

frutto, con l'obiettivo di rendere il pasto semplice, pratico e facilmente digeribile.

- Post-intervento: Nella cena precedente alla giornata delle biopsie post-intervento (visita 8), i soggetti appartenenti al gruppo di controllo hanno assunto una cena analoga a quella proposta all'inizio dell'intervento, con un introito calorico di 12 kcal/kg di peso corporeo e una distribuzione del 60% di carboidrati, il 20% di grassi e il 20% di proteine, utilizzando le stesse fonti alimentari. Queste includono pasta o riso, pane integrale, carni o pesce magro, verdura, olio extravergine e un frutto. I partecipanti sottoposti al regime chetogenico hanno seguito la cena proposta nella dieta chetogenica, caratterizzata da un introito calorico analogo (12 kcal/kg di peso corporeo) e una distribuzione del 5% di carboidrati, il 70% di grassi e il 25% di proteine. Gli alimenti proposti comprendono pasta chetogenica, grissini chetogenici, olio extravergine di oliva, verdure a foglia verde, carni/pesce grasso e frutta secca.

Colazione post biopsia basale

Per entrambi i gruppi di intervento, è stata fornita una colazione standard che includeva yogurt greco intero abbinato a biscotti chetogenici a bassissimo contenuto di carboidrati forniti da Tisanoreica®. La scelta di limitare l'assunzione di carboidrati anche nel gruppo di controllo è stata motivata dalla volontà di escludere la risposta insulinica post-prandiale, al fine di valutare se, a parità di condizioni, il regime chetogenico influenzi in modo diverso la risposta post-esercizio.

Pranzo post allenamento

Per il medesimo motivo il pranzo della giornata delle biopsie è stato standardizzato per entrambi i gruppi intervento. Questo prevedeva un introito calorico di 12 kcal/kg di peso corporeo ed una suddivisione dei macronutrienti con 5% carboidrati, 70% grassi e 25% proteine. Carne magra (bresaola), parmigiano, olio extravergine di oliva, verdure e grissini chetogenici della Tisanoreica® sono stati gli alimenti scelti.

Cena post biopsia a 6h

La cena è stata diversa per i due gruppi intervento sebbene di uguale introito calorico totale pari a 12Kcal/Kg di peso corporeo. Il gruppo abbinato alla dieta chetogenica ha seguito una proporzione di macronutrienti di 5% carboidrati, 70% grassi e 25% proteine, il gruppo di controlli invece di 60% carboidrati, 20% grassi e 20% proteine.

La struttura delle due cene è stata simile, ma ha previsto fonti alimentari diverse. Nel caso del gruppo di controllo, la cena ha incluso pasta al sugo, pane, carne bianca, verdure, olio extravergine e frutta. Nel caso dei soggetti sottoposti a regime chetogenico, la cena è consistita in pasta e grissini chetogenici con un condimento ricco di grassi, pesce grasso, olio extravergine d'oliva, semi e verdura.

3.4.5 Monitoraggio aderenza alla dieta

Per monitorare l'aderenza alla dieta, il software Metadieta® ha fornito un'applicazione per dispositivi mobili, attraverso la quale il soggetto ha potuto visualizzare la dieta prescritta, selezionare gli alimenti consumati e indicare le relative quantità. In tempo reale, il gruppo di ricerca ha avuto la possibilità di monitorare e, se necessario, suggerire correzioni all'assunzione degli alimenti. Inoltre, i partecipanti venivano contattati telefonicamente ogni settimana da un membro del gruppo di ricerca per verificare il grado di adesione ai protocolli.

I soggetti assegnati al regime chetogenico hanno dovuto monitorare i propri livelli di glicemia e chetonemia tramite glucometro. Questo strumento mediante una reazione enzimatica permette di stimare i valori di glucosio e chetoni nel sangue, il campione di sangue in questione è una goccia di sangue capillare prelevata dal polpastrello. Questa rilevazione è stata richiesta durante la prima settimana di dieta ogni giorno mentre una volta a settimane per il restante periodo di intervento. Questo perché l'effettiva entrata in chetosi può variare da individuo a individuo e richiede normalmente 3-5 giorni (1).

3.5 Protocolli di allenamento

3.5.1 Run-in

Durante le prime due settimane della fase di adattamento, tutti i partecipanti hanno seguito un programma di formazione standard. Tale programma ha previsto quattro sedute settimanali, organizzate secondo il seguente schema: A-B-A-B:

- Scheda A: pettorali – deltoidi – bicipiti – quadricipiti – addominali.
- Scheda B: dorsali – deltoidi posteriori – tricipiti – femorali – polpacci – addominali.

L'intensità dell'allenamento è stata impostata al 70% di 1RM, con gli esercizi base eseguiti per un volume di 3 serie da 10 ripetizioni ciascuna, e gli esercizi complementari per un volume di 3 serie da 12 ripetizioni ciascuna.

3.5.2 Intervento

Durante l'intervento sperimentale, il periodo di allenamento è durato quattro settimane, con l'obiettivo di promuovere l'ipertrofia. Anche per questa fase è stato seguito un programma di allenamento in split routine composto da 4 sessioni settimanali ma con 3 varianti di schede da eseguire in successione.

- Scheda A: cosce – femorali – spalle – addominali.
- Scheda B: pettorali – deltoidi – bicipiti – polpacci – addominali.
- Scheda C: dorsali – deltoidi post – tricipiti – polpacci – addominali.

L'allenamento è stato svolto con un'intensità del 75% di 1RM. Gli esercizi base sono stati eseguiti con un volume di 4 serie da 8 ripetizioni ciascuna, mentre gli esercizi complementari hanno avuto un volume di 3 serie da 10 ripetizioni ciascuna.

Allenamento durante le giornate di test (visita 4 e visita 8): dopo la prima biopsia della giornata, la seduta di allenamento, di un totale di 50 minuti, è stata così composta:

- 5 minuti di riscaldamento su bike a 50W;
- 1 serie da 10 ripetizioni al 45% 1RM su leg extension;
- 8 serie da 10 ripetizioni al 70% 1RM su leg extension con recupero fra le serie di 3 minuti.

Mentre gli allenamenti dei primi due protocolli sono stati autogestiti dal soggetto, il corretto svolgimento di queste sedute è stato guidato direttamente dal gruppo di ricerca.

3.6 Analisi dei campioni

3.6.1 Campione bioptico

Il campione bioptico è stato raccolto mediante l'utilizzo di un ago da biopsia Bergström da 5 mm con procedura sterile e anestesia locale per un totale di 6 biopsie per partecipante (3 pre-intervento e 3 post-intervento) nelle tempistiche precedentemente descritte. La sede di prelievo scelta è stata il vasto laterale del quadricipite femorale; le biopsie successive alla prima sono state prelevate a circa 5 mm di distanza. La quantità di materiale raccolto è stata di circa 150 mg per intervento. Il campione è stato poi diviso per l'analisi dei singoli outcome:

- Signaling: l'outcome primario è lo studio delle vie di segnale molecolare di mTOR e AMPK. Il campione per questo obiettivo è stato aliquotato ed immediatamente congelato in azoto liquido. Successivamente, per l'analisi western-blot, sono stati incubati con i seguenti anticorpi primari: Akt (Ser473), mTOR (Ser2448), S6K1(Thr389), 4E-BP1 (Thr37/46).
- Mitochondri: una porzione di circa 10-15 mg è stata fissata nell'apposito buffer per l'analisi al microscopio elettronico (TEM) dei mitocondri.
- Glicogeno: la quota di campione destinata allo studio delle riserve di glicogeno muscolare è stata congelata immediatamente in azoto liquido.
- Immunoistochimica: è stata scelta una porzione ben orientata di fibre muscolari per l'analisi immunoistochimica.

3.6.2 Campione ematico

Il campione ematico è stato raccolto mediante prelievo venoso superficiale all'arto superiore per un totale di 2 prelievi per partecipante (durante la visita 4 pre-intervento e la visita 8 post-intervento). Ogni prelievo è consistito nella raccolta di 4 provette: 3 di queste sono state consegnate alla medicina di laboratorio presso l'azienda ospedaliera di Padova. La quarta (tappo ocra) è stata centrifugata entro 60 minuti dalla raccolta, e non prima di 30 minuti, alla temperatura di 4° centigradi per 10 minuti a 2000 rcf presso il laboratorio di dipartimento. Dal siero ottenuto venivano preparate tre aliquote da 1 ml in apposite cryovials (da 1.8ml) da conservare a -80°. Complessivamente le analisi ematiche hanno compreso:

- Ematologia e coagulazione: emocromo completo, formula leucocitaria, VES.
- Costituenti biochimici: glucosio, creatinina, eGFR (CKD-EPI), Bilirubina (totale, coniugata, non coniugata), AST, ALT, gGT.
- Proteina C Reattiva.
- Profilo Lipidico: colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL, trigliceridi.
- Profilo ormonale: testosterone, testosterone libero, proteina legante ormoni sessuali (SHBG), FT3, FT4, TSH, insulina, somatomedina C (IGF1).
- Interleuchine: interleuchina 1 beta, interleuchina 6.
- TNF (Tumor Necrosis Factor).

3.7 Statistica

I dati raccolti sono stati infine elaborati tramite il software Jasp® nella realizzazione di un test Two-way ANOVA per misure ripetute. Questo è stato utilizzato per esaminare l'effetto del tipo di dieta (groups) e allenamento (time) sull'ipertrofia muscolare. Le differenze sono state considerate significative a $p < 0,05$ mentre la tendenza alla significatività statistica per $0,05 < p < 0,08$. I dati sono stati quindi descritti mediante gli strumenti statistici di media e deviazione standard.

4 RISULTATI

Due soggetti hanno abbandonato lo studio dopo la visita 5. Ad oggi i risultati preliminari riguardano quindi cinque soggetti.

4.1 Composizione corporea

Dall'analisi dei dati della composizione corporea l'unica variabile che ha fatto emergere una differenza statisticamente significativa è quella relativa alla massa grassa. In particolare, come rappresentato in Figura 2, l'analisi ANOVA ha evidenziato una significatività per l'interazione fra il fattore tempo e allenamento ($p=0,049$): il gruppo chetogenico ha diminuito la massa grassa (-16%) mentre nel gruppo WD si è notata una tendenza a rimanere costante (+4%).

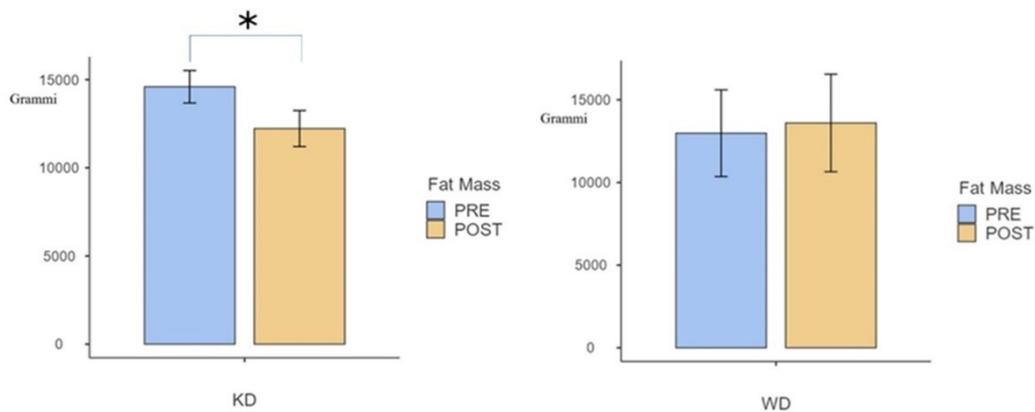


Figura 2: confronto pre e post nei due gruppi per la massa grassa. * indica una differenza statisticamente significativa rispetto ai valori pre.

Similmente, come presentato in Figura 3, la percentuale di massa grassa segue la stessa tendenza con $p(\text{time} \times \text{groups}) = 0,04$: nel gruppo chetogenico si è abbassata (-13% del valore iniziale, che corrisponde a una media di -2.5 punti percentuale di massa grassa nei soggetti) mentre nel gruppo di controllo è pressoché rimasta invariata (+4% del valore iniziale, corrispondente a una media di +0,8 di punti percentuale di massa grassa).

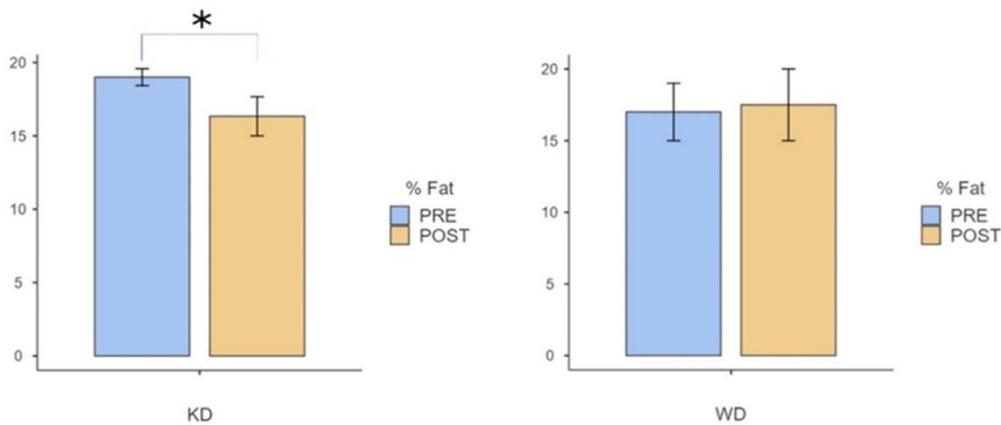


Figura 3: confronto pre e post nei due gruppi per la percentuale di massa grassa. * indica una differenza statisticamente significativa rispetto ai valori pre.

D'altro canto, la variazione della VAT Mass ha presentato significatività statistica con $p=0,04$ in funzione della variabile allenamento (time) e non in relazione alla dieta: entrambi i gruppi hanno abbassato significativamente la componente di massa grassa viscerale (rispettivamente -22% e -7%, con $p = 0,18$).

L'analisi ANOVA ha individuato inoltre una tendenza alla significatività per l'interazione fra il fattore tempo e allenamento ($p=0,08$) per la variabile peso corporeo. Il gruppo chetogenico ha perso peso (-3%) mentre il gruppo di controllo è rimasto costante (+0,8%). Come descritto nella Tabella 1, la massa magra rilevata dalla DEXA è rimasta invariata in entrambi i gruppi (-0,7% nei KD, -0,9% nei WD). Anche i dati ricavati dalla BIA non hanno dato variabilità significative; in particolare l'angolo di fase è rimasto costante (-3% nei KD; +1% nei WD). Risultato simile anche elaborando i dati raccolti dalla CSA in cui non sono state evidenziate variazioni significative come mostrato nella stessa tabella.

Tabella 1

	KD		WD		Time - p value	Time x Groups - p value
	PRE	POST	PRE	POST		
WEIGHT	77,033 ±3,902	74,33 2.730	75,650 9,263	76,250 9,122	0,195	0,085
VAT MASS	343,000 ±23,065	267,000 62,073	309,500 19,092	285,500 24,749	0,046	0,187
LEAN MASS	59087,767 ±2213,831	58666,033 1835,334	60035,650 5315,392	59459,500 4498,755	0,154	0,788
LEAN/ HEIGHT ²	18,733 ±0,961	18,600 ±0,854	20,000 ±1,414	19,800 ±1,131	0,148	0,724
APPEN. LEAN/ HEIGHT ²	8,680 ±0,719	8,370 ±0,669	8,790 ±0,269	8,775 ±0,700	0,272	0,311
Rz	471,100 ±23,358	478,600 ±29,486	430,600 ±6,647	447,100 ±22,486	0,231	0,614
Xc	197,233 ±240,643	56,767 ±1,124	239,750 ±263,256	57,450 ±7,566	0,245	0,864
PA	7,000 ±0,529	6,767 ±0,451	7,200 ±0,283	7,300 ±0,566	0,579	0,219
TBW	47,458 ±0,973	46,801 ±1,549	48,094 ±4,054	47,830 ±3,120	0,261	0,597
ECW	18,145 ±1,657	18,899 ±0,410	17,824 ±0,725	19,048 ±0,696	0,251	0,758
CSA TOTALE	80,445 ±22,211	79,524 ±21.640	84.617 ±16.444	84.993 ±13.902	0.796	0.554
CSA VL	28.636 ±10.416	26.368 ±10.795	29.899 ±2,913	32,055 ±0,280	0,958	0,143
CSA VI	27,547 ±5,851	26,968 ±6,713	30,091 ±13,805	28,541 ±10,432	0,478	0,732
CSA VM	14,268 ±2,470	14,909 ±2,429	15,142 ±0,040	13,965 ±2,271	0,774	0,382
CSA RF	9,264 ±3,971	8,442 ±3,102	8,619 ±1,301	9,366 ±3,152	0,964	0,391

4.2 Forza muscolare

La forza è aumentata in entrambi i gruppi di studio, sia nel test della forza massimale isometrica che nella prova massimale alla leg extension (forza dinamica). Non ci sono state differenze significative tra i gruppi di studio. Come mostrato in Tabella 2, il gruppo KD ha migliorato i propri MVC e 1RM del 2,4% e del 3,4%; mentre il gruppo WD è migliorato rispettivamente del 1,06% e del 10%.

Tabella 2

	KD		WD		Time – p value	Time x Groups – p value
	PRE	POST	PRE	POST		
MVC	0,453± 0,189	0,464± 0,176	0,448± 0,097	0,477± 0,071	0,188	0,463
1RM (Kg)	77,667± 19,088	80,333± 18,175	73,500± 20,506	81,000± 26,870	0,064	0,266

4.3 Rapporto Forza/Muscolo

L'analisi ANOVA non ha rilevato alcuna variazione significativa. Nonostante ciò, come rappresentato graficamente nella Figura 4, tutti i rapporti considerati sono risultati aumentati. In particolare, in entrambi i gruppi la forza isometrica MCV e la forza dinamica 1RM sono aumentate sia in rapporto alla CSA che in rapporto alla LM. Sono state considerate CSA totale del quadricipite femorale per la valutazione di volume e la Lean Mass della gamba destra per la valutazione di massa.

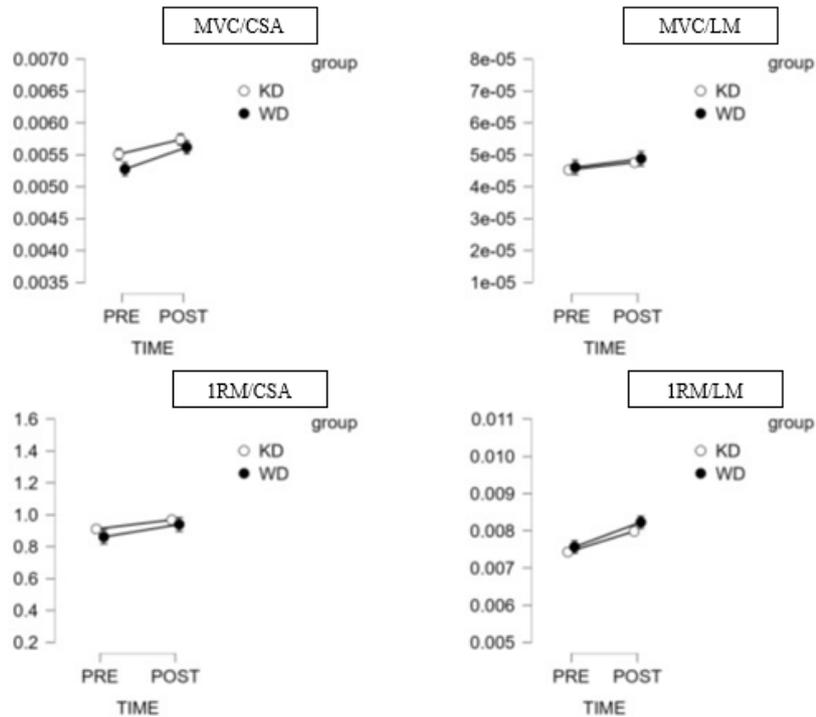


Figura 4: rappresentazione grafica degli indici Forza/Muscolo.

4.4 Metabolismo

All'analisi mediante calorimetria indiretta è emersa come differenza significativa solo il valore di VCO_2 . L'analisi ANOVA ha evidenziato una significatività sia per il solo fattore tempo ($p= 0.019$) sia per l'interazione fra tempo e allenamento ($p= 0.037$). Entrambi i gruppi hanno abbassato il valore di VCO_2 ma il gruppo KD in maniera significativamente maggiore (- 21% nei KD, -2,7% nei WD). In figura 5 è mostrato questo comportamento.

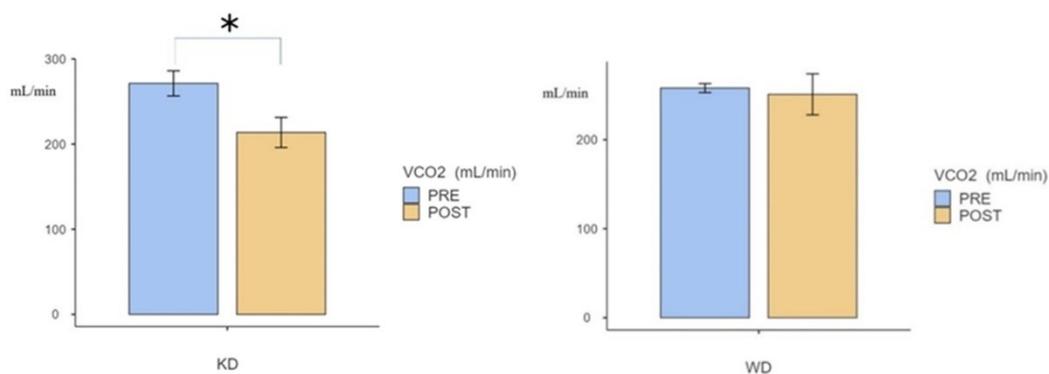


Figura 5: confronto pre e post nei due gruppi per la VCO_2 . * indica una differenza statisticamente significativa rispetto ai valori pre.

Non sono state rilevate altre differenze significative nei dati riportati in Tabella 3. Per quanto riguarda il metabolismo basale a riposo (RER) il gruppo KD ha abbassato il consumo energetico (-12%) mentre il gruppo WD lo ha lievemente alzato (+2,4%). Incrementando l'utilizzo di grassi e abbassando il consumo di carboidrati, entrambi i gruppi hanno abbassato il proprio quoziente respiratorio (-12% nei KD, -6% nei WD). Mentre il gruppo KD ha abbassato VO_2 il gruppo WD ha mostrato un aumento.

Tabella 3

	KD		WD		Time – p value	Time x Groups – p value
	PRE	POST	PRE	POST		
REE (kcal/day)	2172,000 ± 174,141	1896,333 ± 214,272	2091,500 ± 217,082	2142,500 ± 317,491	0,277	0,150
RQ	0,880 ± 0,118	0,767 ± 0,038	0,865 ± 0,078	0,810 ± 0,014	0,092	0,460
V _O ₂ (mL/min)	310,000 ± 30,315	277,000 ± 29,816	299,500 ± 36,062	310,500 ± 47,376	0,491	0,216
CHO (%)	57,100 ± 36,722	21,333 ± 13,191	54,450 ± 27,648	35,250 ± 6,718	0,077	0,483
FAT (%)	42,900 ± 36,722	78,667 ± 3,191	45,550 ± 27,648	64,750 ± 6,718	0,077	0,483

4.5 Parametri ematici

Dall'analisi ANOVA per misure ripetute è emerso un effetto significativo per l'interazione fra dieta e allenamento sui valori di testosterone libero nel sangue ($p=0,008$). In particolare, nel gruppo chetogenico si è manifestata una diminuzione (-16%) mentre nel gruppo di controllo un aumento (+20%) come mostrato in Figura 6.

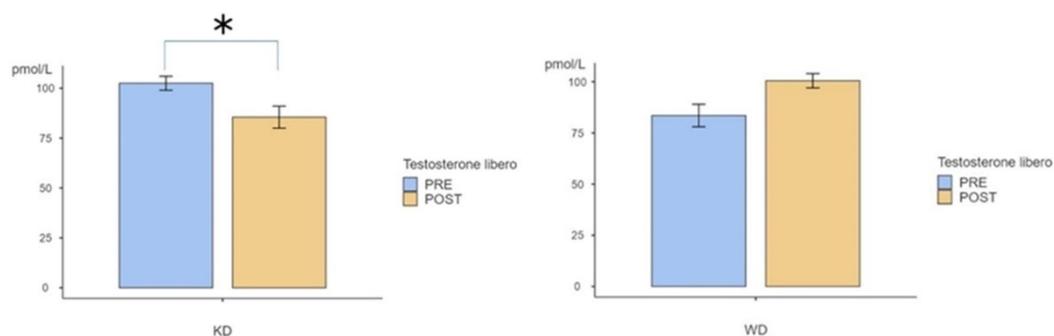


Figura 6: confronto pre e post nei due gruppi per il testosterone libero nel sangue. * indica una differenza statisticamente significativa rispetto ai valori pre.

Inoltre, è stata rilevata una diminuzione significativa per la sola variabile allenamento per i valori di FT3 ($p=0,04$) in entrambi i gruppi. Similmente i valori dei trigliceridi sono scesi sia nei KD sia nei WD per $p=0,02$ nell'effetto del solo tempo. Infine, è risultata una debole tendenza alla significatività per l'interazione fra allenamento e dieta per i valori di colesterolo HDL ($p=0,08$): in particolare i soggetti sottoposti alla dieta chetogenica hanno presentato un aumento (+10%) mentre quelli del gruppo controllo sono rimasti invariati (-2%). In Tabella 4 sono riportati tutti gli elementi analizzati nel campione ematico.

Tabella 4

	KD		WD		Time – P value	Time x Groups – P value
	PRE	POST	PRE	POST		
LEUCOCITI ($10^9/L$)	5,645 $\pm 0,856$	5,255 $\pm 0,035$	5,500 $\pm 0,113$	5,070 $\pm 0,608$	0,400	0,963
ERITROCITI ($10^{12}/L$)	5,020 $\pm 0,042$	4,980 $\pm 0,156$	5,310 $\pm 0,354$	5,390 $\pm 0,071$	0,870	0,633
EMOGLOBINA (g/L)	157,000 $\pm 1,414$	157,500 $\pm 2,121$	152,500 $\pm 4,950$	152,500 $\pm 6,364$	0,958	0,958
EMATOCRITO (L/L)	0,465 $\pm 0,001$	0,454 $\pm 0,014$	0,458 $\pm 0,021$	0,462 $\pm 0,0007$	0,716	0,503
MCV (fL)	92,650 $\pm 0,495$	91,200 $\pm 0,000$	86,300 $\pm 1,697$	85,600 $\pm 1,273$	0,043	0,245
MCH (pg)	31,300 $\pm 0,566$	31,600 $\pm 0,566$	28,750 $\pm 0,919$	28,300 $\pm 1,556$	0,771	0,238
MCHC (g/L)	338,000 $\pm 4,243$	347,000 $\pm 5,657$	333,000 $\pm 4,243$	330,500 $\pm 13,435$	0,427	0,222
RDW (%)	12,500 $\pm 0,000$	12,650 $\pm 0,354$	12,500 $\pm 0,424$	12,450 $\pm 0,636$	0,764	0,564
PIASTRINE ($10^9/L$)	251,000 $\pm 1,414$	255,000 $\pm 11,314$	193,000 $\pm 28,284$	198,500 $\pm 13,435$	0,563	0,924
NEUTROFILI ($10^9/L$)	2,990 $\pm 0,580$	2,490 $\pm 0,240$	2,070 $\pm 0,891$	2,080 $\pm 0,085$	0,511	0,496
LINFOCITI ($10^9/L$)	1,960 $\pm 0,198$	1,920 $\pm 0,170$	2,630 $\pm 0,778$	2,240 $\pm 0,778$	0,240	0,311
MONOCITI ($10^9/L$)	0,445 $\pm 0,120$	0,470 $\pm 0,099$	0,570 $\pm 0,000$	0,565 $\pm 0,092$	0,793	0,697
EOSINOFILI ($10^9/L$)	0,210 $\pm 0,057$	0,320 $\pm 0,113$	0,195 $\pm 0,007$	0,155 $\pm 0,021$	0,232	0,068
BASOFILI ($10^9/L$)	0,040 $\pm 0,014$	0,055 $\pm 0,021$	0,035 $\pm 0,007$	0,030 $\pm 0,014$	0,733	0,515

VES (mm/h)	3,000 ±1,414	2,500 ±0,707	7,500 ±6,364	15,000 ±16,971	0,450	0,399
GLUCOSIO (mg/dL)	100,000 ±1,414	94,000 ±12,728	92,000 ±2,828	82,000 ±14,142	0,383	0,808
CREATININA (umol/L)	79,500 ±21,920	83,500 ±20,506	91,500 ±20,506	83,500 ±12,021	0,578	0,187
eGFR (ml/m ² /1.73mq)	101,500 ±20,506	98,000 ±19,799	100,500 ±20,506	108,500 ±10,607	0,587	0,243
BIL. TOTALE (umol/L)	10,250 ±1,061	9,600 ±4,384	18,250 ±15,344	15,500 ±14,142	0,479	0,648
BIL. CON. (umol/L)	3,900 ±0,424	3,500 ±0,990	5,900 ±4,384	4,950 ±3,889	0,331	0,655
BIL. N.C. (umol/L)	6,350 ±0,636	6,100 ±3,394	12,350 ±10,960	10,550 ±10,253	0,552	0,646
AST (U/L)	22,500 ±10,607	27,000 ±14,142	26,000 ±4,243	26,500 ±0,707	0,293	0,375
ALT (U/L)	26,000 ±16,971	24,500 ±16,263	31,000 ±15,556	24,500 ±4,950	0,399	0,574
gGT (U/L)	14,500 ±0,707	9,500 ±3,536	10,000 ±1,414	10,000 ±4,243	0,219	0,219
PCR (mg/L)	0,040 ±0,000	0,400 ±0,000	0,425 ±0,544	3,040 ±3,734	0,318	0,423
COLESTEROLO (mg/dL)	166,000 ±16,971	167,000 ±31,113	158,000 ±16,971	150,000 ±5,657	0,639	0,555
HDL (mg/dL)	59,500 13,435	65,500 12,021	50,000 1,414	49,000 4,243	0,155	0,089
LDL (mg/dL)	94,000 ±24,042	95,000 ±35,355	93,000 ±18,385	94,000 ±11,314	0,852	1,000
TRIGLICERIDI (mg/dL)	89,000 ±25,456	55,000 ±26,870	100,000 ±15,556	61,000 ±1,414	0,026	0,718
TESTOSTERONE (nmol/L)	21,950 ±0,919	20,550 ±0,919	24,200 ±9,899	27,200 ±13,435	0,627	0,259
SHBG (nmol/L)	36,700 ±5,091	41,550 ±1,061	58,100 ±32,527	56,800 ±36,345	0,560	0,353
FT3 (pmol/L)	5,145 ±0,332	4,645 ±0,191	5,515 ±0,799	5,385 ±0,672	0,043	0,111
FT4 (pmol/L)	15,800 ±2,263	17,200 ±1,697	17,300 ±1,556	16,750 ±0,778	0,338	0,103
TSH (mIU/L)	2,850 ±1,909	2,775 ±2,213	3,655 ±0,912	2,810 ±1,527	0,198	0,253
INSULINA (mU/L)	4,250 ±1,202	3,350 ±0,354	5,000 ±4,243	4,550 ±3,889	0,354	0,729
IGF-1 (ug/L)	193,500 ±30,406	205,500 ±45,962	245,000 ±135,765	246,000 ±113,137	0,572	0,628
TNF (ng/L)	3,950 ±1,626	6,800 ±2,404	3,900 ±1,556	6,050 ±1,202	0,132	0,763

5 DISCUSSIONE

Lo scopo di questo progetto di ricerca è la valutazione degli effetti di 4 settimane di dieta chetogenica nella risposta in acuto ad una seduta di allenamento con sovraccarichi. Atleti sottoposti a regimi alimentari chetogenici sembrano infatti ridurre la risposta anabolica all'allenamento, pur mantenendo l'adattamento legato alla forza e alla performance: la spiegazione di questo fenomeno può essere ricercata a più livelli. È possibile, infatti, ipotizzare un adattamento a livello molecolare, in condizioni di chetosi la cellula tende ad inibire i processi anabolici a favore di quelli catabolici per promuovere la mobilitazione di scorte energetiche; ma anche un adattamento ormonale, durante la chetosi i principali ormoni anabolici (insulina, testosterone, ecc) vengono ridotti.

L'allenamento con sovraccarichi, infatti, è descritto come uno dei fattori più importanti per l'ipertrofia muscolare: attraverso diverse vie, che comprendono meccanicettori e sensori di danno cellulare, vengono attivate molecole segnalatrici, come acido fosfatidico, PI3K o perossinitrite, che convergono nell'accensione di vie anaboliche di cui Akt/mTOR rappresenta la principale [46], [58].

D'altro canto, gli studi di biochimica e fisiologia sulla dieta chetogenica ne evidenziano l'effetto catabolico. Nonostante non esistano ad oggi studi molecolari su esseri umani, è stato notato come nei ratti la carenza glucidica indotta dalla KD possa avere un effetto di stimolazione sulla via di AMPK e di inibizione della via di Akt/mTOR, sia indirettamente per le pathway coinvolte che direttamente per l'azione del beta-idrossibutirrato [13]

Ad oggi i risultati ottenuti da questa ricerca sono solo dati preliminari. In particolare, l'analisi del campione bioptico, ossia l'obiettivo principale dello studio, è ancora in corso presso il laboratorio di dipartimento e il numero di soggetti che hanno completato il ciclo di visite è soltanto all'inizio. Pertanto, non possono essere tratte conclusioni definitive. Tuttavia, ipotesi sui meccanismi sottesi a questi risultati iniziali possono essere proposte.

La composizione corporea dei soggetti è stata valutata prima e dopo l'intervento in maniera particolarmente dettagliata tramite quattro metodologie. Non si tratta di una ripetizione in quanto ognuna modalità presenta punti di forza differenti e la loro combinazione conduce alla quantificazione ottimale della composizione corporea. Innanzitutto, attraverso la DEXA che rappresenta il gold standard attuale nell'ambito dell'antropometria fornendo una valutazione accurata della massa grassa, magra e della densità ossea tramite raggi X a due energie. In secondo luogo, mediante la BIA standardizzata su soggetti fisicamente attivi la quale ha permesso una ottimale valutazione della quantità di acqua nel corpo sia totale (TBW) che extracellulare (ECW). Successivamente, tramite la CSA è stata permessa una valutazione macroscopica della regione anatomica particolarmente utile per visualizzare la componente di glicogeno. Infine, con l'analisi della biopsia si potranno trarre informazioni utili sulla composizione microscopica del muscolo in futuro.

Come atteso dalla ricerca in letteratura, nel gruppo chetogenico si è riscontrato un abbassamento significativo della massa grassa. La promozione della lipolisi data dalla KD, divenuta necessaria per soddisfare il fabbisogno energetico in condizione di scarsità glucidica, abbinata agli effetti del resistance training possono spiegare questa efficace perdita di massa grassa [18] Allo stesso tempo non è stato riscontrato alcun segno di ipertrofia muscolare similmente alla maggior parte degli studi in questo ambito [66], [67], [68]. Questa constatazione antropometrica si pone a favore della ipotesi iniziale dello studio sebbene occorrerà attendere l'indagine molecolare del campione biotico per determinare l'effettiva attività della via di Akt/mTOR.

Nel gruppo di controllo i dati sembrano invece evidenziare una mancata risposta dei soggetti al piano di dieta e allenamento volto all'ipertrofia: non è stato, infatti, riscontrato alcun aumento di massa magra. Una possibile ipotesi che potrebbe spiegare questo risultato è il fatto che, trattandosi di soggetti fisicamente attivi da anni, il periodo di circa un mese di intervento non sia stato sufficiente a causare variazioni significativamente tangibili. Si tratta comunque di un aspetto che esula dall'obiettivo della ricerca essendo quest'ultima focalizzata sugli effetti in acuto del resistance training e non sulle conseguenze in cronico. Secondo la ipotesi di

partenza, dalla futura biopsia muscolare ci si aspetta una normale attivazione di Akt/mTOR non essendoci l'interferenza del cheto-adattamento [46].

Dall'analisi bioptica ci si aspetta una riduzione non solo della fosforilazione delle proteine segnale della via di mTOR, ma probabilmente anche del contenuto totale delle proteine stesse. È infatti stato recentemente dimostrato a livello murino, che il contenuto epatico di pS6K1, un indice di attivazione di mTOR, si riduce durante un regime chetogenico [76].

La forza muscolare è risultata aumentata sia nel gruppo KD che nel gruppo WD sebbene non in maniera statisticamente significativa. Questo aumento ha interessato sia la forza dinamica alla leg extension sia la forza isometrica al test specifico. Poiché dall'elaborazione della composizione corporea non è stato rilevato nessun aumento di tessuto muscolare, questa tendenza al miglioramento può essere spiegata con una ottimizzazione della componente neurologica della forza. Questa interazione viene descritta chiaramente riportando gli indici di forza con le misurazioni del muscolo. Infatti, è descritto in letteratura l'effetto del resistance training sul miglioramento della forza anche secondo adattamento neuronale in termini di reclutamento di fibre e neuroplasticità [61]; resta invece da valutare l'effettivo merito della dieta chetogenica in questo contesto. A questo proposito vanno menzionate le caratteristiche neuroprotettive della KD e dei corpi chetonici coinvolte nei trattamenti neurologici come l'epilessia: queste hanno dato evidenze cliniche e sono ancora materia di studio ed è ipotizzabile che possano influire anche in altri ambiti nervosi come la forza muscolare [6], [23]. Inoltre, potrebbe essere avvenuta l'influenza del beta-idrossibutirrato come bio-stimolatore diretto della forza muscolare [75].

Similmente, diversi studi hanno riscontrato un aumento della forza o quantomeno una preservazione di questa e pertanto il gruppo KD di questo progetto ha seguito le aspettative anche per questo aspetto [66], [67], [68].

Per la valutazione complessiva della variazione di forza muscolare è, tuttavia, necessario attendere l'analisi e la comparazione dei risultati dati dalle elettromiografie ad alta sensibilità.

Riguardo ai test utilizzati è possibile avanzare due considerazioni. La prima riguarda la maggior accuratezza data dal test specifico per MCV dove l'isolamento dei muscoli estensori della gamba è ottimale e difficilmente possono verificarsi influenze date dall'apprendimento motorio fra i soggetti in quanto trattasi di un movimento poco comune. Viceversa, la prova dinamica sulla leg extension è meno precisa per i carichi (essendo a gradoni fisici e non digitalizzati al decimale dal computer), isola più difficilmente il muscolo sotto esame (soprattutto durante uno sforzo massimale) ed infine è più soggetta all'abitudine individuale al movimento (es. un soggetto ha riscontrato un miglioramento della 1RM maggiore degli altri in quanto probabilmente ha imparato l'esecuzione durante l'intervento).

Considerato il noto effetto della KD sulla stimolazione dei fattori neurotrofici, come il BDNF, è possibile che la chetosi possa influenzare la risposta fisiologica a livello neuromuscolare. È stato infatti già osservato che il BDNF muscolare aumenta l'eccitabilità del motoneurone [77]. Inoltre, recenti evidenze hanno evidenziato che il BDNF sintetizzato dal muscolo durante la contrazione rafforza la funzione sinaptica, un effetto indotto dall'interazione tra le neurotrofine e il recettore TrkB. È quindi plausibile ipotizzare che questi adattamenti si traducono in una migliore eccitabilità e conduzione elettrica, che auspichiamo di osservare mediante le analisi di HD-EMG.

All'indagine di calorimetria indiretta il gruppo KD ha manifestato un abbassamento del metabolismo energetico a riposo seppur non statisticamente significativo. Questo aspetto si trova in disaccordo con i risultati di alcuni studi e con l'ipotesi dell'aumento del REE nei soggetti sottoposti a dieta chetogenica come concausa della efficace perdita di massa grassa [28], [29]. Viceversa, il gruppo di controlli ha presentato una tendenza alla diminuzione. Data quindi la scarsa significatività di questi dati non è possibile trarre delle conclusioni in merito.

Entrambi i gruppi sembrano abbassare il proprio quoziente respiratorio favorendo quindi il metabolismo lipidico a quello glucidico.

Tuttavia, poiché la raccolta dei dati del metabolismo a riposo è un'indagine particolarmente delicata dipendente dallo stato nutrizionale (il soggetto doveva essere a digiuno), attività fisica (è stato chiesto al soggetto di non effettuare

particolare movimento a ridosso del test) e stato emotivo (facilmente il soggetto può sentirsi sotto particolare stress durante un test di laboratorio), possono esserci stati diversi fattori confondenti come suggerisce la deviazione standard relativamente elevata di queste misure.

L'unica differenza significativa dall'indagine REE è stata riguardo la VCO_2 in cui il gruppo KD ha abbassato maggiormente il valore. Questo risultato può essere commentato attraverso le conclusioni di uno studio del 2015 di Rubini e altri. Questi autori hanno infatti sostenuto che la dieta chetogenica può ridurre significativamente le riserve corporee di anidride carbonica, come avvenuto in questo esperimento, il che potrebbe essere utile a soggetti affetti da insufficienza respiratoria caratterizzata da alta pressione arteriosa parziale di anidride carbonica [35].

Alle analisi ematochimiche è stata riscontrata una differenza significativa del comportamento del testosterone libero nei due gruppi. Mentre il gruppo WD ha mostrato un innalzamento di questo valore, il gruppo KD un abbassamento. Questo dato è particolarmente interessante in quanto può far suggerire l'abbassamento di questo ormone anabolizzante come concausa della mancata crescita muscolare nei KD. Tuttavia, questa idea può essere confutata dal fatto che solo la componente libera di testosterone ha presentato questo andamento mentre il testosterone totale è rimasto tendenzialmente invariato nei KD e aumentato non significativamente nei WD.

Interessanti sono i risultati relativi ai lipidi nel sangue. I trigliceridi sono risultati abbassati significativamente per il fattore allenamento in entrambi i gruppi. Questo può essere spiegato da un lato dall'effetto ipotrigliceridemizzante dell'esercizio fisico e dall'altro dall'adesione dei soggetti alle diete salutari (sia KD che WD) scelte dal gruppo di ricerca. Infatti, sapendo di stare seguendo uno studio accademico, molto probabilmente i soggetti avranno assunto meno alimenti molto elaborati e "trash food".

Il gruppo KD rispetto al gruppo WD ha presentato un aumento del colesterolo HDL debolmente tendente alla significatività. Per quanto sia un risultato di debole

importanza può suggerire l'effetto cardioprotettivo della dieta chetogenica descritto in letteratura [33].

Complessivamente i valori delle analisi ematiche ben rappresentano lo stato di salute intatto dei soggetti. Come descritto nei criteri di inclusione, sono stati selezionati individui giovani e non affetti da patologie croniche così come dimostrano i valori pre-intervento. Durante il periodo di dieta chetogenica, i soggetti del gruppo KD non hanno mostrato effetti collaterali: gli indici lipidici sono rimasti nelle condizioni fisiologiche nonostante la dieta iperlipidica, la glicemia è rimasta pressoché stabile e fisiologica nonostante la carenza glucidica, non si sono verificati segni di infiammazione sistemica né attraverso le transaminasi e PCR né mediante interleuchine, gli indici di salute renale (creatinina ed eGFR) sono rimasti fisiologici e stabili come anche i valori di colestasi. Questa visione d'insieme suggerisce quindi la sicurezza dell'approccio alimentare chetogenico negli atleti se ben strutturato.

Infine, sono da considerare le limitazioni e i punti di debolezza di questa indagine. Innanzitutto, il reclutamento dei soggetti per questo studio è risultato difficile in quanto è stata richiesta la disponibilità a sottoporsi a biopsie muscolari. Quest'ultime, per quanto siano effettuate da personale medico chirurgo in totale sicurezza, hanno rappresentato un ostacolo alla partecipazione al progetto e sono state causa dei due abbandoni. In particolare, non si sono verificati eventi avversi quanto piuttosto risvolti personali di perdita di motivazione.

L'esperimento, inoltre, ha indagato multipli macro-argomenti e utilizzato diverse matrici. Questo ha determinato la partecipazione di diverse figure qualificate nei singoli ambiti e l'utilizzo di molteplici strumentazioni. Se da un lato queste scelte hanno permesso una visione d'insieme completa dei potenziali risultati dell'intervento, d'altra parte hanno aumentato le tempistiche necessarie e la probabilità di errore complessiva.

Nel dettaglio di questo lavoro di tesi, la principale limitazione è data dalla precocità dell'analisi tradotta nel basso numero di soggetti presi in considerazione e nella parzialità dell'iter di raccolta dati.

6 CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso una valutazione in itinere di uno studio complesso sulla relazione fra dieta chetogenica e allenamento con sovraccarichi.

In particolare, i risultati preliminari confermano l'efficacia della dieta chetogenica nella perdita di peso e massa grassa mentre non è stata rilevata alcuna risposta ipertrofica. Allo stesso tempo, nei soggetti sottoposti a KD la forza muscolare è aumentata, anche se non significativamente.

Alla luce di ciò, la dieta chetogenica potrebbe essere presa in considerazione come strategia alimentare al fine di ridurre peso e massa grassa negli atleti.

Inoltre, questa analisi preliminare è stata utile al gruppo di ricerca per avere un primo riscontro riguardo l'andamento dello studio. Questo potrà quindi essere eventualmente usato come strumento di perfezionamento del disegno sperimentale.

Per trarre conclusioni definitive è necessario attendere l'avanzamento dello studio sia per il numero di soggetti esaminati che per il completamento delle analisi molecolari del campione bioptico e dei risultati della hd-EMG.

Infine, questa ricerca fornisce informazioni e suggerimenti per studi futuri sull'adozione di regimi alimentari chetogenici in atleti di sport con sovraccarichi non elite.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Paoli, A. Bianco, and K. A. Grimaldi, "The Ketogenic Diet and Sport: A Possible Marriage?," *Exerc Sport Sci Rev*, vol. 43, no. 3, 2015, doi: 10.1249/JES.0000000000000050.
- [2] S. D. Phinney, B. R. Bistrian, W. J. Evans, E. Gervino, and G. L. Blackburn, "The human metabolic response to chronic ketosis without caloric restriction: Preservation of submaximal exercise capability with reduced carbohydrate oxidation," *Metabolism*, vol. 32, no. 8, 1983, doi: 10.1016/0026-0495(83)90106-3.
- [3] P. Trimboli, M. Castellana, D. Bellido, and F. F. Casanueva, "Confusion in the nomenclature of ketogenic diets blurs evidence," *Rev Endocr Metab Disord*, vol. 21, no. 1, 2020, doi: 10.1007/s11154-020-09546-9.
- [4] T. D. Noakes and J. Windt, "Evidence that supports the prescription of low-carbohydrate high-fat diets: A narrative review," *British Journal of Sports Medicine*, vol. 51, no. 2. 2017. doi: 10.1136/bjsports-2016-096491.
- [5] A. Lodi *et al.*, "The effects of different high-protein low-carbohydrates proprietary foods on blood sugar in healthy subjects," *J Med Food*, vol. 19, no. 11, 2016, doi: 10.1089/jmf.2016.0072.
- [6] A. Ko, H. E. Kwon, and H. D. Kim, "Updates on the ketogenic diet therapy for pediatric epilepsy," *Biomedical Journal*, vol. 45, no. 1. 2022. doi: 10.1016/j.bj.2021.11.003.
- [7] O. E. Owen, A. P. Morgan, H. G. Kemp, J. M. Sullivan, M. G. Herrera, and G. F. Cahill, "Brain metabolism during fasting.," *J Clin Invest*, vol. 46, no. 10, 1967, doi: 10.1172/JCI105650.
- [8] R. Nagy, "Dr. Atkins' diet revolution: A review," *VIRGINIA MED.MTH.*, vol. 101, no. 5, 1974.
- [9] A. Paoli, A. Rubini, J. S. Volek, and K. A. Grimaldi, "Beyond weight loss: A review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets," *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 67, no. 8. 2013. doi: 10.1038/ejcn.2013.116.
- [10] D. L. Nelson and M. M. Cox, "Lehninger Principles of Biochemistry 7th," *W.H. Freeman and Company*, vol. 2, 2017.
- [11] O. E. Owen, S. C. Kalhan, and R. W. Hanson, "The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 34. 2002. doi: 10.1074/jbc.R200006200.
- [12] M. A. Paredes-Flores and S. S. Mohiuddin, *Biochemistry, Glycogenolysis*. 2020.

- [13] A. Paoli, P. Cancellara, P. Pompei, and T. Moro, "Ketogenic diet and skeletal muscle hypertrophy: A Frenemy relationship?," *J Hum Kinet*, vol. 68, no. 1, 2019, doi: 10.2478/hukin-2019-0071.
- [14] P. A. C. McPherson and J. McEneny, "The biochemistry of ketogenesis and its role in weight management, neurological disease and oxidative stress," *Journal of Physiology and Biochemistry*, vol. 68, no. 1. 2012. doi: 10.1007/s13105-011-0112-4.
- [15] A. Nehlig, "Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models," *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, vol. 70, no. 3, 2004, doi: 10.1016/j.plefa.2003.07.006.
- [16] O. E. Owen, P. Felig, A. P. Morgan, J. Wahren, and G. F. Cahill, "Liver and kidney metabolism during prolonged starvation.," *J Clin Invest*, vol. 48, no. 3, 1969, doi: 10.1172/JCI106016.
- [17] H. A. Krebs, "The regulation of the release of ketone bodies by the liver," *Adv Enzyme Regul*, vol. 4, no. C, 1966, doi: 10.1016/0065-2571(66)90027-6.
- [18] D. Ashtary-Larky *et al.*, "Ketogenic diets, physical activity and body composition: a review," *British Journal of Nutrition*, vol. 127, no. 12. 2022. doi: 10.1017/S0007114521002609.
- [19] L. Laffel, "Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes," *Diabetes Metab Res Rev*, vol. 15, no. 6, 1999, doi: 10.1002/(sici)1520-7560(199911/12)15:6<412::aid-dmrr72>3.0.co;2-8.
- [20] L. Barrea *et al.*, "Effects of very low-calorie ketogenic diet on hypothalamic–pituitary–adrenal axis and renin–angiotensin–aldosterone system," *Journal of Endocrinological Investigation*, vol. 46, no. 8. 2023. doi: 10.1007/s40618-023-02068-6.
- [21] F. G. Hegardt, "Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: A control enzyme in ketogenesis," *Biochemical Journal*, vol. 338, no. 3. 1999. doi: 10.1042/0264-6021:3380569.
- [22] N. A. Youngson, M. J. Morris, and B. Ballard, "The mechanisms mediating the antiepileptic effects of the ketogenic diet, and potential opportunities for improvement with metabolism-altering drugs," *Seizure*, vol. 52. 2017. doi: 10.1016/j.seizure.2017.09.005.
- [23] C. E. Stafstrom and J. M. Rho, "The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders," *Front Pharmacol*, vol. 3 APR, 2012, doi: 10.3389/fphar.2012.00059.
- [24] A. Paoli, A. Bianco, T. Moro, J. F. Mota, and C. F. Coelho-Ravagnani, "The Effects of Ketogenic Diet on Insulin Sensitivity and Weight Loss, Which Came First: The Chicken or the Egg?," *Nutrients*, vol. 15, no. 14. 2023. doi: 10.3390/nu15143120.

- [25] M. Veldhorst *et al.*, "Protein-induced satiety: Effects and mechanisms of different proteins," *Physiology and Behavior*, vol. 94, no. 2, 2008. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.01.003.
- [26] P. Sumithran *et al.*, "Ketosis and appetite-mediating nutrients and hormones after weight loss," *Eur J Clin Nutr*, vol. 67, no. 7, 2013, doi: 10.1038/ejcn.2013.90.
- [27] A. A. Gibson *et al.*, "Do ketogenic diets really suppress appetite? A systematic review and meta-analysis," *Obesity Reviews*, vol. 16, no. 1, 2015, doi: 10.1111/obr.12230.
- [28] C. B. Ebbeling *et al.*, "A randomized study of dietary composition during weight-loss maintenance: Rationale, study design, intervention, and assessment," *Contemp Clin Trials*, vol. 65, 2018, doi: 10.1016/j.cct.2017.12.004.
- [29] D. S. Ludwig, S. L. Dickinson, B. Henschel, C. B. Ebbeling, and D. B. Allison, "Do lower-carbohydrate diets increase total energy expenditure? An updated and reanalyzed meta-analysis of 29 controlled-feeding studies," *Journal of Nutrition*, vol. 151, no. 3, 2021, doi: 10.1093/jn/nxaa350.
- [30] K. D. Hall *et al.*, "Energy expenditure and body composition changes after an isocaloric ketogenic diet in overweight and obese men," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 104, no. 2, 2016, doi: 10.3945/ajcn.116.133561.
- [31] N. B. Bueno, I. S. V. De Melo, S. L. De Oliveira, and T. Da Rocha Ataíde, "Very-low-carbohydrate ketogenic diet v. low-fat diet for long-term weight loss: A meta-analysis of Randomised controlled trials," *British Journal of Nutrition*, vol. 110, no. 7, 2013. doi: 10.1017/S0007114513000548.
- [32] A. Paoli, L. Mancin, M. C. Giacona, A. Bianco, and M. Caprio, "Effects of a ketogenic diet in overweight women with polycystic ovary syndrome," *J Transl Med*, vol. 18, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s12967-020-02277-0.
- [33] D. Dyńka, K. Kowalcze, A. Charuta, and A. Pazińska, "The Ketogenic Diet and Cardiovascular Diseases," *Nutrients*, vol. 15, no. 15, 2023. doi: 10.3390/nu15153368.
- [34] A. Paoli and G. Cerullo, "Investigating the Link between Ketogenic Diet, NAFLD, Mitochondria, and Oxidative Stress: A Narrative Review," *Antioxidants*, vol. 12, no. 5, 2023. doi: 10.3390/antiox12051065.
- [35] A. Rubini *et al.*, "Effects of Twenty Days of the Ketogenic Diet on Metabolic and Respiratory Parameters in Healthy Subjects," *Lung*, vol. 193, no. 6, 2015, doi: 10.1007/s00408-015-9806-7.
- [36] G. Muscogiuri *et al.*, "The management of very low-calorie ketogenic diet in obesity outpatient clinic: A practical guide," *Journal of Translational Medicine*, vol. 17, no. 1, 2019. doi: 10.1186/s12967-019-2104-z.

- [37] P. R. Boulter, R. S. Hoffman, and R. A. Arky, "Pattern of sodium excretion accompanying starvation," *Metabolism*, vol. 22, no. 5, 1973, doi: 10.1016/0026-0495(73)90239-4.
- [38] H. C. Kang, D. E. Chung, D. W. Kim, and H. D. Kim, "Early- and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy," *Epilepsia*, vol. 45, no. 9, 2004, doi: 10.1111/j.0013-9580.2004.10004.x.
- [39] E. L. Lim, K. G. Hollingsworth, B. S. Aribisala, M. J. Chen, J. C. Mathers, and R. Taylor, "Reversal of type 2 diabetes: Normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol," *Diabetologia*, vol. 54, no. 10, 2011, doi: 10.1007/s00125-011-2204-7.
- [40] J. W. Wheless, "The ketogenic diet: An effective medical therapy with side effects," *Journal of Child Neurology*, vol. 16, no. 9, 2001. doi: 10.1177/088307380101600901.
- [41] W. A. Stewart, K. Gordon, and P. Camfield, "Acute pancreatitis causing death in a child on the ketogenic diet," *J Child Neurol*, vol. 16, no. 9, 2001, doi: 10.1177/088307380101600910.
- [42] M. S. Westerterp-Plantenga, A. Nieuwenhuizen, D. Tomé, S. Soenen, and K. R. Westerterp, "Dietary protein, weight loss, and weight maintenance," *Annual Review of Nutrition*, vol. 29, 2009. doi: 10.1146/annurev-nutr-080508-141056.
- [43] D. Festi *et al.*, "Review: Low caloric intake and gall-bladder motor function," in *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement*, 2000. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.014s2051.x.
- [44] S. Kielb, H. P. Koo, D. A. Bloom, and G. J. Faerber, "Nephrolithiasis associated with the ketogenic diet," *Journal of Urology*, vol. 164, no. 2, 2000, doi: 10.1016/S0022-5347(05)67400-9.
- [45] D. J. Glass, "Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy," *Nature Cell Biology*, vol. 5, no. 2, 2003. doi: 10.1038/ncb0203-87.
- [46] S. Schiaffino, C. Reggiani, T. Akimoto, and B. Blaauw, "Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy," *Journal of Neuromuscular Diseases*, vol. 8, no. 2, 2021. doi: 10.3233/JND-200568.
- [47] E. E. Spangenburg, D. Le Roith, C. W. Ward, and S. C. Bodine, "A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy," *Journal of Physiology*, vol. 586, no. 1, 2008, doi: 10.1113/jphysiol.2007.141507.
- [48] C. Basualto-Alarcón, G. Jorquera, F. Altamirano, E. Jaimovich, and M. Estrada, "Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy," *Med Sci Sports Exerc*, vol. 45, no. 9, 2013, doi: 10.1249/MSS.0b013e31828cf5f3.

- [49] S. Chowdhury *et al.*, “Muscle-derived interleukin 6 increases exercise capacity by signaling in osteoblasts,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 130, no. 6, 2020, doi: 10.1172/JCI133572.
- [50] S. J. Lee and A. C. McPherron, “Regulation of myostatin activity and muscle growth,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 16, 2001, doi: 10.1073/pnas.151270098.
- [51] R. Sartori *et al.*, “BMP signaling controls muscle mass,” *Nat Genet*, vol. 45, no. 11, 2013, doi: 10.1038/ng.2772.
- [52] L. Deldicque, “Protein intake and exercise-induced skeletal muscle hypertrophy: An update,” *Nutrients*, vol. 12, no. 7, 2020. doi: 10.3390/nu12072023.
- [53] N. Ito, U. T. Rugg, A. Kudo, Y. Miyagoe-Suzuki, and S. Takeda, “Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy,” *Nat Med*, vol. 19, no. 1, 2013, doi: 10.1038/nm.3019.
- [54] Y. Eid Mutlak *et al.*, “A signaling hub of insulin receptor, dystrophin glycoprotein complex and plakoglobin regulates muscle size,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14895-9.
- [55] J. S. You *et al.*, “The role of diacylglycerol kinase ζ and phosphatidic acid in the mechanical activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and skeletal muscle hypertrophy,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 3, 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.531392.
- [56] J. P. White *et al.*, “G protein-coupled receptor 56 regulates mechanical overload-induced muscle hypertrophy,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 44, 2014, doi: 10.1073/pnas.1417898111.
- [57] T. Braun and M. Gautel, “Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 12, no. 6, 2011. doi: 10.1038/nrm3118.
- [58] M. Sandri *et al.*, “Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle. the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway,” *Biogerontology*, vol. 14, no. 3, 2013, doi: 10.1007/s10522-013-9432-9.
- [59] T. J. Suchomel, S. Nimphius, and M. H. Stone, “The Importance of Muscular Strength in Athletic Performance,” *Sports Medicine*, vol. 46, no. 10, 2016. doi: 10.1007/s40279-016-0486-0.
- [60] Y. Lei, N. L. Suresh, W. Z. Rymer, and X. Hu, “Organization of the motor-unit pool for different directions of isometric contraction of the first dorsal interosseous muscle,” *Muscle Nerve*, vol. 57, no. 1, 2018, doi: 10.1002/mus.25963.

- [61] A. Kandola, G. Ashdown-Franks, J. Hendrikse, C. M. Sabiston, and B. Stubbs, "Physical activity and depression: Towards understanding the antidepressant mechanisms of physical activity," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 107. 2019. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.09.040.
- [62] F. G. de M. Coelho, S. Gobbi, C. A. A. Andreatto, D. I. Corazza, R. V. Pedroso, and R. F. Santos-Galduróz, "Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): A systematic review of experimental studies in the elderly," *Archives of Gerontology and Geriatrics*, vol. 56, no. 1. 2013. doi: 10.1016/j.archger.2012.06.003.
- [63] C. Morland *et al.*, "Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1," *Nat Commun*, vol. 8, 2017, doi: 10.1038/ncomms15557.
- [64] A. Davison, "Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects," *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, vol. 52, no. 8, 1989, doi: 10.1136/jnnp.52.8.1021-a.
- [65] R. Ramos-Ruiz, E. Poirot, and M. Flores-Mosquera, "GABA, a non-protein amino acid ubiquitous in food matrices," *Cogent Food Agric*, vol. 4, no. 1, 2018, doi: 10.1080/23311932.2018.1534323.
- [66] A. Paoli *et al.*, "Ketogenic diet does not affect strength performance in elite artistic gymnasts," *J Int Soc Sports Nutr*, vol. 9, 2012, doi: 10.1186/1550-2783-9-34.
- [67] D. A. Greene, B. J. Varley, T. B. Hartwig, P. Chapman, and M. Rigney, "A low-carbohydrate ketogenic diet reduces body mass without compromising performance in powerlifting and olympic weightlifting athletes," *J Strength Cond Res*, vol. 32, no. 12, 2018, doi: 10.1519/jsc.0000000000002904.
- [68] A. Paoli *et al.*, "Effects of two months of very low carbohydrate ketogenic diet on body composition, muscle strength, muscle area, and blood parameters in competitive natural body builders," *Nutrients*, vol. 13, no. 2, 2021, doi: 10.3390/nu13020374.
- [69] A. Antonio Paoli *et al.*, "Effects of 30 days of ketogenic diet on body composition, muscle strength, muscle area, metabolism, and performance in semi-professional soccer players," *J Int Soc Sports Nutr*, vol. 18, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s12970-021-00459-9.
- [70] J. M. Wilson *et al.*, "Effects of Ketogenic Dieting on Body Composition, Strength, Power, and Hormonal Profiles in Resistance Training Men," *J Strength Cond Res*, vol. 34, no. 12, 2020, doi: 10.1519/JSC.0000000000001935.
- [71] S. Vargas-Molina *et al.*, "Effects of a ketogenic diet on body composition and strength in trained women," *J Int Soc Sports Nutr*, vol. 17, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s12970-020-00348-7.

- [72] G. Grandl *et al.*, "Short-term feeding of a ketogenic diet induces more severe hepatic insulin resistance than an obesogenic high-fat diet," *Journal of Physiology*, vol. 596, no. 19, 2018, doi: 10.1113/JP275173.
- [73] M. N. Roberts *et al.*, "A Ketogenic Diet Extends Longevity and Healthspan in Adult Mice," *Cell Metab*, vol. 26, no. 3, 2017, doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.005.
- [74] M. D. Roberts *et al.*, "A putative low-carbohydrate ketogenic diet elicits mild nutritional ketosis but does not impair the acute or chronic hypertrophic responses to resistance exercise in rodents," *J Appl Physiol*, vol. 120, no. 10, 2016, doi: 10.1152/jappphysiol.00837.2015.
- [75] E. Hu *et al.*, "Beta-hydroxybutyrate Promotes the Expression of BDNF in Hippocampal Neurons under Adequate Glucose Supply," *Neuroscience*, vol. 386, 2018, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.06.036.
- [76] L. Willemse, K. Terburgh, and R. Louw, "A ketogenic diet alters mTOR activity, systemic metabolism and potentially prevents collagen degradation associated with chronic alcohol consumption in mice," *Metabolomics*, vol. 19, no. 5, 2023, doi: 10.1007/s11306-023-02006-w.
- [77] M. Gonzalez and W. F. Collins, "Modulation of motoneuron excitability by brain-derived neurotrophic factor," *J Neurophysiol*, vol. 77, no. 1, 1997, doi: 10.1152/jn.1997.77.1.502.