

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI

XXXV Ciclo

(Anni 2019-2022)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

**VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI SPECIFICI INTERVENTI
NUTRIZIONALI SUL PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI DEL
SIERO**

RELATORE

Chiar.ma

Prof.ssa Angela A. Rivellese

CANDIDATO/A

Dott. Dominic Salamone

INDICE

RIASSUNTO	pag 1
1. INTRODUZIONE	pag.2
2. ACIDI GRASSI A CORTA	pag 4
2.1 Il microbiota e i prodotti di fermentazione intestinale	pag 4
2.2 Biosintesi, assorbimento e distribuzione degli SCFA	pag 6
2.3 Potenziali effetti degli SCFA sulla salute umana.	pag 8
2.3.1 Studi Osservazionali	pag 8
2.3.2 Studi d'intervento	pag 10
2.4 Possibili meccanismi	Pag 12
3. PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI E LIPOGENESI DE NOVO	pag 15
3.1 La Lipogenesi De Novo	pag 15
3.2 Metodiche di valutazione Lipogenesi De Novo	pag 16
3.2.1 Metodiche Dirette: valutazione della Lipogenesi De Novo con gli isotopi	pag 16
3.2.2 Metodiche indirette: il profilo degli acidi grassi e gli indici indiretti	pag 18
3.3 Lipogenesi De Novo e accumulo di grasso ectopico	pag 19
3.4 Interventi nutrizionali e Lipogenesi De Novo	pag 20
4. SCOPO E LINEE DI RICERCA	pag 23
5. LINEE DI RICERCA	pag 24
5.1 Linea di ricerca 1	pag 24
5.2 Linea di ricerca 2	pag 30
A) Effetti di un pane ricco in amilosio sul metabolismo glucidico e sulla fermentazione intestinale (Pubblicazione n.3, Journal of Nutrition, 2022)	pag 30
B) Effetto di una dieta mediterranea in acuto e in cronico sul metabolismo glucidico e sulla fermentazione intestinale (pubblicazione n° 4 Clinical Nutrition, 2021)	pag 45
5.3 Linea di ricerca 3	pag 66
A) La riduzione della lipogenesi de novo media gli effetti benefici di diete isoenergetiche sul grasso epatico. (pubblicazione n°5, Nutrients 2022)	pag 66
B) Una dieta multifattoriale riduce il grasso pancreatico e incrementa la risposta insulinica postprandiale in pazienti con diabete di tipo 2 (pubblicazione n° 6, Diabetes Care, 2022)	pag 82
6. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	pag 100
7. BIBLIOGRAFIA	pag 103
8. APPENDICE	pag 124
9. PUBBLICAZIONI OGGETTO DELLA TESI DEL DOTTORATO	pag 130

RIASSUNTO

Le possibili relazioni tra abitudini alimentari, prodotti del microbiota intestinale, quali gli acidi grassi a corta catena (SCFA), la Lipogenesi De Novo (DNL), metabolismo glicolipidico e grasso ectopico sono un aspetto di grande interesse scientifico. Nonostante il notevole numero di lavori restano ancora molti punti da chiarire, in particolare, per quanto riguarda gli effetti di studi di intervento controllati nell'uomo. Pertanto, la ricerca svolta durante il mio percorso di dottorato si è focalizzata su: 1) valutazione della capacità fermentativa di individui a rischio cardio- metabolico (pazienti sovrappeso/obesi senza e con diabete di tipo 2); 2) valutazione degli effetti di alimenti ricchi in fibre/amilosio o di diete a base di prodotti di origine vegetale sulla produzione di SCFA e il loro ruolo nella regolazione del metabolismo glucidico; 3) definizione del possibile ruolo della DNL nella riduzione del grasso epatico e pancreatico dopo un intervento nutrizionale con una dieta multifattoriale, ricca in fibre, polifenoli e PUFA n-3, PUFA n-6 e MUFA o con una dieta ricca solo in MUFA. Per quanto riguarda il primo punto, i risultati ottenuti nei pazienti con diabete dimostrano che le concentrazioni dell'acido acetico, propionico e butirrico sono ridotte rispetto a quelli dei soggetti sovrappeso/obesi non diabetici; tuttavia, solo la riduzione dell'acido propionico è associata al diabete di per sé. L'acido acetico e butirrico sono influenzati da altri fattori oltre che dal diabete. La riduzione dell'acido butirrico è associata all'età, indicando una riduzione della capacità fermentativa del microbiota intestinale con l'avanzare dell'età, mentre l'acido acetico è associato al colesterolo-LDL. In relazione al secondo punto è stato dimostrato che: 1) il consumo in acuto di pane ricco in amilosio è capace di migliorare in soggetti sovrappeso/obesi la risposta della glicemia e dell'insulina in fase postprandiale, aumentando allo stesso tempo i livelli postprandiali di acido propionico. Tale aumento è, inoltre, associato alla riduzione della risposta insulinica postprandiale suggerendo un possibile ruolo dell'acido propionico nel miglioramento della sensibilità insulinica in fase postprandiale; 2) una dieta ispirata al modello mediterraneo rispetto ad una dieta occidentale migliora, sia in acuto che in cronico, la risposta della glicemia e dell'insulina in fase postprandiale inducendo un miglioramento della sensibilità insulinica in questa fase. La Dieta Mediterranea determina un aumento dei batteri che fermentano le fibre con conseguente aumento, in particolare, dell'acido butirrico. Questo aumento si associa significativamente al miglioramento della sensibilità insulinica ottenuto in fase postprandiale con la dieta mediterranea, suggerendo che proprio la modifica della composizione del microbiota e l'aumento dell'acido butirrico giochino un ruolo fondamentale nel miglioramento del metabolismo glucidico in fase postprandiale. Per quanto riguarda il terzo punto, è stato dimostrato che una dieta multifattoriale, con diverse componenti bioattive, ispirata ancora una volta ad un modello Mediterraneo, rispetto ad una dieta ricca in MUFA, anche essa già dimostratasi "salutare", è capace di agire non solo sul metabolismo intermedio ma anche di ridurre significativamente sia il grasso epatico che il grasso pancreatico. In particolare, mentre la riduzione del grasso epatico sembra essere in relazione con la riduzione della DNL, valutata come rapporto acido palmitico/acido linoleico, questo non avviene con la riduzione del grasso pancreatico, i cui meccanismi potrebbero essere diversi e devono essere ulteriormente indagati. Pertanto, dai risultati ottenuti è possibile porre delle basi per l'identificazione di alimenti funzionali o strategie nutrizionali nella prevenzione e nel trattamento del diabete, della steatosi epatica e pancreatica.

1. INTRODUZIONE

Gli acidi grassi sono molecole formate da catene di atomi di carbonio dotate di un gruppo terminale carbossilico. Gli acidi grassi possono essere classificati in diversi gruppi in base alla lunghezza della loro catena:

- gli acidi grassi a corta catena (SCFA) con una catena alifatica di 1-5 atomi di carbonio;
- gli acidi grassi a media catena (MCFA) con una catena alifatica di 6-12 atomi di carbonio;
- gli acidi grassi a lunga catena (LCFA) con una catena alifatica di 14-20 atomi di carbonio;
- gli acidi grassi a lunghissima catena (VLCFA) con una catena alifatica maggiore di 22 atomi di carbonio.

La *liposolubilità* degli acidi grassi, misurata come porzioni di acidi liberi tra acqua ed esano, incrementa gradualmente con l'aumento del numero degli atomi di carbonio; a causa della loro alta solubilità nei solventi acquosi, rispetto agli LCFA e VLCFA, gli SCFA non formano strutture micellari, non partecipano alla formazione di membrane biologiche e sono presenti in forma libera nel circolo sanguigno. Gli SCFA possono essere contenuti negli alimenti fermentati quali formaggi, burro, yogurt, crauti, aceto e bevande alcoliche: l'aceto e le bevande alcoliche contengono acetato, il formaggio l'acido propionico e l'acido butirrico e il burro l'acido butirrico (Wolfe et al., 2015; Montel M.C 2014). Le concentrazioni plasmatiche di SCFA, tuttavia, sono influenzate principalmente dalla fermentazione delle fibre da parte del microbiota intestinale (Schönfeld P et al 2016, Canfora E.E 2015). Gli MCFA sono riconosciuti nella forma di trigliceridi a media catena (MCT) per la loro esterificazione a formare trigliceridi. Gli MCT sono presenti nel latte, nei prodotti lattiero caseari, nel cocco e negli oli di cocco e di palma. Gli LCFA e VLCFA sono presenti nelle

piante e negli animali in forma esterificata e sono costituenti di trigliceridi e fosfolipidi. I trigliceridi costituiscono la forma principale di deposito energetico, soprattutto nel tessuto adiposo, mentre i fosfolipidi svolgono un ruolo strutturale delle membrane biologiche. Gli LCFA e i VLCFA possono essere divisi in due gruppi in base alla presenza o assenza di doppi legami nella catena di atomi di carbonio: acidi grassi insaturi e acidi grassi saturi. Nella catena degli acidi grassi saturi non sono presenti doppi legami, a differenza di quanto avviene negli acidi grassi insaturi, dove possono essere presenti uno (monoinsaturo) o più doppi legami (polinsaturi). Nell'uomo, gli acidi grassi saturi (SFA) e monoinsaturi (MUFA) possono avere una derivazione esogena, attraverso il consumo di alimenti ricchi in grassi o olii, o essere sintetizzati a livello endogeno mediante la Lipogenesi De Novo. I principali acidi grassi polinsaturi (PUFA) appartengono alla famiglia degli acidi grassi omega 3 (PUFA n-3) e omega 6 (PUFA n-6). Questi acidi grassi appartengono alla classe degli Acidi Grassi Essenziali e Semi-Essenziali. L'acido linoleico e l'acido α -linolenico sono rispettivamente i capostipiti dei PUFA n-6 e PUFA n-3, vengono definiti Acidi Grassi Essenziali in quanto devono essere introdotti necessariamente con la dieta; di conseguenza, vengono metabolizzati e trasformati in altri acidi grassi appartenenti alla medesima serie, grazie all'intervento di enzimi chiamati elongasi e desaturasi. A partire dall'acido linoleico vengono prodotti l'acido γ -linolenico, l'acido diomogamma-linolenico e l'acido arachidonico. Dall'acido α -linolenico, invece, vengono formati l'acido eicosapentanoico (EPA), l'acido docosapentaenoico (DPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA). Gli acidi grassi derivati dall'acido linoleico e α -linolenico vengono definiti Semi-Essenziali. La via metabolica dei PUFA n-6 e PUFA n-3 utilizza lo stesso insieme di enzimi e possono competere gli uni con gli altri. Se l'assunzione di uno di essi è in eccesso, può interferire con il metabolismo di un altro, determinando la perdita di equilibrio nella produzione di prostaglandine, leucotreni e trombossani.

Ci soffermeremo, adesso, sugli SCFA e sul processo della De Novo Lipogenesi.

2. ACIDI GRASSI A CORTA CATENA

2.1 Il microbiota e i prodotti di fermentazione intestinale

Il microbiota intestinale è un ecosistema complesso e dinamico, costituito da microrganismi (batteri, virus, funghi e protozoi), che interagisce con l'ospite instaurando una relazione mutualista (Simpson HL et al., 2015). È coinvolto in numerosi meccanismi fisiologici associati alla salute umana, tra i quali la sintesi di micronutrienti, la difesa contro i patogeni, la regolazione del metabolismo glico-lipidico e la funzione immunitaria (Makki K. et al., 2018).

Diversi studi hanno suggerito che la modulazione del microbiota intestinale potrebbe rappresentare un valido strumento per la prevenzione delle malattie metaboliche e infiammatorie. In particolare, studi su modello animale supportano un ruolo causale dell'alterazione del microbiota intestinale associata allo sviluppo dell'obesità, insulino-resistenza e diabete mellito di tipo 2 (Ley RE. et al., 2015). In aggiunta, gli studi osservazionali hanno confermato la presenza di un microbiota alterato, denominato *disbiosi*, in pazienti obesi, con prediabete e diabete di tipo 2, rispetto a quello di soggetti sani (Kreznar et al., 2015). Nessuna specifica comunità microbica associata all'insorgere di patologie è stata identificata, ma risulta sempre più evidente che il ruolo protettivo del microbiota intestinale nei confronti delle malattie dismetaboliche sia legato alle attività di diverse specie microbiche che può essere ricondotto a tre effetti principali:

- 1) mantenimento dell'integrità della barriera intestinale;
- 2) riduzione della traslocazione batterica e della conseguente infiammazione sistemica (endotossemia);

- 3) produzione degli acidi grassi a corta catena (SCFA) che possono influenzare i pathway metabolici (Salgaço et al., 2019).

I primi due effetti sembrano essere associati fortemente all'insorgere della malattia, al contrario, la produzione degli SCFA potrebbe rappresentare uno strumento per prevenire e modulare le alterazioni metaboliche (Salamone D. et al. 2021).

Pertanto, notevole impulso è stato dato all'individuazione di strategie in grado di indurre modifiche specifiche della composizione del microbiota intestinale per prevenire o modulare le malattie metaboliche. È noto che la composizione del microbiota intestinale sia influenzata da fattori interni ed esterni. Recentemente, è stato dimostrato che la genetica esercita un ruolo marginale nella definizione della composizione del microbiota; al contrario, è maggiormente influenzato da fattori ambientali (Rothschild D et al., 2018). Tra questi, la terapia con antibiotici o i trapianti fecali hanno effetti repentini ma di breve durata sul microbiota dell'ospite (Lynch SV et al., 2016). Le modifiche della dieta, invece, potrebbero rappresentare uno strumento più utile per indurre una variazione di lunga durata della composizione del microbiota intestinale. Tra le componenti dietetiche che potrebbero modulare la composizione microbica, le fibre alimentari rivestono un ruolo importante. Molti studi hanno dimostrato che le fibre sono il pabulum principale del microbiota intestinale e sembra che il loro consumo possa promuovere la crescita dei batteri fermentanti. (Flint HG et al., 2012). Le fibre alimentari vengono fermentate dal microbiota intestinale con produzione di acidi grassi a corta catena (SCFA). Il 95% degli SCFA è costituito da acetato, propionato e butirato, mentre il restante 5% dall'acido valerico, acido isovalerico e acido caproico, prodotti della fermentazione delle proteine. Di recente vi è stato un crescente interesse per questi metaboliti, poiché regolano diversi processi fisiologici, quali senso di sazietà, l'intake energetico e il metabolismo glico-lipidico (Koh A et al., 2016).

2.2 Biosintesi, assorbimento e distribuzione degli SCFA

La maggior parte della produzione di SCFA avviene a livello del cieco e del colon prossimale. Nella sintesi degli SCFA sono implicati numerosi enzimi di specifici membri del microbiota intestinale come mostrato nella Figura 1. L'acetato è un prodotto derivante dal piruvato grazie all'azione di diverse specie batteriche quali *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Ruminococcus spp.* tramite la via dell'acetil-CoA o tramite il pathway di Wood-Ljungdahl. Il propionato invece, è prodotto dalla conversione del succinato a metilmalonil-CoA oppure può essere sintetizzato grazie al pathway dell'acrilato o quello del propanediolo, il tutto catalizzato grazie a diversi batteri presenti nel microbiota intestinale: *Bacteroides spp.*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus obeum*. Il butirrato è formato in seguito alla condensazione di due molecole di acetil-CoA e conseguente riduzione a butiril-CoA che poi viene convertito in butirrato. Alcuni microrganismi possono usare sia il lattato che l'acetato per sintetizzare butirrato e questa duplice possibilità fa in modo che si prevenga l'accumulo di lattato e conseguentemente si stabilizzi l'ambiente intestinale (Koh A et al., 2016). Tra le specie batteriche maggiormente coinvolte nella sintesi di butirrato ci sono *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia spp.*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium halii* (McNabney SM et al., 2017) (Figura 1).

Le concentrazioni di SCFA variano nell'intestino con i livelli più alti nel cieco e nel colon prossimale, mentre si riducono verso il colon distale, da ciò ne deriva la poca accuratezza nella misurazione degli SCFA nelle feci dal momento che ne viene ritrovato soltanto il 5% (Brahe LKA et al 2013). Gli SCFA possono essere assorbiti attraverso la membrana apicale delle cellule epiteliali del colon attraverso quattro meccanismi: trasporto passivo nella loro forma protonata; scambio con bicarbonato in un rapporto 1:1; attraverso il trasportatore del

monocarbossilato accoppiato a H^+ ; attraverso il trasportatore del monocarbossilato accoppiato al sodio. (Titus E et al., 1988; Rizhaupt A et al., 1998; Moshen I et al., 2012).

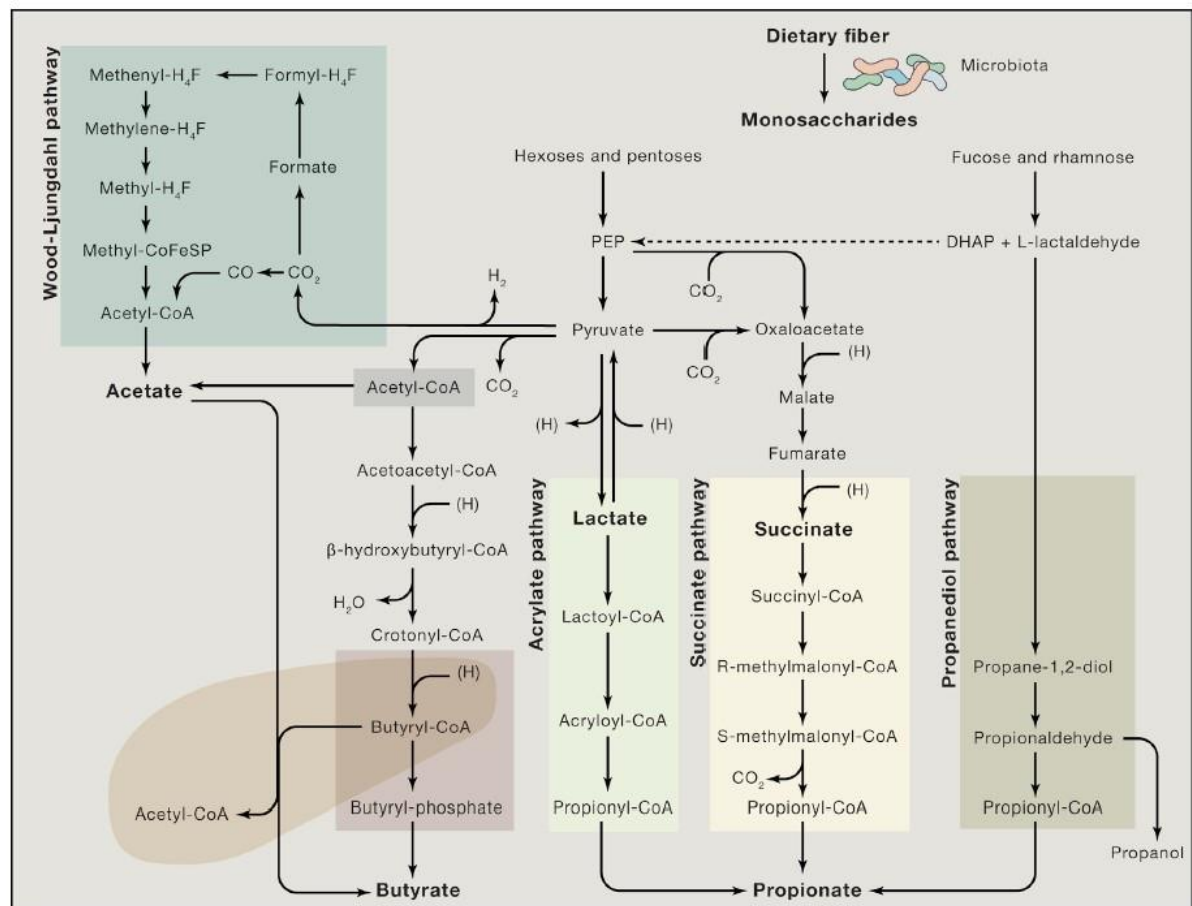


Figura 1: Descrizione dei pathways di sintesi dell'acido acetico, propionico e butirrico da parte del microbiota intestinale (Koh et al., 2016).

Tra il 90 e il 99% degli SCFA viene assorbito nell'intestino o utilizzato dal microbiota e soltanto una piccola quantità di SCFA, principalmente acetato, propionato e butirrato, si ritrova nella circolazione periferica (Holscher HD et al., 2017). L'acetato è presente nell'intestino, nelle feci e nella circolazione in misura molto maggiore rispetto al propionato e al butirrato, rispettivamente in un rapporto 3:1:1. Le concentrazioni sistemiche degli SCFA dipendono sia dai tassi di produzione che di assorbimento nell'intestino, che a loro volta si riferiscono al modello dietetico (Canfora EE et al., 2015).

2.3 Potenziali effetti degli SCFA sulla salute umana.

Come già riportato, diverse evidenze, in vivo e in vitro, suggeriscono che il microbiota intestinale e i suoi metaboliti possono avere un ruolo nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico, contribuendo, potenzialmente, ad esercitare un ruolo protettivo nei confronti delle patologie cardio-metaboliche. D'altra parte, differenti studi hanno dimostrato che la dieta potrebbe influenzare la composizione e l'attività del microbiota intestinale, modulando il rischio di patologie metaboliche come il diabete, l'insulino-resistenza e l'obesità. Tra i componenti nutrizionali, la fibra potrebbe giocare un ruolo centrale grazie al suo effetto prebiotico sui batteri fermentanti-fibre e incrementare la produzione di SCFA (Salamone D et al., 2021). Su questo argomento abbiamo effettuato una revisione della letteratura pubblicata su Acta Diabetologica (2021) e di cui riporto i dati principali (pubblicazione n.1, Acta diabetologica, 2021).

2.3.1 Studi Osservazionali

Le evidenze derivanti dagli studi osservazionali mostrano che la composizione del microbiota intestinale può influenzare lo stato metabolico dell'individuo (**Appendice: tabella 1**). In particolare, due studi di coorte hanno analizzato la composizione del microbiota in 3 gruppi di individui: individui normo-tolleranti, individui con prediabete e pazienti con diabete di tipo 2. I risultati hanno dimostrato una maggiore presenza di batteri produttori di butirrato (*Faecalibacterium prausnitzii*) nei soggetti normo-tolleranti rispetto agli altri due gruppi analizzati. Negli individui con prediabete o con diabete di tipo 2, invece, è stata riscontrata una maggiore abbondanza di *Clostridii* e *Bacteroides* rispetto agli individui sani (Zhang X et al., 2013; Wu H et al., 2020).

In linea con questi risultati, studi di metagenomica su due distinte coorti, cinese ed europea, hanno mostrato delle rilevanti differenze nella composizione del microbiota intestinale negli

individui sani rispetto ai diabetici di tipo 2 (Karlsson FH et al., 2013; Qin J et al., 2012). In particolare, *Roseburia* e *Faecalibacterium prausnitzii* sono stati identificati come i batteri altamente discriminanti tra i soggetti normo-tolleranti e quelli con diabete di tipo 2.

In aggiunta, in uno studio di coorte è stata analizzata la relazione tra composizione del microbiota e rischio di diabete. I risultati dello studio hanno dimostrato che i soggetti caratterizzati da un microbiota ricco in batteri produttori di butirrato (*Eubacterium rectale*, *Bacteroides pectinophilus* e *Roseburia intestinalis*) presentavano una migliore risposta insulinica durante un test da carico di glucosio, che rappresenta un proxy di funzione β -cellulare (Sanna S et al., 2019).

Le abitudini alimentari possono modificare il microbiota intestinale, contribuendo, in tal modo, alla modulazione e alla progressione delle patologie metaboliche e cardiovascolare.

Uno dei primi studi condotti in questa ottica, ha evidenziato delle sostanziali differenze tra la composizione del microbiota intestinale dei bambini africani rispetto a quelli italiani determinate dal tipo di alimentazione seguita (De Filippo C et al., 2010). In particolare, i bambini africani presentavano una significativa abbondanza di *Bacteroidetes* (soprattutto *Prevotella* e *Xylanibacter*) e una riduzione dei *Firmicutes*, mentre i bambini italiani erano caratterizzati da una tendenza opposta. Tale risultato è stato ricondotto alle caratteristiche della dieta seguita dagli individui presi in considerazione; infatti, i bambini africani seguivano una dieta prevalentemente a base di alimenti di origine vegetale (cereali minori come miglio e sorgo, legumi e verdure) mentre la dieta dei bambini italiani era caratterizzata da un elevato consumo di fonti animali di proteine e grassi. A sostegno di tale ipotesi, concorreva la presenza di batteri che idrolizzano la fibra, in particolare cellulosa e xilani (*Prevotella* e *Xylanibacter*), con una maggiore produzione di SCFA nei bambini africani rispetto a quelli italiani.

Studi successivi hanno indagato la relazione tra Dieta Mediterranea e riduzione del rischio di patologie cardio-metaboliche, analizzando tale associazione benefica alla luce dell'effetto modulatore di questo pattern alimentare sulla composizione e sull'attività fermentativa del microbiota intestinale. Si è evidenziato che una maggiore adesione alla Dieta Mediterranea, pattern alimentare caratterizzato da un elevato apporto di fibra alimentare, si associa ad un aumento dei *Bacteroidates*, principalmente del genere della *Prevotella* (Gutiérrez-Diaz 2016, García-Mantrana 2018), di alcuni *Firmicutes*, *Bifidobacterii* (Mitsou 2017), *Roseburia* (De Filippis F et al., 2016) e alla produzione di butirrato e propionato.

2.3.2 Studi d'intervento

L'effetto della dieta sulla composizione e l'attività del microbiota intestinale sono stati indagati in pochi studi nutrizionali di intervento che hanno preso in considerazione pattern alimentari o singoli alimenti ricchi in fibre (**Appendice: tabella 2**).

Per quanto riguarda i pattern alimentari, un trial clinico randomizzato controllato a breve-termine (4 giorni) ha mostrato che una “Dieta Occidentale”, ricca di prodotti di origine animale (carne, uova e formaggi) e a ridotto consumo di fibre (9.36 ± 2.1 g/1000 kcal) induce una riduzione dei batteri che metabolizzano i polisaccaridi delle piante (come *Prevotella* o *Roseburia*), con una minore produzione di SCFA rispetto ad una dieta ricca in fibra derivata da cereali integrali, legumi, frutta e verdura (25.6 ± 1.1 g/1000 kcal) (David AL et al., 2014). In uno studio più recente effettuato su pazienti con diabete di tipo 2, è stato osservato che una dieta in ricca in fibre (fibre:37,10 g) aumentava il butirrato fecale che si associava alla riduzione della glicemia a digiuno e dell'emoglobina glicata. (Zhao L et al., 2018).

Le diete basate prevalentemente su alimenti di origine vegetale, invece, hanno mostrato di aumentare selettivamente alcune specie batteriche in base al tipo di fibra consumata. Infatti, in uno studio randomizzato della durata di 1 anno, una dieta a basso contenuto di grassi ma

ad alto contenuto di carboidrati complessi e fibra (14.1 ± 0.2 g/1000 kcal derivata principalmente da cereali integrali) ha indotto un aumento significativo del genere *Prevotella* mentre la Dieta Mediterranea (fibra 12.9 ± 0.2 g/1000 kcal, derivata da vegetali e noci) incrementava l'abbondanza di *Roseburia*. In entrambi i trattamenti vi è stato un aumento di *Faecalibacterium prausnitzii*. È interessante notare come entrambe le diete inducevano un miglioramento dell'Indice di sensibilità insulinica (ISI) nei volontari sani, suggerendo un effetto preventivo nei confronti del Diabete tipo 2 (Haro C et al., 2016).

Tra gli alimenti con potenziale effetto sulla riduzione del rischio di diabete attraverso la modulazione del microbiota intestinale, i cereali integrali sono i più studiati in virtù dell'alto contenuto di fibre che li caratterizzano.

È stato dimostrato che le fibre da cereali (arabinosilani e crusca) sono altamente fermentabili e potrebbero incrementare gli SCFA fecali dopo appena 4 settimane (Hald S et al., 2016).

Una dieta ricca in cereali integrali (fibre da cereali: 28.9 ± 1.1 g/d), rispetto ad una dieta ricca in cereali raffinati (fibre da cereali: 11.8 ± 0.4 g/d) utilizzata come controllo, ha ridotto la risposta insulinica postprandiale in soggetti con Sindrome metabolica e tale effetto era associato all'aumento delle concentrazioni di propionato dopo 12 settimane di intervento nutrizionale (Vetrani C et al., 2015).

Per quanto riguarda l'effetto del consumo di singoli alimenti, il consumo di pane a base d'orzo (fibre: 37.6 g/d) ha indotto un aumento della *Prevotella* e una riduzione dei *Bacteroides* dopo soli 3 giorni, rispetto al pane bianco (fibre: 9.1 g/d) in soggetti sani (Kovatcheva-Datchary et al., 2015). Questa variazione è associata con una riduzione della risposta glicemica postprandiale che correlava l'aumento totale degli SCFA sierici (Kovatcheva-Datchary et al., 2015; Nilsson AC et al., 2015).

Sebbene alcuni studi d'intervento abbiano il limite di avere una durata breve o essere caratterizzata da una popolazione ridotta, i risultati derivati da questi studi sembrano suggerire che una dieta ricca in fibre o prodotti ricchi in fibra possono migliorare il metabolismo glucidico attraverso variazioni del microbiota intestinale e un aumento della produzione degli SCFA.

2.4 Possibili meccanismi

Attraverso gli studi *in vitro* o su modelli animali si è cercato di capire i possibili meccanismi d'azione degli SCFA nella regolazione in particolare del metabolismo glico-lipidico

Gli SCFA si legano ai recettori accoppiati a proteine G 41 (GPR41) e 43 (GPR43), espressi sulla mucosa intestinale, sulle cellule immunitarie, adipociti, epatociti e cellule muscolari.

Oltre ai recettori già citati, esiste un altro recettore che viene identificato come GPR109A, espresso a livello delle cellule epiteliali intestinali, degli adipociti, e delle cellule immunitarie che presenta affinità di legame per l'acido acetico ma non per il propionato o l'acido butirrico (Canfora EE et al., 2015; Koh A et al., 2016). L'acido acetico è il più abbondante SCFA presente nelle feci e nella circolazione periferica. Diversi studi *in vitro* e su modelli animali hanno dimostrato che l'acido acetico potrebbe avere un ruolo nella regolazione del senso di fame-sazietà stimolando la secrezione del GLP-1 e del PYY o agendo direttamente a livello ipotalamico (Zhou J et al., 2008; Frost G et al., 2014; Brooks L et al., 2017). Dunque, potrebbe indirettamente influenzare l'assunzione di cibo, prevenendo così, l'aumento di peso corporeo che rappresenta un fattore di rischio per il diabete di tipo 2 (Hernández MAG et al., 2019). L'acido acetico potrebbe migliorare la sensibilità insulinica a livello epatico e l'*uptake* del glucosio a livello del tessuto adiposo e del muscolo scheletrico (Yamashita et al., 2009; Yamashita H, 2016; Hernández MAG et al., 2019). Alcuni studi hanno dimostrato che l'acido acetico può essere considerato un

donatore di carboni ed essere coinvolto nella sintesi di acidi grassi e del colesterolo (Wolever TM et al., 1995; Wolever TM et al., 2002).

Per quanto riguarda l'acido propionico, alcuni studi hanno dimostrato che è coinvolto nella regolazione del metabolismo glucidico. Risultati da studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che il propionato ha effetti benefici sulla funzionalità delle β -cellule, stimola la secrezione insulinica, del GLP-1 e PYY, riduce il senso di fame e svolge un'attività antinfiammatoria. (Chambers ES et al., 2014; Pingitore et al., 2017; Byrne CS et al., 2019; Chambers ES et al., 2019). Il propionato può migliorare la sensibilità insulinica stimolando il rilascio di insulina-stimolata da glucosio- da parte delle β -cellule e migliorando la loro funzionalità, inibendo i meccanismi di apoptosi; inoltre, riduce i livelli di acidi grassi liberi (FFA) circolanti che sono associati ad una disfunzione delle β -cellule e ad una ridotta sensibilità insulinica periferica (Pingitore et al., 2017). Dati derivati da colture di adipociti hanno dimostrato che l'acido propionico può ridurre l'accumulo di grasso epatico inibendo la trascrizione dei geni coinvolti nella Lipogenesi De Novo (Demigné C et al., 1995; Canfora EE et al., 2015; He J et al., 2020).

Per quanto riguarda l'acido butirrico, il suo effetto sulla sensibilità insulinica epatica potrebbe essere dovuto alla sua capacità di ridurre l'accumulo di grasso epatico, aumentando l'ossidazione degli acidi grassi ed inibendo la Lipogenesi De Novo (Canfora E et al., 2015). Nel fegato, si è visto che l'acido butirrico può ridurre la glicolisi, la gluconeogenesi e incrementare la glicogenosintesi; inoltre, è stato osservato che può migliorare l'*uptake* di glucosio nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo. In aggiunta, nel muscolo scheletrico sembra ridurre la glicolisi e incrementare la glicogenosintesi (Gao Z et al., 2009; Mattace Raso G et al., 2013; Canfora EE et al., 2015; He J et al., 2020). Studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che il butirrato può stimolare la secrezione del GLP-1 e del PYY (Yadav H et al., 2013).

Inoltre, è stato osservato che l'acido butirrico può ridurre l'infiammazione sistemica di basso grado, inibendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie (Liu T et al., 2012; Smith PM et al., 2013; Black EE et al., 2020; Marizzoni M et al., 2020). I meccanismi alla base dell'effetto antinfiammatorio sono parzialmente dovuti all'inibizione del fattore nucleare kappa B (NF- κ B), un fattore di trascrizione che regola l'espressione di diversi geni coinvolti nell'infiammazione e nell'immunità, come citochine pro-infiammatorie, enzimi, molecole di adesione, fattori di crescita, proteine di fase acuta e recettori del sistema immunitario (Segain JP et al., 2000). Diversi studi hanno dimostrato che l'acido butirrico riesce ad attivare il recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR- γ) che può svolgere la sua attività antinfiammatoria attraverso l'inibizione della via di segnalazione dell'interferone- γ (INF- γ) (Kespohl M et al., 2017; Byndloss MX et al., 2017). In aggiunta potrebbe prevenire l'infiammazione sistemica regolando la permeabilità intestinale attraverso la modulazione dell'espressione delle proteine *tight junction*, le mucine e la riduzione della traslocazione dei lipopolisaccaridi (LPS) dal lume al circolo (Peng L et al., 2009). L'infiammazione cronica di basso grado aumenta la permeabilità intestinale e favorisce la traslocazione batterica, inducendo così una forte risposta infiammatoria e un aumento del rischio di malattie associate all'obesità (Jiang L et al., 2020).

3. PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI E LIPOGENESI DE NOVO

3.1 La Lipogenesi De Novo

La Lipogenesi De Novo (DNL) è un processo metabolico che sintetizza nuovi acidi grassi, utilizzando l'acetil-CoA (CoA), come fonte di carbonio, derivato da numerose vie metaboliche come la glicolisi e la deaminazione degli amminoacidi (Chong MF et al., 2007; Wu JH et al., 2011). Il primo passo di questa via metabolica coinvolge la reazione di carbossilazione dell'Acetil-CoA in Malonil-CoA catalizzata dall'Acetil-CoA Carbossilasi. Successivamente al Malonil-CoA vengono aggiunte unità di Acetil-CoA mediante una serie di reazioni complesse catalizzate dall'acido grasso sintasi. L'acido palmitico prodotto può essere successivamente modificato attraverso reazioni catalizzate da elongasi degli acidi grassi a lunga catena (ELOVL 6), che portano al suo allungamento o dalla steroil-CoA desaturasi -1 (SCD-1), che introduce dei doppi legami (Wang Y et al., 2006). I principali acidi grassi prodotti dalla DNL sono l'acido palmitico, l'acido palmitoleico, l'acido cis-vaccenico, l'acido stearico e l'acido oleico; l'acido miristico rappresenta un prodotto minore di lipogenesi. L'acido 7-esadecanoico è un altro acido grasso associato a questa via e, probabilmente, deriva dall'ossidazione dell'acido oleico (Lee WN et al., 1998).

Le catene di acidi grassi sintetizzati possono essere incluse in una varietà di specie lipidiche, come i trigliceridi e i fosfolipidi (Diraison F et al., 2003). La DNL è regolata a livello trascrizionale sia dall'insulina che dalla glicemia. Alcuni studi hanno dimostrato che l'iperinsulinemia e le diete ad alto contenuto di carboidrati innescano questa via metabolica. Il glucosio stimola la trascrizione dei geni della DNL, come l'ATP-citrato liasi, l'acetil-CoA carbossilasi e l'acido grasso sintasi, mediante l'azione del fattore di trascrizione ChREBP (proteina legante gli elementi di risposta ai carboidrati). L'insulina attiva gli stessi geni mediante le proteine chinasi B/AKT2 e SREBPs (proteine leganti gli elementi di risposta agli steroli) (Wang Y et al., 2016; Lu Q et al., 2021).

3.2 Metodiche di valutazione della Lipogenesi De Novo

Per la valutazione della DNL sono usate sia tecniche dirette che indirette (Hellerstein MK 1999).

3.2.1 Metodiche Dirette: valutazione della Lipogenesi De Novo con gli isotopi

L'approccio diretto per la misurazione della DNL o di qualsiasi via metabolica si basa sull'uso di isotopi stabili, principalmente il ^{13}C -acetato e l'acqua deuterata ($^2\text{H}_2\text{O}$), che consentono di seguire in modo accurato il percorso metabolico seguito dalla specifica molecola. Questa metodica presenta un'alta riproducibilità e sensibilità in quanto i cataboliti generati sono sempre gli stessi e vengono rilevati in quantitativi molto piccoli, dell'ordine dei picogrammi. Gli acidi grassi neosintetizzati, oppure derivati dalla dieta, sono esterificati nei trigliceridi e secreti dal fegato sotto forma di trigliceridi-VLDL. Il tasso di DNL è determinato tracciando le frazioni di acidi grassi contenuti nei trigliceridi-VLDL successivamente alla somministrazione di un isotopo marcato, come il ^{13}C -acetato e l' $^2\text{H}_2\text{O}$. Successivamente, gli acidi grassi, contenuti all'interno delle VLDL, vengono estratti e convertiti in esteri metilici per essere analizzati attraverso gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). Il ^{13}C -acetato e l' $^2\text{H}_2\text{O}$ sono i principali traccianti isotopici usati per valutare il tasso della DNL. L'utilizzo di questi due isotopi dipende dalla complessità dello studio e dalla metodica di somministrazione (infusione o per via orale). L'acetato è convertito ad Acetil-CoA, che è un precursore della sintesi degli acidi grassi. La somministrazione del ^{13}C -acetato richiede un lungo periodo di somministrazione endovenosa prima del test. Diversi studi hanno dimostrato che incrementare il tempo d'infusione risulta in un più alto tasso di DNL: dopo 8 ore di infusione, il tasso di DNL era <5%, mentre incrementava di 3 volte dopo 24 ore di infusione (Pagliarunga S et al. 2016). Di conseguenza, l'incremento del tracciante acetato nel pool dei precursori è presente in

elevate concentrazioni; tuttavia, una lunga infusione di questo tracciante isotopico è necessaria per osservare la sua presenza negli acidi grassi delle VLDL.

Gli atomi d'idrogeno marcati nell' $^2\text{H}_2\text{O}$ possono essere incorporati nelle catene degli acidi grassi attraverso scambio con solventi acquosi o l'incorporazione specifica dell'idrogeno derivata dalla nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH). Le proporzioni di atomi d'idrogeno derivati dalla NADPH, tuttavia, dipenderanno dal percorso metabolico di formazione di questo composto: ad esempio la via del pentosio fosfato, l'enzima malico o altre vie enzimatiche. Precedenti studi hanno dimostrato un basso tasso di DNL dopo la somministrazione di acqua deuterata per 48 ore precedenti al test; recentemente, è stato visto che la somministrazione di questo isotopo fino ad una settimana prima del test permette di valutare il tasso più alto di DNL (Hellerstein MK et al., 1999). L'acqua deuterata viene somministrata oralmente cosa che rappresenta un vantaggio rispetto alle condizioni di stress che potrebbero essere date dalle infusioni prolungate con il ^{13}C -acetato. Un altro vantaggio è rappresentato dalla clearance lenta per cui l'arricchimento in fase stazionaria resta a lungo (condizione necessaria per la valutazione della DNL che si basa sul rapporto precursore/produttore) senza dover ricorrere. Purtroppo, la somministrazione di acqua deuterata può indurre vertigini ed altri effetti collaterali nei soggetti che la assumono. Le vertigini sono transitorie e legate all'assunzione della quantità in un'unica dose, ma vista la clearance lenta si opta per la somministrazione in più dosi a distanza di circa 30 minuti. Tuttavia, l'aumento della sensibilità della spettrometria di massa ha ridotto le quantità di somministrazione di $^2\text{H}_2\text{O}$, riducendo il rischio di indurre questo effetto collaterale (Paglialunga S et al. 2016). Il tasso di DNL viene valutato in base alla presenza del ^{13}C o dell' ^2H , a seconda dell'isotopo usato, nell'acido palmitico. La presenza del ^{13}C o del ^2H è stata osservata anche in altri grassi come l'acido miristico, palmitoleico e oleico, derivati dalla via della DNL (Wilke MS et al., 2009).

3.2.2 *Metodiche indirette: il profilo degli acidi grassi e gli indici indiretti*

Date le difficoltà degli studi con l'utilizzo degli isotopi stabili, si è cercato di studiare la DNL anche con metodiche indirette, quali il profilo degli acidi grassi del siero e, più in particolare, tramite l'utilizzo di alcuni indici. La Lipidomica è lo studio delle specie lipidiche e della loro funzione biologica. La quantificazione degli acidi grassi dal sangue o altri tessuti viene effettuata mediante gascromatografia-spettrometria di massa o gascromatografia con rivelatore a fiamma ionizzata (GC-FID). Entrambe le metodiche presentano un'elevata specificità e sensibilità.

In alcuni studi epidemiologici (Puri P et al., 2007; Puri P et al., 2009) è stato dimostrato che la composizione degli acidi grassi di campioni di sangue o di biopsia del fegato in pazienti con NAFLD contenevano una maggiore quantità di acidi grassi derivati da processi di DNL, come l'acido palmitico, palmitoleico, stearico e oleico, rispetto ai pazienti sani.

Oltre al profilo degli acidi grassi, è stato introdotto l'indice di lipogenesi calcolato come rapporto tra l'acido palmitico e l'acido linoleico. Questo indice riflette il tasso di DNL quando la composizione degli acidi grassi della dieta era simile alla composizione degli acidi grassi del tessuto adiposo. Questo metodo si basa sul modello che la composizione degli acidi grassi delle VLDL-TG è determinata dal relativo apporto di acidi grassi dalla dieta, dagli acidi grassi liberi (FFA) derivati dalla lipolisi dei trigliceridi del tessuto adiposo e dalla sintesi endogena degli LCFA. Quando la composizione della dieta testata è strettamente simile alla composizione del tessuto adiposo e vi è una minima selettività dei principali acidi grassi, l'acido linoleico delle VLDL-TG, dunque, può essere usato come marker per l'apporto frazionato di acidi grassi derivati dalla dieta o dal tessuto adiposo. Quando non vi è un aumento degli acidi grassi derivati dalla DNL, principalmente l'acido palmitico, la percentuale dell'acido linoleico della VLDL-TG eguaglia in percentuale quello della dieta e del tessuto adiposo in un rapporto di 1:1. Al contrario, quando gli acidi grassi sintetizzati

dalla DNL aumentano, allora il contenuto percentuale di acido linoleico si riduce rispetto a quello della dieta e del tessuto adiposo in un rapporto $<1:1$. Il metodo assume che 1) la composizione del tessuto adiposo non si modificherà nel corso di uno studio di 1-2 mesi a causa del lento turnover del grande pool di trigliceridi immagazzinati e 2) la frazione di acidi grassi marcatori della DNL riflettono l'assoluto tasso di variazione della sintesi endogena degli acidi grassi. La DNL, dunque, è associata ad un aumento dell'acido palmitico e ad una riduzione dell'acido linoleico nei trigliceridi VLDL (Hudgins LC et al., 1996). Un altro indice analizzato è quello dell'attività della steroil-CoA desaturasi (SCD-1), calcolato attraverso il rapporto tra acido palmitoleico su acido palmitico o acido oleico su acido stearico. L'aumento dell'attività di questo enzima è associato ad un incremento della biosintesi di acidi grassi endogeni, con conseguente conversione dell'acido palmitico e stearico, rispettivamente in acido palmitoleico e oleico (Peter A et al., 2009). Il limite di questa metodica è rappresentato dal fatto che gli acidi grassi del siero non hanno solo una derivazione endogena, ma possono derivare anche dagli FFA del tessuto adiposo e dagli acidi grassi della dieta, riflettendo, così, solo parzialmente la DNL. (Hodson L et al 2008; Rosqvist F et al 2019). Nonostante ciò, gli indici indiretti potrebbero essere considerati come un'alternativa all'uso degli isotopi.

3.3 Lipogenesi De Novo e accumulo di grasso ectopico

Il grasso ectopico è definito come l'accumulo di grasso, sottoforma di trigliceridi o adipociti in tessuti non adiposi come fegato, pancreas, muscolo, cuore e reni. I meccanismi sono poco noti; probabilmente, può derivare da un aumento del rilascio di acidi grassi liberi (FFA) dal tessuto adiposo, da una ridotta ossidazione dei lipidi e da un incremento della DNL.

In particolare, questa via metabolica sembra essere rilevante nella genesi della steatosi epatica non alcolica (NAFLD). La DNL è responsabile di circa il 25 % della sintesi dei

trigliceridi intraepatici e delle VLDL in pazienti affetti da steatosi epatica non alcolica (NAFLD), di contro risulta essere <5% in individui sani (Donnelly KL et al 2015; Fabbrini E et al., 2008). In studi epidemiologici è stato dimostrato che l'acido palmitico, palmitoleico, stearico ed oleico del plasma– biomarkers della DNL- si associano all'accumulo di grasso epatico (Puri P et al., 2009; Lee JJ et al. 2015).

In alcuni studi è stata osservata anche un'elevata concentrazione dell'acido oleico, dell'acido palmitoleico e un aumento dell'attività della SCD-1, analizzati in campioni di plasma o in campioni di biopsia del pancreas, in pazienti che avevano steatosi pancreatica non alcolica (NAFPD). Questi risultati possono indicare un possibile ruolo della DNL nell'accumulo del grasso pancreatico (Pinnik KE et al., 2008; Gaborit B et al 2015).

3.4 Interventi nutrizionali e Lipogenesi De Novo

La perdita di peso e i cambiamenti qualitativi della dieta, che consistono principalmente nel sostituire i grassi saturi con quelli mono e polinsaturi e gli zuccheri semplici con carboidrati complessi e fibre, o nell'aumentare il consumo di componenti alimentari con proprietà antiossidanti, come i polifenoli, rappresentano una strategia per prevenire e/o a ridurre l'accumulo di grasso in sede ectopica agendo, probabilmente, attraverso modifiche della DNL (Marin-Alejandro BA et al., 2021). Una moderata perdita di peso (10%) in 6 pazienti obesi e con NAFLD è risultata associata ad una riduzione della DNL, ad una diminuzione del grasso epatico e ad un miglioramento della sensibilità insulinica a livello epatico e periferico (Smith GI et al., 2020).

In uno studio randomizzato crossover di 3 giorni è stato osservato come una dieta ad alto contenuto di carboidrati, rispetto ad una dieta ricca in grassi, incrementava la DNL e l'attività della SCD-1 in individui sani (Chong MF et al., 2008). In un uno studio clinico randomizzato è stato dimostrato che una dieta ricca in grassi e a basso contenuto di

carboidrati incrementa la DNL in pazienti obesi iperinsulinemici, rispetto ad individui magri e obesi normo insulinemici (Schwarz JM et al., 2003); tuttavia, una dieta ricca in carboidrati e a basso contenuto di lipidi induce un significativo aumento della DNL in individui normo insulinemici paragonata ad una dieta ad alto contenuto in grasso e a basso contenuto di carboidrati. La DNL correlava con un aumento dei trigliceridi. I risultati di questo studio indicano come l'iperinsulinemia e una dieta ad alto contenuto in carboidrati e povera in grassi incrementano la DNL (Schwarz JM et al., 2003). In uno studio clinico randomizzato è stato dimostrato come il consumo di una bevanda zuccherata con fruttosio o saccarosio, rispetto ad una bevanda zuccherata con glucosio, incrementa la DNL dopo 7 settimane d'intervento in individui di sesso maschile. Dopo l'intervento con le 3 bevande non vi è stata alcun aumento dei trigliceridi, colesterolo e glicemia. La DNL potrebbe rappresentare la prima modifica metabolica, associata ad una variazione dello stato di salute. Questo studio ha dimostrato che il fruttosio, solo o come saccarosio, è il vero substrato della DNL (Geidl-Flueck B et al., 2021). In un altro studio è stato osservato come la sostituzione degli zuccheri con l'amido riduceva la DNL (Hudgins LC et al., 1998).

Anche la qualità dei grassi può avere un ruolo importante nella regolazione di questa via metabolica e nell'accumulo di grasso in sede ectopica. In due studi clinici randomizzati è stato osservato come l'intervento con una dieta ricca in PUFA n-6 induce una riduzione della DNL, valutata attraverso l'indice dell'attività della SCD-1, rispetto ad una dieta ricca in acidi grassi saturi (Bjermo H et al., 2012; Rosqvist F et al., 2014). Nello studio di *Bjermo H e colleghi* è stata osservata un'associazione diretta tra riduzione dell'indice della SCD-1 e grasso epatico. Questo risultato indica che i PUFA n-6 possono ridurre il grasso epatico attraverso una riduzione della DNL (Bjermo H et al., 2012). La supplementazione con i PUFA n-3, EPA e DHA, ad una dose di 4 grammi al giorno ha ridotto sia la DNL a digiuno

che in fase postprandiale (Green CJ et al., 2020). D'altra parte, i MUFA, pur riducendo il grasso epatico, non modificano la DNL (Bozzetto L et al., 2016).

Gli effetti di una dieta ricca in proteine sulla DNL sono poco studiati. In uno studio clinico randomizzato crossover in acuto è stato osservato che un pasto test ricco in proteine, principalmente ricco in glutammato, aumenta la DNL in fase postprandiale in individui maschi rispetto ad un pasto test normoproteico e ad un altro ricco in grassi. Il glutammato potrebbe essere convertito in α -chetoglutarato, entrare nel ciclo dell'acido citrico ed essere convertito in Acetil-CoA, precursore della sintesi endogena di acidi grassi e colesterolo (Charidemou E et al., 2019). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi d'intervento per valutare l'effetto di una dieta iperproteica sulla DNL.

Alcuni studi hanno valutato un possibile effetto dei polifenoli e della Vitamina E sulla riduzione della DNL. In uno studio clinico randomizzato e controllato è stato osservato che la supplementazione di Vitamina E, selenio, polifenoli e omega 3 per 20 giorni in individui di sesso maschile allenati riduceva la DNL indotta da fruttosio rispetto alla supplementazione con il placebo (Damiot A et al 2019). I polifenoli riducono la DNL, inibendo l'espressione dei geni ChREBP e SREBP (Williams EJ et al 2017). In pazienti con NAFLD, la riduzione del grasso epatico dopo 24 settimane di supplementazione con l' α -tocoferolo è associata ad una riduzione precoce della DNL epatica (4 settimane dall'inizio del trattamento), valutata come contenuto dell'acido palmitoleico e rapporto acido palmitico su acido palmitoleico dei trigliceridi intraepatici (Podszun MC et al., 2020).

4. SCOPO E LINEE DI RICERCA

Le possibili relazioni tra abitudini alimentari, prodotti del microbiota intestinale, quali gli SCFA, DNL, metabolismo glico-lipidico e grasso ectopico sono un aspetto di grande interesse scientifico. Nonostante il notevole numero di lavori restano ancora molti punti da chiarire, in particolare, per quanto riguarda gli effetti di studi di intervento controllati nell'uomo.

Pertanto, nel mio progetto di tesi di dottorato ho cercato di affrontare e chiarire alcuni di questi aspetti seguendo le seguenti linee di ricerca:

- 1) valutazione della capacità fermentativa di individui a rischio cardio-metabolico (pazienti sovrappeso/obesi senza e con diabete di tipo 2);
- 2) valutazione degli effetti di alimenti ricchi in fibre/amilosio o di diete a base di prodotti di origine vegetale sulla produzione di SCFA e il loro ruolo nella regolazione del metabolismo glucidico;
- 3) definizione del possibile ruolo della DNL nella riduzione del grasso epatico e pancreatico dopo un intervento nutrizionale con una dieta multifattoriale, ricca in fibre, polifenoli e PUFA n-3, PUFA n-6 e MUFA o con una dieta simile solo in MUFA.

5. LINEE DI RICERCA

5.1 Linea di ricerca 1

Gli acidi grassi a corta catena del siero in pazienti con diabete di tipo 2 e in individui sovrappeso/obeso (Pubblicazione n.2, Acta diabetologica, 2022)

Introduzione

Numerose evidenze da studi in vivo e in vitro supportano una relazione diretta tra l'alterazione del microbiota intestinale e lo sviluppo dell'obesità, insulino resistenza e diabete di tipo 2. Gli studi osservazionali hanno infatti confermato la presenza di disbiosi intestinale in pazienti con obesità, prediabete e diabete di tipo 2, rispetto agli individui sani. Non è completamente chiaro se la disbiosi intestinale frequentemente osservata nei pazienti con diabete di tipo 2 sia la causa o conseguenza di questa malattia cronica degenerativa e se è associata al diabete *di per sé* o ad altre condizioni patologiche associate al diabete, come il sovrappeso/obesità (Portincasa P et al., 2021).

L'attività del microbiota intestinale è mediata, almeno in parte, dalla produzione degli SCFA- principalmente acetato, propionato e butirrato- da parte dei batteri intestinali, a carico delle fibre alimentari. Questi SCFA sono considerati importanti modulatori di differenti pathways metabolici. Recenti evidenze hanno evidenziato che il butirrato e il propionato, in particolare, possono influenzare il metabolismo glicemico attraverso diversi meccanismi, tra cui il miglioramento della sensibilità insulinica, aumento dell' uptake di glucosio nel muscolo scheletrico e tessuto adiposo, e miglioramento della funzionalità β -cellulare e secrezione insulinica (Portincasa P et al., 2021).

Scopo

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le concentrazioni sieriche degli SCFA in pazienti con diabete di tipo 2 e individui sovrappeso/obeso.

Materiali e metodi

Partecipanti. Sono stati utilizzati i dati al basale di due studi d'intervento, che coinvolgevano 43 pazienti con diabete di tipo 2 e 28 individui sovrappeso/obesi (Della Pepa G 2020, Vitale M 2021). Nessuno dei partecipanti assumeva probiotici, alimenti funzionali e nutraceutici. I partecipanti presentavano abitudini alimentari simili, avevano uno stile di vita per lo più sedentario o svolgevano un basso livello di attività fisica e assumevano basse quantità di alcol (<30 g/giorno per gli uomini e <20 g/giorno per le donne). I pazienti con diabete di tipo 2 avevano un buon compenso glicemico (livelli di emoglobina glicosilata (HbA1C) ≤ 7.5 %) in trattamento stabile con la sola dieta o dieta più uso di farmaci ipoglicemizzanti e non presentavano complicazioni dovute al diabete.

Analisi di laboratorio. Le concentrazioni plasmatiche di glucosio, trigliceridi e colesterolo sono stati analizzati con il metodo enzimatico colorimetrico, (Roche Diagnostics, Milano, Italia; ABX Diagnostics, Montpellier, Francia) mediante un ABX pentra 400 (HORIBA Medical, Montpellier, Francia). Il colesterolo LDL è stato calcolato attraverso la formula di Friedewald, La concentrazione di insulina plasmatica è stata misurata con la metodica ELISA (DIA-source ImmunoAssay S.A., Nivelles, Belgio), mediante un analizzatore Triturus (Diagnostic Grifols S.A., Barcellona Spagna). Gli SCFA (acido acetico, propionico e butirrico) sono stati estratti dal siero e valutati mediante GC-FID Dani (Analitica Instruments S.p.A. Milano, Italia), usando delle colonne megabore compatibili con solventi acquosi. Prima dell'analisi al GC, i campioni sono stati deproteinizzati con l'aggiunta di acido metafosforico. In queste condizioni, le proteine cariche positivamente agiscono come polimeri co-precipitando con l'acido metafosforico (Remesy C et al., 1974). L'indice

HOMA-IR (*homeostatic model assessment of insulin resistance*) è stato calcolato con la seguente formula: glicemia a digiuno (mg/dL) x insulinemia a digiuno (μ U/mL) /405.

Analisi statistiche. I dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard (Media $\pm$ SD) se non diversamente specificato. Il test di Kolmogorov–Smirnov è stato eseguito per valutare se le variabili seguivano una distribuzione normale. Le variabili non distribuite normalmente sono state analizzate dopo trasformazioni logaritmiche. Le differenze tra i pazienti con diabete di tipo 2 e gli individui sovrappeso/obesi sono state analizzate con il t-test per campioni indipendenti per le variabili continue e con il test del Chi-Quadrato per le variabili categoriche. L'acido acetico, l'acido propionico, l'acido butirrico e gli SCFA totali sono stati valutati come variabili dipendenti di un'analisi univariata in un modello non corretto e in modelli corretti per le altre variabili. Le associazioni bivariate tra gli SCFA e i parametri metabolici sono state valutate con la correlazione di Spearman. L'analisi statistica è stata eseguita secondo metodi standard utilizzando il software SPSS V.27.

Risultati

Come mostrato in tabella 1, l'età, l'indice di massa corporea (BMI), la circonferenza vita, i livelli plasmatici di glucosio ed insulina, l'indice HOMA-IR, la pressione arteriosa sistolica (SBP) e diastolica (DBP) sono più alti nei pazienti con diabete di tipo 2, rispetto ai pazienti sovrappeso/obeso; invece, i livelli plasmatici di colesterolo totale, colesterolo LDL e colesterolo HDL sono più bassi nei pazienti diabetici. I due gruppi erano simili per sesso e per livelli plasmatici di trigliceridi; inoltre, i pazienti con diabete assumevano farmaci per la dislipidemia e l'ipertensione.

Tabella 1. Caratteristiche dei partecipanti

	T2D (n=43)	Sovrappeso/Obesi (n=28)	p-value
Sesso (Maschile)	25 (56%)	14 (50%)	0.626
Età	63.3 (6.2)	43.3 (12.7)	0.0001
BMI (Kg/m ²)	31.1 (3.6)	29.1 (2.9)	0.016
Circonferenza vita(cm)	105.1 (10.4)	97.5 (8.4)	0.002
Glicemia plasmatica (mg/dL)	126.2 (15.6)	98.7 (9.0)	0.0001
Insulina plasmatica (μU/mL)	18.4 (9.2)	12.9 (4.4)	0.0001
HOMA-IR	5.7 (2.8)	3.2 (1.2)	0.0001
Colesterolo totale (mg/dL)	145.8 (28.6)	192.6 (39)	0.0001
Colesterolo LDL (mg/dL)	83.2 (22.2)	124.8 (35.5)	0.0001
Colesterolo HDL (mg/dL)	40.5 (9.5)	48 (10.5)	0.004
Trigliceridi plasmatici (mg/dL)	110.4 (40.7)	99.1 (39.6)	0.252
SBP (mmHg)	132 (22.3)	114.7 (13.9)	0.0001
DBP (mmHg)	78.5 (8.0)	72.6 (10.6)	0.009
Farmaci ipolipidemizzanti	24(56%)	0 (0%)	0.0001
Farmaci Antipertensivi	36 (84%)	0 (0%)	0.0001

Media (SD). BMI: Indice di Massa Corporea; DBP: pressione arteriosa diastolica; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; LDL: lipoproteine a bassa intensità; HDL: lipoproteine ad alta densità; SBP pressione arteriosa sistolica; T2D: diabete di tipo 2

I livelli sierici di acido acetico, propionico, butirrico e gli SCFA totali erano più bassi nei pazienti con il diabete di tipo 2, rispetto ai pazienti sovrappeso/obesi nel modello non corretto (Tabella 2). Lo stesso risultato è stato osservato quando il modello di analisi viene aggiustato per BMI, circonferenza vita, HOMA-IR, colesterolo HDL, SBP e DBP, farmaci ipolipidemizzanti e ipertensivi. Quando la stessa analisi veniva effettuata correggendo solo per la variabile età, l'acido propionico si confermava essere l'unico SCFA differente tra i due gruppi ($p=0.005$); correggendo per i livelli di colesterolo LDL, le concentrazioni di acido acetico tra i gruppi non risultavano differenti ($p= 0.329$); correggendo per tutte le variabili incluse nei modelli precedenti, soltanto l'acido propionico risultava significativamente più basso nei pazienti con il diabete di tipo 2, rispetto agli individui sovrappeso/obeso.

Tabella 2. Acido acetico, propionico, butirrico e SCFA totali a digiuno nei due gruppi						
	T2D (n=43)	Sovrappeso/obeso (n=28)	p-value non corretto	p-value corretto per età	p-value per LDL	p-value corretto per tutte le variabili
Acido acetico ($\mu\text{mol/L}$)	219.4 (165.2, 240.9)	258.6 (182.2, 323.5)	0.025	0.100	0.329	0.067
Acido Propionico ($\mu\text{mol/L}$)	16.5 (14.1, 19.3)	24.7 (18.6, 37.6)	0.0001	0.005	0.005	0.024
Acido Butirrico ($\mu\text{mol/L}$)	23.8 (18.8, 27.9)	32.3 (21.7, 38.7)	0.009	0.836	0.013	0.708
SCFA Totali ($\mu\text{mol/L}$)	248.1 (197.2, 282.7)	331.8 (242.5, 363.4)	0.003	0.039	0.104	0.034
Mediana (25 th , 75 th). LDL: lipoproteine a bassa densità; SCFA: acidi grassi a corta catena						

I risultati dell'analisi di correlazione tra gli SCFA e parametri metabolici hanno mostrato una relazione significativa ed indiretta tra i livelli di acido propionico e glicemia a digiuno (r : -0.311; p : 0.008), insulina plasmatica (r : -0.242; p : 0.042) e HOMA-IR (r : -0.309; p : 0.008), mentre l'acido acetico correlava in maniera diretta con i livelli di colesterolo-LDL (r : 0.290; p : 0.014).

Discussione

Il risultato principale di questo studio indica che i livelli circolanti dei singoli SCFA sono significativamente più bassi nei pazienti con diabete di tipo 2 rispetto ad un gruppo di individui sovrappeso/obesi. I ridotti livelli sierici di acido propionico risultano essere associati al diabete di per sé, indipendentemente da tutti gli altri fattori, tra cui sovrappeso, distribuzione del grasso corporeo e HOMA-IR. Questo risultato è rafforzato dalle correlazioni inverse tra acido propionico e i livelli di glicemia, insulina e insulino-resistenza. Pochi studi hanno valutato le concentrazioni degli SCFA nei pazienti diabetici, la maggior parte dei quali ha considerato gli SCFA fecali. I risultati di questi studi mostrano bassi livelli di SCFA in pazienti diabetici probabilmente dovuti ad una disbiosi caratterizzata da una

maggior presenza di batteri non fermentanti. Solo uno studio ha valutato i livelli di SCFA circolanti, mostrando un aumento delle concentrazioni di acido propionico in pazienti con diabete di tipo 2 (Zhao L., et al 2020). Le differenze tra i risultati dello studio di Zhao et al. con quelli del nostro studio, potrebbero essere dovute al fatto che i nostri pazienti diabetici sono ben controllati e non presentano complicanze microangiopatiche, mentre i pazienti dello studio di Zhao et al. presentavano serie complicanze microangiopatiche associate ad una maggior permeabilità intestinale (Zhao L., et al 2020). Un'altra possibile differenza potrebbe essere dovuta all'uso diverso di farmaci ipoglicemizzanti. Alcuni studi, infatti, hanno dimostrato che la metformina, aumenta i batteri produttori di SCFA (Wang D et al., 2022). La riduzione dell' acetato e butirrato sembra essere associata ad altri fattori, oltre al diabete di per sé. L'età sembra essere un fattore responsabile dei bassi livelli di acido butirrico, ed infatti è noto che la capacità fermentativa si riduce con l'avanzamento dell'età dell'individuo (Ragonnaud E et al. 2021). Nel nostro studio, i livelli di acido acetico sono principalmente associati al colesterolo LDL; infatti, c'è evidenza a supporto del fatto che l'acido acetico, possa essere usato come substrato nella sintesi dei lipidi, incluso il colesterolo. Nel nostro studio, i livelli di SCFA sono più alti rispetto a quelli pubblicati da altri studi (McMurdie PJ et al., 2022; Palacios T 2020). Questa discrepanza è dovuta a differenti metodi di estrazione degli SCFA e all'uso di differenti standard interni per quantificare gli SCFA. Il nostro studio presenta alcune limitazioni, tra cui il basso *simple size* e l'elevata eterogeneità tra i due gruppi. In conclusione, i risultati preliminari di questo studio suggeriscono che ulteriori studi *ad hoc* devono essere implementati per delucidare meglio il ruolo degli SCFA, del microbiota intestinale, e della loro relazione, nell'eziopatogenesi delle malattie metaboliche.

5.2 Linea di ricerca 2

A) Effetti di un pane ricco in amilosio sul metabolismo glucidico e sulla fermentazione intestinale (Pubblicazione n.3, Journal of Nutrition, 2022)

Introduzione

Le malattie metaboliche rappresentano un'epidemia globale con più di 400 milioni di persone affetti da diabete e prediabete (Lin X et al., 2020). Nonostante gli sforzi degli operatori sanitari e le iniziative di salute pubblica, questa tendenza sta incrementando a livello mondiale, soprattutto tra i giovani (Saeedi P et al 2019; Liu L et al 2022). Le modifiche della dieta sono note per aver impatti benefici su fattori di rischio metabolici, sul metabolismo glucidico e sensibilità insulinica, contribuendo così alla prevenzione del diabete (Cosentino F et al., 2020). Tuttavia, l'aderenza alle raccomandazioni dietetiche che promuovono il controllo del peso corporeo e la scelta di alimenti salutari è difficile da mantenere nel lungo termine. Nuove strategie dietetiche, inoltre, sono fortemente auspiccate per migliorare i fattori di rischio metabolici modificando le proprietà degli alimenti senza cambiare drasticamente il modello dietetico generale.

I carboidrati giocano un ruolo importante nella regolazione del metabolismo glucidico e insulinico e, tra questi, l'amido è stato ampiamente studiato in quanto rappresenta la tipologia di carboidrati maggiormente consumata a livello globale (Lovegrove A 2017; Augustin LSA et al 2015; Birt DF 2013). I suoi effetti in fase postprandiale sono modulati dalla composizione chimica e dalla struttura fisica; in particolare è noto che il rapporto delle sue componenti, amilosio e amilopectina, influenza la risposta postprandiale glucidica e insulinica; infatti, le quantità di amilosio e amilopectina negli alimenti amidacei modulano il tasso di digestione e assorbimento dei carboidrati: l'amilopectina, che ha una struttura a

catena ramificata, offre diversi siti per l'idrolisi enzimatica mentre l'amilosio, che ha una struttura lineare, tende ad aggregarsi in una doppia elica diventando meno accessibile agli enzimi digestivi nell'intestino (Della Pepa G et al 2022; Doblado-Maldonado AF et al. 2017; Zhong Y et al., 2022; Giacco R et al., 2016). Incrementando il rapporto amilosio/amilopectina nell'amido di frumento- utilizzando appropriate tecniche di panatura- è dunque possibile ottenere prodotti da forno che rallentano la digestione e l'assorbimento del glucosio nell'intestino tenue e sono capaci di ridurre la glicemia postprandiale (Birt DF et al 2013). In aggiunta, parte dell'amilosio genera amido resistente che non viene digerito nel piccolo intestino e viene fermentato a livello del colon (Dainty SA et al., 2016; Rashed AA et al., 2022). Gli alimenti amidacei ricchi di amilosio sono stati testati in diversi trials clinici in relazione alla loro capacità di modulare la risposta metabolica postprandiale (Cai M et al., 2021; Vetrani C et al., 2018; Belobrajdic DP et al 2019); al contrario, sono disponibili poche informazioni inerenti i possibili effetti benefici della fermentazione intestinale dell'amido resistente sull'intero profilo metabolico giornaliero (Peterson CM et al 2018; Rahat-Ronzembloom S et al 2017; Gondolia SV et al 2022).

Scopo

Lo scopo del seguente studio è stato quello di valutare se il consumo del pane di frumento ricco in amilosio, come parte di un pasto misto:

- 1) migliora la risposta metabolica postprandiale a colazione;
- 2) riesce ad influenzare il metabolismo glucidico e la risposta dell'insulina dopo un pranzo standard;
- 3) porta ad un aumento dei livelli di SCFA sierici – prodotti dalla fermentazione dell'amido resistente associato all'amilosio che potrebbe contribuire al miglioramento del metabolismo glucidico.

Materiali e metodi

Partecipanti. Ventitré pazienti sovrappesi o con obesità moderata sono stati valutati per l'eleggibilità allo studio. I criteri di esclusione sono stati l'età <20 e >60 anni, trigliceridi al digiuno ≥ 400 mg/dl, colesterolo a digiuno >270 mg/dl, eventi cardiovascolari durante i 6 mesi precedenti allo studio, diagnosi di diabete mellito o malattie gastrointestinali (colite ulcerosa o morbo di Chron), renali (creatinina <1.7 mg/dl o proteinuria) ed epatica (AST/ALT > due volte i limiti superiori), l'anemia (Hb <12g/dl), gravidanza o allattamento, malattie celiaca, cancro e altre malattie croniche. Lo studio è stato approvato dal comitato etico della Federico II e registrato a ClinicalTrials.gov, numero NCT03899974.

Il presente studio è stato condotto secondo le linee guida della dichiarazione di Helsinki. Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato scritto per partecipare allo studio.

Disegno dello studio. In questo studio acuto, in singolo cieco, randomizzato, controllato e crossover, i partecipanti sono stati sottoposti in maniera casuale a tre giorni di test, a distanza di almeno 1 settimana, con le valutazioni metaboliche eseguite a digiuno e in fase postprandiale (6 ore). La randomizzazione è stata effettuata mediante un'allocazione casuale computerizzata eseguita da un ricercatore non direttamente coinvolto nello studio utilizzando il metodo di minimizzazione con il software MINIM (Evans S et al). Ai partecipanti è stato chiesto di evitare il consumo di alimenti ricchi in fibra (verdura, legumi e cereali integrali) il giorno prima di ogni test ed hanno avuto indicazione su come attenersi ad una cena a basso contenuto di fibre. Inoltre, è stato chiesto di evitare il consumo di bevande alcoliche o alimenti contenenti probiotici e limitare l'attività fisica intensa nel giorno precedente. Nel giorno del test, i partecipanti sono stati accolti nel centro di ricerca clinica dell'unità operativa di diabete, nutrizione e metabolismo dell'azienda ospedaliera Federico II di Napoli. Sono stati sottoposti a prelievo di sangue al digiuno e nelle quattro ore

successive al consumo di uno dei 3 pasti test. Successivamente, i partecipanti hanno consumato un pranzo standard senza alcun alimento ricco in amilosio (identico per tutti e 3 giorni di test) dopodiché la valutazione metabolica è continuata per altre due ore. Il recall 24 ore è stato somministrato a tutti i partecipanti in ogni giorno del test per valutare il loro comportamento alimentare il giorno precedente

Composizione del pasto test. Le tre colazioni test sono state designate per avere lo stesso contenuto energetico e la stessa composizione in macronutrienti: in particolare, avevano la stessa quantità di carboidrati disponibili e fibre alimentari (Tabella 3). Differivano solo per la fonte di carboidrati: pani preparati con farina di frumento ricca in amilosio (HAF) (pane HAF 85%, preparato con farina di frumento ricca per l'85% di amilosio e 15% con farina convenzionale e pane HAF 70%, preparato con farina di frumento ricca per il 70% di amilosio e 30% con farina convenzionale) o pane convenzionale, preparato con il 100% di farina di frumento convenzionale. Il contenuto di amilosio era del 17% nel pane HAF 85%, del 16% nel pane HAF 70% e dell'11% nel pane controllo. La quantità di amido resistente nei pani era 4.7g/100g nel pane HAF 85%, 4.1g/100g nel pane HAF-70% e 1.2g/100g nel pane controllo.

Tabella 3: Composizione nutrizionali dei pasti

	Colazione			Pranzo Standard
	Pane HAF 85%	Pane HAF 70%	Pane Controllo	
Energia (kcal)	672	668	663	695
Carboidrati disponibili ¹ (g)	80	80	80	102
Carboidrati disponibili (%)	48	48	48	55
Amido resistente ² (g)	8	7	1	-
Fibra alimentare(g)	20	19	20	10
Proteine (g)	43	40	40	26
Proteine (%)	25	24	24	15
Grasso(g)	20	21	21	23
Grasso (%)	27	28	28	30

¹zucchero più amido digeribile, ²valutato nei pani secondo il AOAC 2002.02. HAF: Farina alto contenuto di amilosio

I tre pasti test sono stati consumati in differenti porzioni (180 g di pane HAF 85%, 170 grammi di pane HAF 70% e 120 grammi di pane controllo), ogni porzione di pane conteneva 60 g di carboidrati disponibili, insieme al prosciutto magro (50 g), formaggio magro (25 g), insalata di pomodori condita con olio extravergine di oliva (pomodoro 150 g e olio 5 ml) e una mela (100 g). Per ottenere la stessa quantità di fibre alimentari nei 3 pasti della colazione test, sono stati aggiunti 27 g di crusca alla farina di frumento del pasto di controllo, poiché i due pani ricchi in amilosio avevano un maggior contenuto di fibre. La composizione nutrizionale dei pani test è stata valutata seguendo i metodi AOAC 2009.01 e comprendeva l'amido totale, l'amido resistente, gli zuccheri totali, le fibre totali, le proteine e i grassi totali. Nei tre giorni sperimentali, i partecipanti hanno consumato lo stesso pranzo standard (Tabella 3) che consisteva in riso bianco (95 g), carne macinata di manzo (65 g), piselli (60 g), olio extravergine di oliva (20 ml), e arancia (150 g). Ai partecipanti è stato chiesto di bere 300 ml di acqua sia a colazione sia a pranzo. Tutti i pasti sono stati preparati nella cucina metabolica da una dietista ricercatrice e sono stati consumati in 15-20 minuti.

Procedure sperimentali. I campioni di sangue sono stati prelevati a digiuno e a differenti tempi in fase postprandiali in base al parametro specifico da dosare: glucosio e insulina (30,60,90,120,180,240,270,300,330 e 360 minuti), FFA (60,120,180,240,300 e 360 minuti) e gli SCFA (240 e 360 minuti) (Figura 2). I campioni di sangue, raccolti in provette di EDTA, sono stati centrifugati e conservati a – 80°C fino alle determinazioni. Le concentrazioni plasmatiche di glucosio ed FFA sono state valutate con la metodica colorimetrica enzimatica (Roche Diagnostics, Milano, Italia and ABX Diagnostics, Montpellier, Francia) mediante ABX PENTRA 400 HORIBA Medical, Montpellier, Francia). La concentrazione plasmatica di insulina è stata determinata con la metodica ELISA (DIA-source ImmunoAssay S.A., Nivelles, Belgio) mediante analizzatore Triturus (Diagnostic Grifols S.A., Barcellona,

Spagna). Le determinazioni plasmatiche di SCFA sono state eseguite mediante GC-MS come descritto da De Filippis e colleghi (De Filippis F et al., 2021). L' HOMA-IR è stato calcolato usando la seguente formula: glicemia al digiuno (mg/dL) x insulina a digiuno ($\mu\text{U/mL}$)/405 (Matthews DR et al., 1985). L'indice Adipo-IR è stato calcolato con la seguente formula: FFA a digiuno (mmol/L) x insulina a digiuno ($\mu\text{U/mL}$).

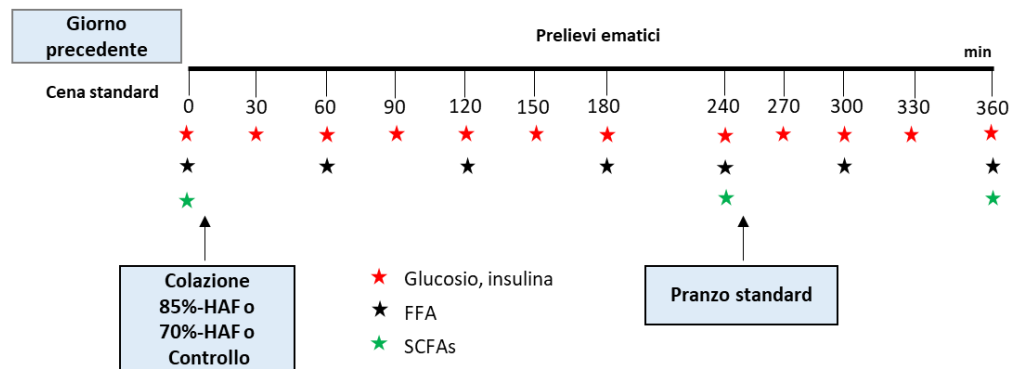


Figura 2. Disegno dello studio (FFA: acidi grassi liberi; SCFA: acidi grassi a corta catena)

Analisi statistiche. Il primo endpoint del presente studio è stato valutare la risposta postprandiale glucidica dopo la colazione e il pranzo con i due pane test HAF vs il pane controllo. Il secondo endpoint è stato valutare la differenza nella risposta insulinica postprandiale dopo colazione e pranzo, mentre la risposta degli FFA e SCFA sono dei risultati esplorativi dello studio.

Secondo i dati di uno studio precedente (Belobrajdic DP et al., 2017), un *simple size* di 22 partecipanti è necessario per valutare il 40% della differenza nella risposta glucidica (20 ± 18 mg/dl x 120 minuti) tra ogni colazione con i pani test e quella con il pane controllo, con un errore α di tipo I=0.05, un errore β di tipo II=0.1 (potere dell'80%) e con un tasso consentito di drop-out del 15%.

I risultati sono presentati come $\text{media} \pm \text{DS}$, salvo diversamente indicato. Le variabili non normalmente distribuite sono analizzate dopo trasformazione logaritmica. A causa dell'alta variabilità dei valori a digiuno, i dati degli SCFA sono stati espressi come

incrementi/decrementi (Δ), calcolati sottraendo il valore a digiuno da quello di ciascun punto temporale della curva.

La risposta postprandiale complessiva è stata valutata mediante ANOVA a due vie per misure ripetute, nell'intero profilo postprandiale (fino a sei ore), nel periodo dopo il primo pasto (fino alle prime quattro ore) e nel periodo dopo il secondo pasto (2 ore dopo il pranzo standard), per esaminare gli effetti del pasto, del tempo e dell'interazione pasto x tempo. In questa analisi, i valori postprandiali misurati ogni 30 o 60 minuti sono stati inclusi come livelli del fattore "tempo" all'interno dei soggetti, mentre i pani test HAF di controllo sono stati inclusi come livelli dei fattori "pasto" all'interno dei soggetti. L'area incrementale (iAUC) è stata calcolata anche per le risposte glicemiche e insuliniche postprandiali dopo colazione e pranzo utilizzando la regola trapezoidale. Le differenze tra i singoli tempi in fase postprandiale e l'iAUC della glicemia e dell'insulina successive al consumo di ogni pane a base di farina ad alto contenuto di amilosio (pane test HAF 85% e 70%) vs il pane controllo sono state valutate mediante analisi post-hoc (Test di Dunnett).

Le associazioni bivariate sono state valutate dall'analisi delle correlazioni di Pearson. Per tutte le analisi, i livelli di significatività statistica erano fissati a $p < 0.05$. Le analisi statistiche erano eseguite usando SPSS v21.0.

Risultati

Venti volontari non diabetici (11 maschi/ 9 femmine), con età di 48 ± 19 anni e BMI di 30 ± 3 kg/m² sono stati inclusi nello studio. La loro concentrazione media di glicemia a digiuno era di 98 ± 9 mg/dl, l'indice HOMA-IR era di 5.6 ± 3 e l'indice Adipo-IR era di 7.5 ± 4.7 . Non è stata osservata alcuna differenza delle concentrazioni dei parametri metabolici a digiuno nelle tre giornate sperimentali.

Risposta postprandiale glucidica e insulinica. I profili della glicemia postprandiale (0-360 minuti) erano statisticamente differenti nelle tre giornate sperimentali ($p=0.030$, effetto pasto x tempo). In particolare, i profili della glicemia erano significativamente ridotti dopo le colazioni (0-240 minuti) con i pani test-HAF rispetto al pane controllo ($p=0.015$, tempo x pasto), mentre non erano differenti dopo i pranzi standard (240-360 minuti) consumati successivamente alle colazioni ($p=0.168$, effetto tempo x pasto) (Figura 3, pannello A).

La risposta glucidica postprandiale valutata come iAUC era significativamente più bassa con i pani test HAF dell'85% e 70% (-27% e -39%), rispetto al pane controllo (rispettivamente, 2600 ± 2200 e 2200 ± 2000 vs. 3600 ± 2700 mg/dl·min; $p=0.026$ and $p=0.003$), mentre non si trovavano differenze statisticamente significative tra le risposte glucidiche dopo i pranzi standard (rispettivamente, 2500 ± 1200 e 2400 ± 1700 vs. 3000 ± 2100 mg/dl·min, $p=0.602$ and $p=0.166$) (Figura 3, pannello B).

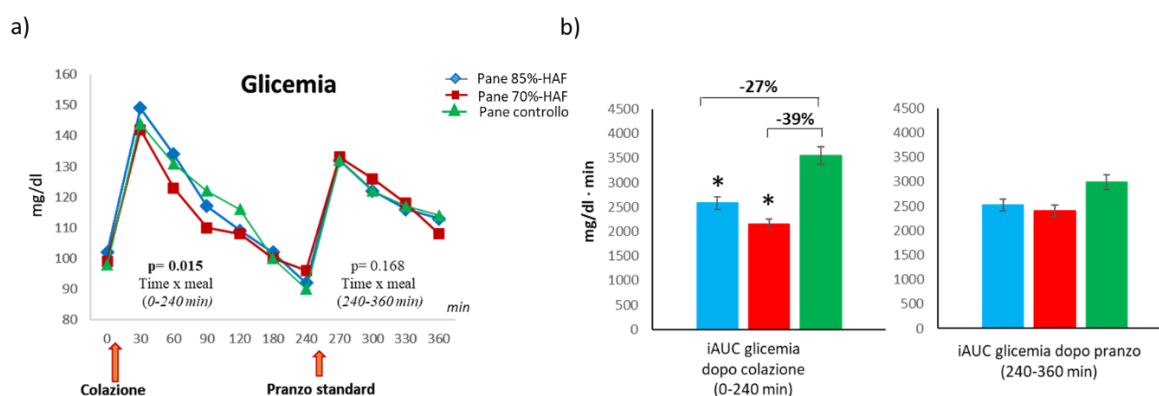


Figura 3: Risposta glucidica postprandiale. I dati sono espressi come Media $\pm$ SE. * $p<0.05$ ANOVA post-hoc (test di Dunnett). A) Profilo glucidico postprandiale. B) Area incrementale della glicemia postprandiale dopo la colazione (0-240) e Area Incrementale della glicemia post pranzo standard

I profili dell' insulina postprandiale (0-360 minuti) non erano differenti nelle tre giornate sperimentali ($p=0.577$, effetto tempo x pasto). La risposta insulinica non era differente dopo le 3 colazioni (0-240 minuti) ($p=0.419$ effetto tempo x pasto), ma era significativamente ridotta dopo i pranzi standard (240-360 minuti), consumati successivamente ai pani test HAF 70 e 85% rispetto al pane controllo ($p=0.038$, effetto tempo x pasto) (Figura 4, Pannello

A); in aggiunta, a 360 minuti (due ore dopo il pranzo standard) i valori plasmatici insulinici erano statisticamente ridotti nelle giornate in cui entrambi i pani ricchi in amilosio erano consumati a colazione rispetto al giorno in cui era consumato il pane controllo ($p=0.023$, pane HAF 85%, $p=0.004$ pane HAF 70% vs pane controllo). La risposta insulinica valutata come iAUC non era statisticamente differente dopo le colazioni con i pani test (HAF-85% e 70%) rispetto al pane controllo (rispettivamente, 13500 ± 9700 e 14000 ± 12000 vs. 13200 ± 12000 mg/dl·min, $p=0.827$ and $p=0.711$), ma si riduceva in maniera significativa dopo il pranzo standard consumato successivamente alla colazione con il pane HAF-85% (-28%) rispetto all'iAUC del pranzo standard consumato successivamente alla colazione controllo (rispettivamente, 5800 ± 4300 vs. 8200 ± 5600 mg/dl·min, $p=0.049$); la risposta insulinica dopo il pranzo consumato successivamente al pane test HAF 70% non era statisticamente differente rispetto al pranzo consumato successivamente alla colazione controllo (rispettivamente, 7200 ± 6900 vs. 8200 ± 5600 mg/dl·min, $p=0.299$) (Figura 4, Pannello B).

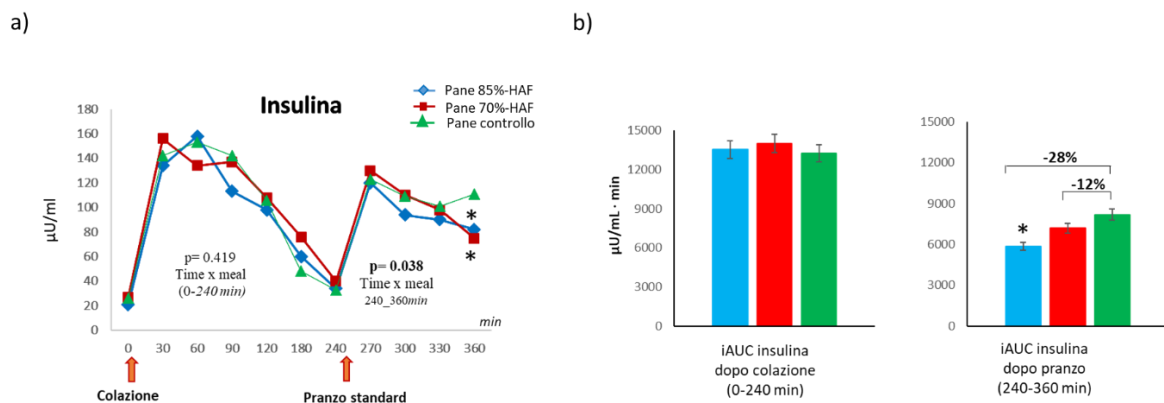


Figura 4: Risposta insulinica postprandiale. I dati sono espressi come Media $\pm$ SE. * $p<0.05$ ANOVA post-hoc (test di Dunnett). A) Profilo postprandiale dell'insulina. B) Area incrementale dell'insulina postprandiale dopo la colazione (0-240) e Area Incrementale dell'insulina post pranzo standard (240-360). * $p<0.05$ vs pane controllo

Il rapporto tra iAUC dell'insulina e iAUC della glicemia è raffigurato nella Figura 5 e non mostra differenze significative.

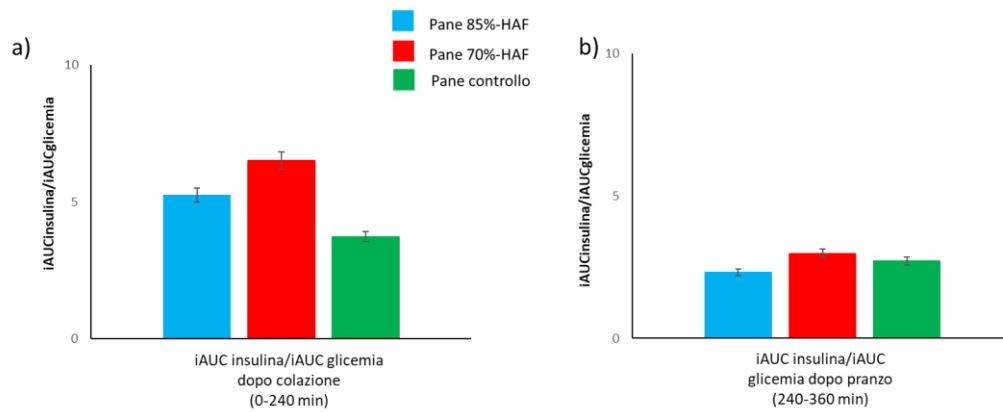


Figura 5: Rapporto iAUCinsulina/iAUCglicemia. I dati sono espressi come Media $\pm$ SE. post-hoc. A) Rapporto iAUCinsulina/iAUCglicemia dopo la colazione (0-240 minuti). b) Rapporto iAUCinsulina/iAUCglicemia dopo il pranzo standard (240-360).

FFA e SCFA. Nessuna differenza è stata osservata sul profilo degli FFA a digiuno e in fase postprandiali ($p=0.746$, effetto tempo x pasto) tra le tre giornate sperimentali, così come per l'Adipo-IR. Per quanto riguarda la concentrazione degli SCFA (i dati sono disponibili per 13 partecipanti), non è stata osservata alcuna differenza per l'acido acetico ($p=0.282$, effetto tempo x pasto). È stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i 3 profili del propionato ($p=0.026$, effetto tempo x pasto); in particolare, le concentrazioni plasmatiche di propionato aumentavano del 9% e 12% rispetto al digiuno due ore dopo il pranzo consumato successivamente ai pani test ricchi in amilosio (HAF 85% e HAF 70%) mentre si riducevano dell'11% due ore dopo il pranzo consumato dopo la colazione controllo; queste differenze tra i pani test HAF 85% e 70% e il pane controllo erano statisticamente significative ($p=0.030$ e $p=0.025$).

Per quanto riguarda le concentrazioni di butirrato, sebbene l'intero profilo non differisse in maniera significativa tra le 3 giornate sperimentali ($p=0.252$, effetto tempo x pasto), era significativamente più alto a 240 minuti dopo il pane test HAF-70% rispetto al pane controllo ($p=0.042$) (Figura 6).

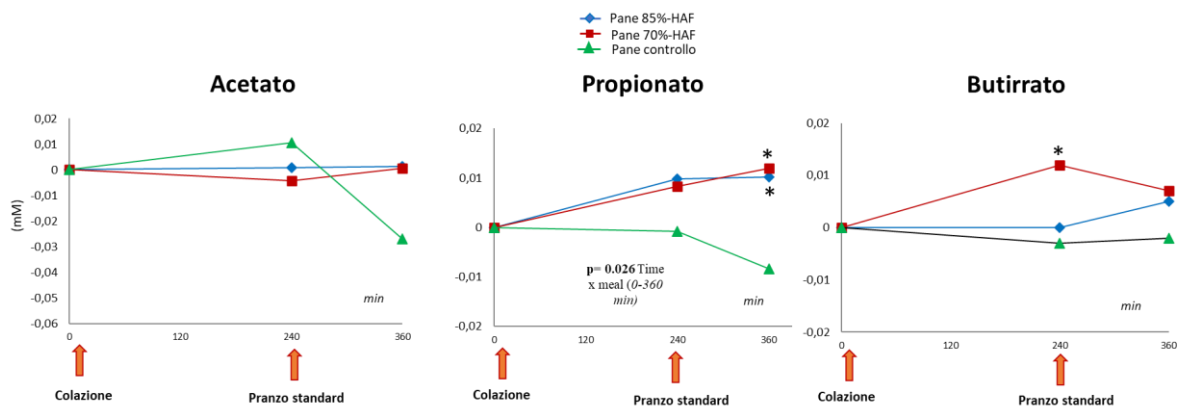


Figura 6: I dati sono espressi come Media $\pm$ SE. * $p<0.05$ ANOVA post-hoc (test di Dunnett). Risposta postprandiale dell'acido acetico, propionico e butirrico. * $p<0.05$ vs pane controllo

L'incremento dell'acido propionico a tempo 360 e dell'insulina a tempo 360 correlavano in maniera inversa dopo la colazione con il pane HAF 70% ($r=-0.566$; $p= 0.044$) (Figura 7), mentre la correlazione tra questi parametri osservata dopo il pranzo consumato dopo la colazione con pane HAF 85% era al limite della significatività statistica ($r=-0.490$; $p= 0.065$). Non sono state riscontrate altre correlazioni significative tra i valori degli SCFA e i parametri metabolici.

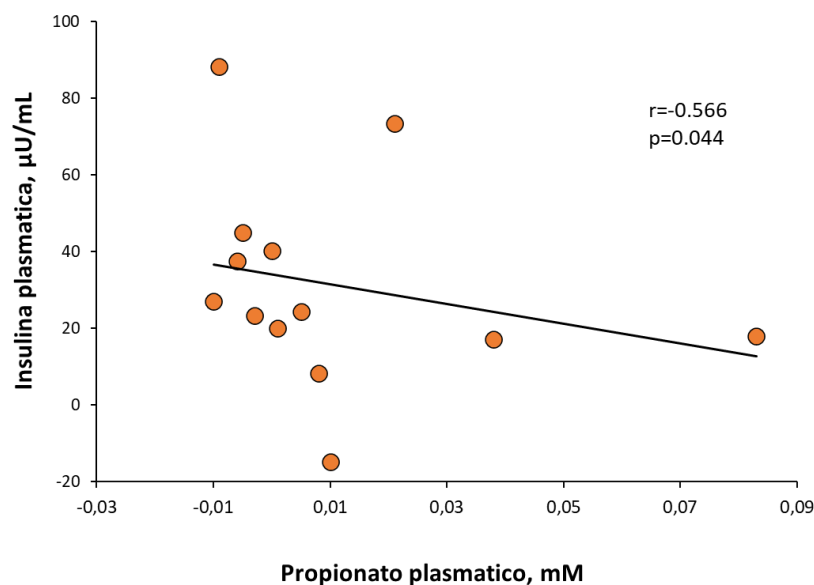


Figura 7: Correlazione tra l'incremento del propionato al tempo 360 minuti e l'incremento dell'insulina a 360 minuti dopo il trattamento con il pane test HAF 70%

Discussione

Lo studio ha dimostrato che il consumo di una colazione con il pane con farine di frumento ricca in amilosio con l'85% e il 70%, come parte di un pasto misto, riduceva la risposta glicemica postprandiale del 27% e 39% rispetto al pane comune in soggetti sovrappeso mentre non aveva effetti sulla risposta insulinica dopo la colazione.

La capacità dei prodotti ricchi in amilosio di ridurre la risposta glicemica postprandiale precoce è stata già dimostrata in precedenti studi che hanno testato altri tipi di alimenti amidacei, con l'amilosio (Hallstrom E et al 2011; Zenel AM 2015; Bahell KM et al. 1989) che va dal 24% al 74% dell'amido totale, ma con una quantità simile del totale di carboidrati disponibili. In linea con i nostri risultati, Behall e colleghi (Behall et al., 2002) hanno dimostrato una significativa riduzione del 22% della glicemia postprandiale dopo aver mangiato pane contenente 8 g di amido resistente, senza alcun effetto sui livelli plasmatici di insulina, che, tuttavia, diminuivano quando il contenuto di amido resistente del pane era aumentato a 11,5 g.

Allo stesso modo, lo studio di Hallstrom e colleghi (Hallstrom E et al 2011) ha mostrato una significativa riduzione del 18% della risposta glicemica 120 minuti dopo aver consumato il pane di frumento ad alto contenuto di amilosio contenente 7,7 g di amido resistente, mentre non è stato osservato alcun effetto sui livelli plasmatici di insulina. Al contrario, ci sono stati studi in cui non è stato dimostrato alcun effetto metabolico di alimenti amidacei ad alto contenuto di amilosio (Bodinharn CL et al., 2013; Higgins JA et al., 2004).

Sono stati confermati i risultati di uno studio precedente del nostro gruppo che hanno mostrato che il miglioramento della risposta glicemica postprandiale precoce dopo cibi ricchi di amilosio sia dovuto a una digestione più lenta dell'amilosio e a un ridotto assorbimento intestinale del glucosio (Vetrani C et al., 2018). Non si può escludere che questi effetti possano essere modulati dal GLP-1, un ormone gastrointestinale che migliora la secrezione

insulinica glucosio-dipendente e riduce il rilascio del glucagone, come ipotizzato in precedenza (Nadkarni P et al., 2014).

La riduzione della risposta glicemica postprandiale osservata nel nostro studio dopo la colazione con pane HAF è clinicamente rilevante per la sua entità (-30%) ed è in relazione a diverse evidenze che mostrano come i livelli di glicemia postprandiale sono fattori di rischio indipendenti per le malattie cardiovascolari (CVD) non solo nei pazienti diabetici ma anche nei soggetti sani con normali valori della glicemia a digiuno (Kodama S et al., 2012). Un nuovo risultato del nostro studio è la dimostrazione che il consumo di pane con farina di frumento ad alto contenuto di amilosio all'85% a colazione, rispetto al consumo del pane di controllo, ha ridotto significativamente del 28% la risposta insulinica plasmatica postprandiale al pranzo successivo (che non conteneva alimenti amidacei ricchi di amilosio); anche la risposta insulinica al pranzo standard dopo la colazione con pane HAF al 70% era ridotta (-12%), ma la differenza non era statisticamente significativa; inoltre, il pane ad alto contenuto di amilosio consumato a colazione ha aumentato i livelli plasmatici di propionato del 9% e del 12% dopo 360 minuti (85% e 70% di pane HAF, rispettivamente), rispetto alla colazione di controllo.

A 360 minuti dopo la colazione con il pane HAF 70%, l'incremento della concentrazione plasmatica di propionato rispetto al digiuno era significativamente ed inversamente correlati con i valori di insulina plasmatica. Nel complesso, questi risultati portano a ipotizzare una relazione di causa/effetto tra l'aumento del propionato plasmatico e il miglioramento della sensibilità insulinica, proponendo così un nuovo meccanismo degli effetti metabolici benefici degli alimenti ricchi di amilosio e ad alto contenuto di amido resistente. Questo risultato è importante poiché il ruolo della fermentazione batterica dei carboidrati nell'intestino in relazione alla regolazione metabolica non è stato completamente chiarito; in particolare non è chiaro se la produzione di SCFA rappresenti una relazione affidabile tra

l'attività dei batteri intestinali e il metabolismo del glucosio e dell'insulina (Salamone D et al., 2021).

La nostra ipotesi è supportata anche da uno studio che mostra una ridotta produzione epatica di glucosio in soggetti sani dopo un consumo di 4 settimane di fibre fermentescibili (Luo J et al., 1996). Il ruolo del propionato nella modulazione del metabolismo dell'insulina è supportato dai risultati dello studio di Chambers, che mostra come l'integrazione alimentare con estere inulina-propionato migliori la sensibilità insulinica negli adulti con sovrappeso e obesità (Chambers et al., 2019); inoltre, i risultati di uno studio in vitro hanno dimostrato come il propionato, prodotto da batteri intestinali selezionati, migliori l'insulino-resistenza, aumentando la sintesi del glicogeno di circa il 57% e diminuendo i marcatori proinfiammatori come IL-8 del 12%. (Chambers ES et al 2019; El Hage R., 2020). La possibilità che le variazioni degli FFA possano contribuire al miglioramento del profilo insulinico/sensibilità all'insulina osservati nel nostro studio dopo i pranzi standard successivi alle colazioni con pane HAF è stata esclusa dalla mancata differenza statisticamente significativa nei profili plasmatici degli FFA tra i pani HAF e il pane di controllo.

Un nuovo contributo del presente studio è la dimostrazione di come i cibi ricchi di amilosio hanno effetti benefici sulla risposta metabolica postprandiale che si estendono per diverse ore dopo il loro consumo.

Studi precedenti non sono stati in grado di chiarire questo problema a causa della breve durata dell'osservazione, che è stata in media di 3 ore dopo il pasto test (Vetrani C et al 2018; Hallstrom E et al 2011; Behall KM et al 2002).

Per quanto riguarda la palatabilità, i partecipanti hanno reputato gradevoli i due pani ricchi in amilosio. Una delle principali limitazioni del presente studio è il disegno dello studio in acuto che non consente di valutare se gli effetti metabolici qui osservati vengono mantenuti

a lungo termine; inoltre, la valutazione degli SCFA fecali e dell'idrogeno misurato mediante breath-test, sarebbero stati utili per valutare la fermentazione del colon in modo più accurato. La valutazione dei livelli circolanti degli SCFA ha, tuttavia, il vantaggio di essere maggiormente associata direttamente ai parametri metabolici rispetto agli SCFA fecali (Mueller M et al., 2019). Un altro limite del nostro studio è la dimensione del campione, molto piccola per rilevare piccoli cambiamenti dei livelli plasmatici degli SCFA in risposta al consumo di pane HAF. Pertanto, non possiamo escludere che differenze statisticamente significative per altri SCFA, oltre al propionato, sarebbero state rilevate con una dimensione del campione maggiore. Infine, non abbiamo informazioni sulla composizione del microbiota intestinale dei partecipanti e, pertanto, non siamo stati in grado di valutare la sua potenziale influenza sui risultati dello studio.

In conclusione, questo studio dimostra che i pani ricchi di amilosio esercitano effetti metabolici benefici, in relazione al metabolismo del glucosio e dell'insulina, non solo confinati all'immediato periodo postprandiale ma che durano molte ore influenzando così la risposta metabolica al pasto successivo. Questi benefici metabolici sono in parte legati alla fermentazione batterica dell'amido resistente, che porta alla produzione di SCFA, in particolare, del propionato.

Se i nostri risultati saranno confermati a lungo termine, i prodotti a base di farina ricchi di amilosio potranno essere testati per il loro potenziale ruolo nel contesto della strategia per la prevenzione e il trattamento del diabete di tipo 2.

B) Effetto di una dieta mediterranea in acuto e in cronico sul metabolismo glucidico e sulla fermentazione intestinale (pubblicazione n° 4 Clinical Nutrition, 2021)

Introduzione

Studi epidemiologici e d'intervento hanno fornito prove che la Dieta Mediterranea ha numerosi effetti benefici sia in regioni Mediterranee sia non Mediterranee (Galbete C et al., 2018; D'Alessandro A et al., 2018; Dinu M et al 2018).

Nello specifico, gli studi osservazionali hanno dimostrato che i soggetti sani e gli individui ad alto rischio cardiovascolare che hanno un'alta aderenza alla Dieta Mediterranea hanno un basso rischio di sviluppare il diabete di tipo 2 (Mozzafarian D 2007; Martin-Gonzalez MA et al., 2008), oltre che con un ridotto rischio di mortalità per tutte le cause (Eleftheriou D et al., 2008; Bonaccio M et al., 2018).

Questi dati sono confermati anche da alcuni studi d'intervento, come il PREDIMED (Salas-Salvadó J et al., 2011; Estruch R et al., 2018). I vantaggi sembrano essere mediati da alcuni effetti benefici sui fattori di rischio cardiovascolare come, il peso corporeo, la pressione arteriosa, il metabolismo lipidico e glucidico a digiuno; alti livelli postprandiali di trigliceridi, glicemia e insulina nel sangue sono considerati fattori di rischio cardiometabolico sia in soggetti sani, sia in pazienti diabetici (O'Keefe JH et al., 2008; Tired L et al., 2000; Alipour A., 2008; Kodama S et al., 2012).

Alcuni trials clinici hanno valutato l'effetto di singoli nutrienti come gli acidi grassi monoinsaturi e le fibre alimentari, sul metabolismo glucidico e lipidico in acuto (Vogel RA et al., 2000; Carnevale R et al., 2017) e a medio termine (Paniagua JA et al., 2007; Mekki N et al., 1997); tuttavia, l'effetto della dieta Mediterranea, come un completo modello dietetico, sul metabolismo postprandiale (ad esempio la risposta postprandiale della glicemia, dell'insulina e dei lipidi) non è stato completamente valutato. Un modello dietetico

Mediterraneo include molti alimenti, con una frequenza di consumo che può essere riassunta come un'alta assunzione di olio extravergine d'oliva, legumi, frutta, verdura, noci, pesce, una moderata assunzione di prodotti lattiero caseari e un basso consumo di carne e prodotti a base di carne processata. Tale modello dietetico fornisce molti nutrienti e composti antiossidanti, inclusi fibre alimentari, grassi insaturi e varie sostanze fitochimiche i cui benefici per la salute sono ampiamente riconosciuti (D'Alessandro A et al., 2018). Solo uno studio sugli effetti a medio termine della dieta mediterranea si è focalizzata sulla lipemia postprandiale e adottava diete leggermente ipocaloriche, influenzando così il metabolismo lipidico attraverso la perdita di peso (Defoort C et al., 2011).

Un'altra questione rilevante – anche se poco chiara – è il meccanismo attraverso il quale la dieta, in particolare la Dieta Mediterranea, potrebbe agire sui parametri clinici. A questo riguardo, c'è un crescente interesse su un possibile ruolo della variazione del microbioma e della produzione degli SCFA – acetato, propionato e butirato- come possibili modulatori del metabolismo glucidico e lipidico (Pingitore A et al., 2017; Chambers ES et al., 2019). L'aderenza alla Dieta Mediterranea è associata con specifiche caratteristiche nella composizione del microbiota intestinale e ad aumentati livelli di SCFA fecali, dovuti ad un aumento dei taxa microbici che degradano le fibre (De Filippis et al., 2016); tuttavia, gli studi d'intervento sono gli strumenti più appropriati per passare dall'associazione alla casualità ed acquisire informazioni più robuste sull'interrelazione dieta-microbioma.

Scopo

È stato eseguito uno studio clinico randomizzato per valutare l'effetto di una dieta Mediterranea sul microbiota e i parametri clinici in soggetti sovrappeso e obesi con uno stile di vita poco salutare. Questo studio è stato eseguito in un sottogruppo della coorte di Meslier e colleghi (Meslier V et al., 2020) con l'ipotesi di valutare:

- 1) gli effetti in acuto sul metabolismo glucidico e lipidico postprandiale di un pasto test simile a un pranzo tipico della Dieta Mediterranea rispetto ad un pasto test simile a un pranzo tipico della Dieta Occidentale;
- 2) l'effetto a medio termine (8 settimane) sul metabolismo glucidico e lipidico postprandiale di una dieta simile al modello Mediterranea rispetto ad una Dieta Occidentale;
- 3) i possibili meccanismi che supportano questi effetti.

Materiali e Metodi

Partecipanti. Quarantanove pazienti sovrappeso/obesi (BMI compreso tra 25-35 kg/m²) di entrambi i sessi e di età compresa tra i 20-60 anni sono stati valutati per eleggibilità di questo specifico studio. Trentatré individui sono stati reclutati secondo i criteri di inclusione ed esclusione riportati in un precedente studio (Meslier V et al 2020). I criteri d'inclusione erano: soggetti sani di età compresa tra i 20-65 anni di età, BMI ≥ 24 Kg/m², che abitualmente consumano al massimo 2 porzioni al giorno di cereali integrali e/o alimenti ricchi in fibre, non più di 3 porzioni al giorno di frutta e verdura, non assumevano probiotici, alimenti funzionali, integratori alimentari e avevano uno stile di vita sedentario. I criteri di esclusione erano; problemi gastrointestinali, gravidanza o allattamento, precedente operazione di chirurgia bariatrica, ipertrigliceridemia (livelli di trigliceridi >300 mg/dL), ipercolesterolemia (livelli di colesterolo >220 mg/dL), trattamento farmacologico di alcun tipo al reclutamento e nei due mesi precedenti allo studio, dieta abituale ricca in frutta e verdura, alti livelli di attività fisica, consumo di vino e bevande alcoliche equivalenti maggiori di 3 bicchieri al giorno, partecipazione contemporanea ad altri studi d'intervento. Tre candidati hanno declinato l'invito a partecipare prima di iniziare lo studio d'intervento per ragioni personali; un partecipante allocato nel gruppo Controllo ha abbandonato lo

studio per motivi familiari. In totale, ventinove pazienti obesi e/o sovrappeso sono stati randomizzati ai due interventi dietetici e hanno completato lo studio.

Lo studio è stato registrato su ClinicalTrial.gov (Numero: NCT03071718) ed è stato condotto secondo le raccomandazioni della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal comitato etico dell'Università Federico II di Napoli (Numero di Protocollo: 108/16). Il consenso informato era stato firmato e ottenuto da ogni partecipante.

Disegno dello studio. Lo studio era basato su un disegno randomizzato, controllato e a gruppi paralleli e consisteva di un periodo di due settimane di run-in e da un periodo di 8 settimane d'intervento nutrizionale. Al termine del run-in, i partecipanti erano assegnati in maniera casuale al gruppo Dieta Mediterranea o al gruppo Dieta Controllo. I partecipanti nel gruppo Dieta Mediterranea (Med -D) seguivano una dieta che era isocalorica rispetto alla loro dieta abituale, ma aveva caratteristiche simili alla tradizionale dieta Mediterranea, mentre i partecipanti nel gruppo controllo (Control-D) mantenevano la loro abituale dieta che presentava caratteristiche della Dieta Occidentale.

La randomizzazione è stata eseguita stratificando per genere (maschi vs femmine) e per il BMI (25-30 Kg/m² vs 30-35 Kg/m²), usando un software di randomizzazione casuale. L'allocazione era effettuata dal personale non coinvolto nello studio; tuttavia, i ricercatori e i dietisti erano informati del gruppo di appartenenza dei partecipanti solo dopo il processo di randomizzazione. Durante lo studio, ai partecipanti non era chiesto di modificare la loro attività fisica che era registrata all'inizio dello studio e ogni due settimane. Al basale, alla quarta e all'ottava settimana d'intervento, i partecipanti si sottoponevano a valutazioni cliniche, incluso il peso corporeo, la circonferenza vita, fianchi e la pressione arteriosa valutata con uno sfigmomanometro (OMRON M3, OMRON Healthcare Europe B.V. Scorpius 33, 2132 LR, Hoofddorp, Olanda). Al basale e ogni quattro settimane dall'inizio

dell'intervento nutrizionale, i campioni di sangue al digiuno e di feci venivano prelevati e analizzati. In aggiunta, i partecipanti si sottoponevano ad un prelievo di sangue per 4 ore dopo un pasto test che era un pranzo simile alla dieta Mediterranea o Occidentale.

Diete sperimentali e pasto test. I partecipanti nel gruppo Med-D consumavano una dieta personalizzata che manteneva l'energia giornaliera e l'assunzione dei macronutrienti della dieta abituale di ogni individuo e garantiva un modello dietetico di tipo Mediterraneo. Al contrario, i partecipanti al gruppo Control-D mantenevano la loro dieta abituale. La dieta del gruppo Med-D era formulata per incrementare la loro assunzione individuale di fibre alimentari, proteine vegetali rispetto a quelle animali e acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi rispetto agli acidi grassi saturi, pertanto, le diete dei partecipanti nel gruppo della Med-D erano designate per contenere frutta e verdura (almeno 5 porzioni, ~500 g/giorno), noci (30g/giorno), i prodotti di cereali raffinati sostituiti con prodotti contenente cereali integrali (almeno 2 porzioni, ~200 g/al giorno tra pasta, pane e cereali a colazione), carne e prodotti derivati dalla carne sostituiti con legumi e pesce (almeno 3 porzioni ~ circa 300 grammi/settimana di pesce e ~300 grammi/settimana di legumi), burro ed altri condimenti abituali con l'olio extravergine di oliva. Ai partecipanti era consigliato di consumare carne, prodotti lattiero-caseari e uova una volta a settimana. Al contrario, i soggetti appartenenti al gruppo Control-D mantenevano invariata la loro dieta abituale durante l'intervento e non usavano olio extravergine d'oliva come condimento. Per migliorare l'aderenza ad entrambe le diete, i principali prodotti alimentari erano forniti ai partecipanti in quantità sufficienti per coprire il loro consumo domestico per tutto il periodo dello studio; inoltre, l'adesione è stata rafforzata tramite consulenza telefonica settimanale da parte dei dietisti. Al basale e al termine dell'intervento nutrizionale, i partecipanti trascorrevano una giornata nel Centro di Ricerca Clinica dove veniva valutato il loro profilo metabolico a digiuno e in fase

postprandiale dopo un pasto simile in composizione del loro intervento dietetico. In particolare, gli individui randomizzati al gruppo Med-D ricevevano un pasto simile al pranzo della Dieta Mediterranea, mentre quelli che erano randomizzati al gruppo Control- D consumavano un pasto test di controllo. Il pasto test del gruppo Med-D era composto da fagioli secchi (80 grammi), merluzzo (50 grammi), rucola (100 grammi), pane integrale (120 grammi), olio extravergine d'oliva (29 grammi) e un'arancia (150 grammi); il pasto test del gruppo controllo era costituito da riso (80 grammi), parmigiano (30 grammi), bresaola (60 grammi), pane bianco (30 grammi), olio d'oliva (21 grammi) e una banana (160 grammi). I due pasti test venivano preparati in una cucina metabolica da una dietista con una quantità standardizzata di ogni alimento in modo da rendere simile i due pasti in termine di energia e composizione di macronutrienti, ma differenti in fonti di proteine animali e vegetali, in acidi grassi saturi, in contenuto di fibre alimentari e in indice e carico glicemico (Tabella 4).

Tabella 4: Composizione dei nutrienti dei pasti test

	Dieta Mediterranea	Dieta di Controllo
Energia (Kcal)	867	848
Proteine (%TE)	18.4	18.4
Proteine animali (g)	8.5	29.2
Proteine vegetali (g)	31.4	9.7
Rapporto proteine animali: vegetali	1:3.7	3:1
Lipidi (% TE)	33.8	33.9
SFA (%TE)	5.2	10.3
MUFA (%TE)	22.4	20.3
PUFA (%TE)	3.7%	2.8%
Carboidrati (% TE)	47.7	47.8
Zuccheri (%TE)	9.1	9.4
Fibre (g)	25.2	5.0

MUFA: Acidi grassi monoinsaturi; PUFA: Acidi Grassi polinsaturi; SFA: Acidi Grassi Saturi.

Valutazione dell'aderenza alle diete. L'adesione alla dieta è stata valutata usando un diario alimentare di 7 giorni, durante il periodo di run-in, all'inizio dell'intervento, a 4 e 8 settimane di intervento. Il diario alimentare è stato analizzato mediante un software (Metadieta software) usando il database degli alimenti dell'Istituto Nazionale Italiano per gli Alimenti e la Nutrizione (<https://www.alimentinutrizione.it/sezioni/tabellenutrizionali>; <http://www.bda-ieo.it/>).

Analisi di laboratorio. I campioni di sangue sono stati prelevati sia al digiuno e durante le 4 ore successive al pasto test sia al basale che dopo 8 settimane. I campioni di sangue sono stati raccolti dalla vena anticubitale e poi conservati a -80°C fino al momento dell'analisi. Sui campioni di sangue sono state effettuate le analisi del profilo glucidico, lipidico e insulinemico e degli SCFA. Le concentrazioni di insulina plasmatica erano valutate con la metodica ELISA per la determinazione specifica di insulina biologicamente attiva (DAKO Insulin, DAKO, Diagnostics, Ely, Regno Unito) mediante analizzatore Triturus (Diagnostic Grifols S.A., Barcellona, Spagna). Le concentrazioni plasmatiche del glucosio, del colesterolo e dei trigliceridi sono state determinate con la metodica colorimetrica enzimatica (ABX Diagnostics, Montpellier, France; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany; Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germania) mediante un autoanalizzatore Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia). Il colesterolo HDL è stato isolato dal plasma mediante precipitazione con il fosfotungsteno di sodio e la soluzione di cloruro di magnesio ed è stato dosato mediante la stessa metodica colorimetrica enzimatica usata per il colesterolo totale. La concentrazione del colesterolo LDL è stata calcolata mediante la formula di Friedewald (Friedewald WT et al., 1972). La sensibilità insulinica in fase postprandiale è stata valutata mediante indice OGIS.

Gli SCFA (acido acetico, propionico, butirrico) sono estratti dal siero e determinati da GC/FID DANI (Analitica Instruments S.p.A. Milano, Italia), usando una colonna megabore compatibile con i solventi acquosi in accordo con lo studio di Remesey e Demigne (Remesey C et al., 1974). I campioni prima dell'analisi del GC, sono stati deproteinizzati dall'aggiunta di acido metafosforico. In queste condizioni, le proteine cariche positivamente agivano come polimeri co-precipitando con acido metafosforico.

Analisi statistica. L'endpoint primario era la risposta insulinica postprandiale. Secondo i dati di uno studio precedente (Giacco R et al., 2014), è necessario un *simple size* di trenta soggetti per rilevare il 30% di differenza nella risposta insulinica tra i due gruppi, con un livello di significatività <0.05 (a due code), un potere dello studio dell'80% (errore di tipo II=0.2) e un tasso di drop-out del 10%.

I dati sono espressi come Media $\pm$ DS salvo diversamente indicato per le variabili continue e numero o percentuale per le variabili categoriche.

L'intake energetico e la composizione dei macronutrienti alla fine del run-in e durante l'intervento nutrizionale sono stati calcolati mediante il diario alimentare; l'assunzione durante l'intervento era espresso come media dei due diari alimentari completati alla quarta e all'ottava settimana. L'area incrementale postprandiale (iAUC) è stata calcolata con il metodo trapezoidale. L'indice della sensibilità insulinica postprandiale (OGIS) è stata calcolata mediante curva di carico di glucosio al pasto (MGTT) fino a 3 ore in accordo con Mari et al (Pacini G et al., 2003). Le differenze tra i due gruppi al basale e dopo otto settimane sono state valutate mediante t-test per campioni indipendenti. Le differenze trovate alla fine dell'intervento sono state corrette per il valore al basale (Modello Lineare Generalizzato).

All'interno dei due gruppi sperimentali, le differenze tra inizio e fine del test sono state valutate mediante T-test per campioni accoppiati. Un' ANOVA per misure ripetute è stata

eseguita per valutare gli effetti del tempo, del pasto e dell'interazione pasto x tempo sulla risposta insulinemica e glicemica postprandiale. In questa analisi, i valori postprandiali misurati ogni 30 minuti per un intervallo di 240 minuti sono stati inclusi come livelli del fattore "tempo" all'interno dei soggetti, e il pasto Mediterraneo e pasto di Controllo sono inclusi come livelli del fattore "pasto" all'interno dei soggetti. Le relazioni tra la composizione dei nutrienti alla fine dell'intervento e i parametri metabolici sono state valutate mediante la correlazione di Spearman. Un'analisi di regressione multivariata è stata effettuata per valutare l'effetto di ogni singolo nutriente e i parametri metabolici. Le relazioni tra i livelli di SCFA plasmatici e i parametri metabolici, sia nell'intera popolazione dello studio sia nei due gruppi separatamente (Gruppo della Dieta Mediterranea e Gruppo Dieta Occidentale), e tra le specie microbiche e i parametri metabolici sono stati valutati mediante la correlazione di Spearman. I test non parametrici Kruskal-Wallis e Wilcoxon sono stati usati per esaminare le differenze nelle OTUs (Unità Operative Tassonomiche) abbondanti tra il gruppo Med-D e Control-D. Il livello di significatività statistica è stato fissato ad un $p < 0.05$. Le analisi statistiche sono state effettuate con il software SPSS (Versione 21.0) e R (<https://www.r-project.org>).

Risultati

Ventinove soggetti (16 7M/9F nel gruppo Dieta Mediterraneo e 13 7M/6F nel gruppo controllo) hanno completato lo studio. Le caratteristiche generali dei partecipanti, le misure antropometriche e la pressione arteriosa sono descritte nella tabella 5. Il gruppo Med-D e il gruppo Control-D non differivano significativamente per età, sesso, peso corporeo, circonferenza fianchi e vita e livelli di pressione arteriosa al basale. In accordo con il protocollo, il peso corporeo, il BMI, le circonferenze vita e fianchi non erano differenti al

termine dell'intervento in entrambi i gruppi e lo stesso è stato osservato per la pressione arteriosa (Tabella 5).

Tabella 5. Sesso, età, dati antropometrici e pressione arteriosa dei partecipanti allo studio.

	Gruppo Med-D	Gruppo Control-D	p-value (Gruppo Med-D vs Control-D)	Gruppo Med-D	Gruppo Control-D	p-value (Gruppo Med-D vs Control-D)
	Basale			Dopo 8 settimane d'intervento		
	n=16	n=13		n=16	n=13	
Sesso (% di maschi)	7 (43.8%)	7 (53.8%)	0.320	-	-	
Età (anni)	41.6±12.3	45.9±13.0	0.363	-	-	
Peso corporeo (kg)	82.2±11.7	81.8±11.8	0.914	82.3±12.0	81.3±12.0	0.824
BMI (kg/m ²)	28.9±2.3	29.3±3.5	0.703	28.9±2.4	29.2±3.6	0.831
Circonferenza Vita (cm)	97.1±8.9	97.9±7.7	0.800	97.2±8.9	97.8±7.4	0.852
Circonferenza fianchi (cm)	110.1±6.4	109.1±8.0	0.698	110.1±6.7	109.3±8.1	0.769
Pressione sistolica (mmHg)	110.0±13.2	117.2±14.4	0.177	107.6±8.2	112.6±10.4	0.114
Pressione diastolica (mmHg)	69.5±10.3	73.2±8.3	0.311	69.3±7.4	68.8±8.2	0.421
Media±DS. BMI:Indice di Massa Corporea						

Valutazione dell'adesione alla dieta. Analogamente ai risultati ottenuti da Meslier e colleghi, i due sottogruppi appartenenti al Gruppo Med-D e Control-D, presentavano una dieta simile al basale e mostravano un'alta aderenza alla dieta a cui erano assegnati. I partecipanti al gruppo Med-D, rispetto al gruppo Control-D, avevano aumentato l'assunzione di proteine di origine vegetali, fibre alimentari, zuccheri da frutta, mentre riducevano l'assunzione di proteine animali e acidi grassi saturi. Queste variazioni erano indipendenti dall'intake energetico e dalla composizione dei macronutrienti che non si modificavano al termine dell'intervento (Tabella 6).

Tabella 6. Energia e composizione dei nutrienti al basale e alla fine dell'intervento.

	Gruppo Med-D	Gruppo Control-D	p-value (Gruppo Med-D vs Control-D)	Gruppo Med-D	Gruppo Control-D	p-value (Gruppo Med-D vs Control-D)
	Basale			Dopo 8 settimane d'intervento		
	n=16	n=13		n=16	n=13	
Energia Totale (kcal/giorno)	1857±404	1879±582	0.904	1842±454	1816±574	0.893
Proteine Totali (% del TE)	16.7±2.9	16.2±3.5	0.678	15.6±2.1	15.2±3.4	0.706
Proteine animali (% del TE)	10.1±3.4	9.2±3.6	0.470	5.8±2.3*	8.6±4.0	0.024
Proteine vegetali (% del TE)	5.7±1.2	5.1±1.1	0.174	9.0±1.6*	4.6±0.8	<0.0001
Rapporto proteine vegetale/animale	0.6±0.3	0.6±0.2	0.695	1.8±0.9*	0.6±0.3	<0.0001
Totale di grasso (% del TE)	34.1±3.9	34.5±4.9	0.799	34.6±6.1	34.7±5.4	0.959
SFA (% del TE)	9.7±2.5	8.8±2.0	0.271	6.7±1.4*	9.2±1.9	<0.0001
MUFA (% del TE)	15.1±2.1	14.9±4.9	0.858	17.9±3.8*	13.6±2.6	0.002
PUFA (% del TE)	4.3±1.0	3.9±0.9	0.280	6.2±1.6*	3.8±0.9	<0.0001
Carboidrati (% del TE)	46.8±4.4	47.1±5.9	0.902	48.1±5.6	49.0±5.8	0.691
Zucchero (% del TE)	14.4±3.7	14.0±4.5	0.791	17.2±3.1	13.8±4.1	0.015
Fibre (g/1000 kcal)	11.7±2.4	10.0±2.3	0.076	19.3±3.1*	8.1±2.3*	<0.0001

Media±DS. *p<0.05 vs basale, t-test per dati appaiati. MUFA: Acidi grassi monoinsaturi; PUFA: Acidi grassi polinsaturi; SFA: Acidi grassi saturi.

Il metabolismo glucidico e lipidico in fase postprandiale. Al basale, i gruppi Med-D e Control-D non differivano in termini di colesterolo totale, LDL, HDL e trigliceridi plasmatici. Dopo 8 settimane, la concentrazione di LDL-colesterolo era significativamente più bassa nel gruppo Med-D rispetto al gruppo Control-D (114±38 vs 127±33 mg/dL, p=0.041), i trigliceridi tendevano ad essere più bassi nel gruppo Med-D rispetto al gruppo Control-D (101±45 vs 117±46 mg/dL, p=0.070), mentre i livelli di colesterolo HDL non erano differenti.

La risposta postprandiale dei trigliceridi non era differente tra i gruppi della Med-D e Control-D al basale e non era influenzata dai due trattamenti (Tabella 7).

Tabella 7. Colesterolo, trigliceridi, LDL e HDL plasmatici a digiuno e trigliceridi postprandiali (Area incrementale) al basale e al termine dell'intervento.

	Gruppo Med-D	Gruppo Control-D	p-value (Gruppo Med-D vs Control-D)	Gruppo Med-D	Gruppo Control-D	p-value (Gruppo Med-D vs Control-D)
	Basale			Dopo 8 settimane d'intervento		
	n=16	n=13		n=16	n=13	
Valori a digiuno						
Colesterolo totale (mg/dl)	190±43	196±35	0.685	179±43	196±40	0.071
LDL (mg/dl)	123±38	128±33	0.762	114±38	127±33	0.041
Trigliceridi (mg/dl)	98±43	101±37	0.862	101±45	117±46	0.070
HDL (mg/dl)	46±7	48±11	0.800	44±6	46±10	0.812
Valori postprandiali (Area incrementale)						
Trigliceridi (mg/dl*4h)	7332±5867	7905±5951	0.804	9699±5911	10115±5427	0.854
Media±DS. HDL: Lipoproteine ad alta densità; LDL: Lipoproteina a bassa densità.						

La glicemia e l'insulina plasmatica a digiuno e in fase postprandiale al basale e al termine dell'intervento sono mostrati in figura 8, sia come profilo che, come iAUC, (Figura 8).

I valori a digiuno della glicemia e dell'insulina erano simili tra i due gruppi sia al basale sia al termine dell'intervento. Al basale, i livelli di glicemia postprandiale erano significativamente più bassi dopo i pasti con la Dieta Mediterranea rispetto alla Dieta di Controllo (F=3.245, p=0.009 interazione tempo x pasto, ANOVA misure ripetute; p<0.05 a tempo 60, 90 e 120, t-test a campioni appaiati), ma l'iAUC non era significativamente differente. Le concentrazioni plasmatiche dell'insulina al basale erano significativamente più basse dopo il pasto con la Dieta Mediterranea rispetto ad un pasto di controllo (F=3.308, p=0.004 per interazione tempo x pasto, ANOVA per misure ripetute). I livelli d'insulina erano ridotti a tutti i tempi (p<0.05) con una riduzione significativa anche dell'iAUC (p<0.0001). Dopo 8 settimane d'intervento, la risposta glicemica rimaneva significativamente più bassa dopo il gruppo Med-D rispetto al gruppo Control-D (F=3.612, p=0.001 per interazione tempo x pasto, ANOVA misure ripetute; p<0.05 a tutti i tempi, t-test campioni appaiati), e anche l'iAUC era significativamente più bassa (p=0.033). La risposta insulinica postprandiale alla fine rimaneva significativamente più bassa dopo il

pasto con la dieta Mediterranea ($F=3.501$, $p=0.001$ per l'interazione tempo x pasto, ANOVA per misura ripetuta, t-test a campioni appaiati), così come l'iAUC. In aggiunta, l'iAUC della glicemia postprandiale non era statisticamente significativa tra il primo e dopo l'intervento con la dieta Mediterranea. Al contrario, l'iAUC dell'insulina postprandiale era significativamente più bassa al termine dell'intervento rispetto al basale ($p=0.002$).

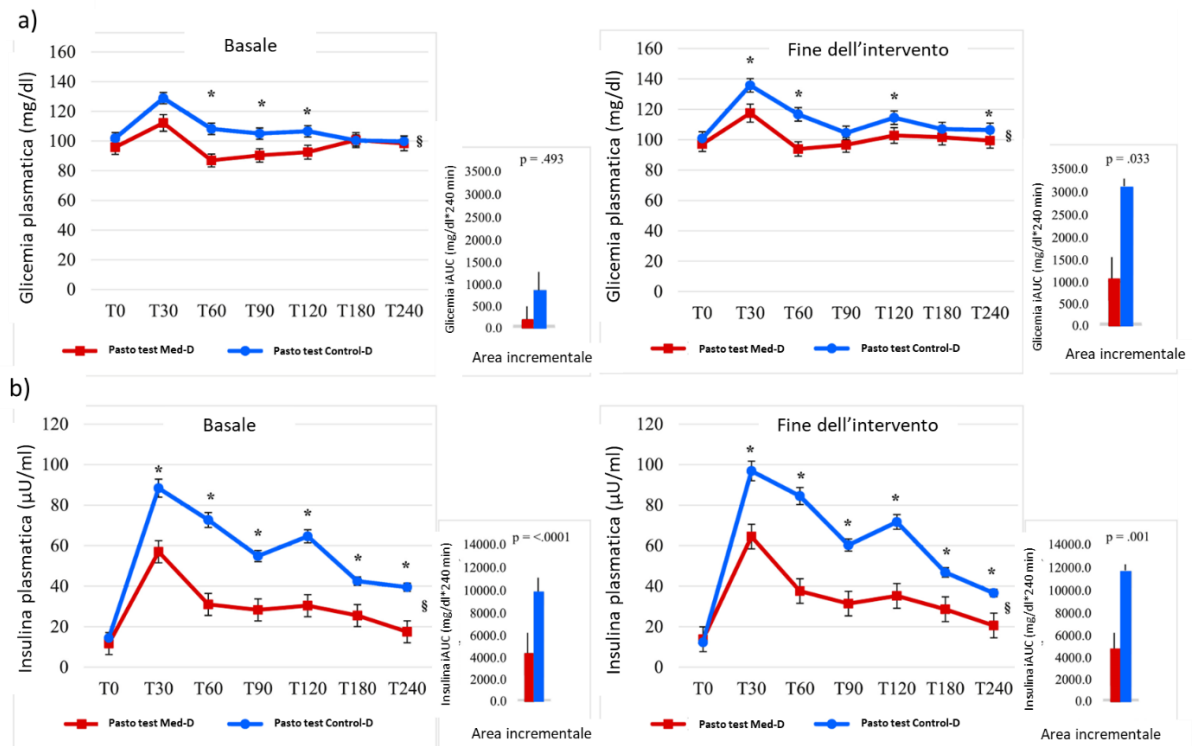


Figura 8: I dati sono espressi come Media $\pm$ SE. Risposta a digiuno e in fase postprandiale della glicemia (Pannello A) e dell'insulina (Pannello B), valutata sia come profilo che iAUC al basale e al termine dell'intervento. * $p<0.05$ da t-test per campioni non appaiati.

Dopo 8 settimane, la glicemia e l'insulina restavano statisticamente significative anche corrette per la risposta al basale (rispettivamente $p=0.029$ e <0.0001). L'indice di sensibilità insulinica postprandiale (OGIS) non era significativamente differente al basale tra i due gruppi. Dopo 8 settimane, l'OGIS si riduceva con la Dieta Controllo e tale differenza risultava statisticamente significativa rispetto alla Dieta Mediterranea ($p=0.008$) (Figura 9). Tale differenza risultava statisticamente significativa anche quando l'analisi veniva corretta per i valori al basale ($p=0.006$).

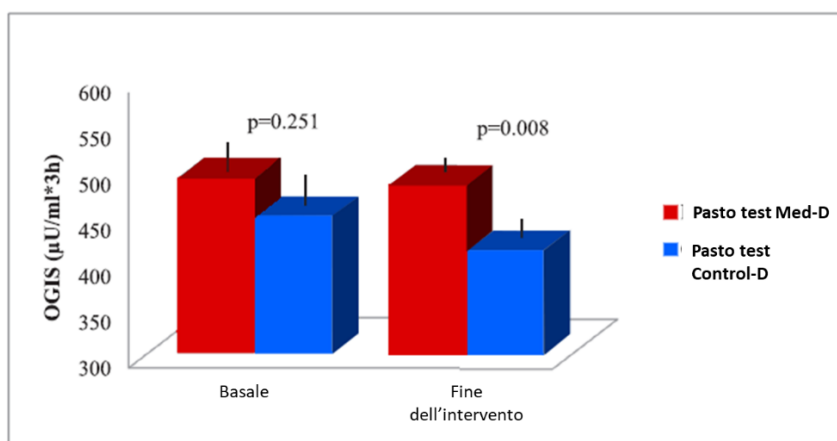


Figura 9: Indice di sensibilità insulinica (OGIS) al basale e al termine dell'intervento.

Le analisi di correlazione mostravano che dopo 8 settimane d'intervento nell'intera popolazione, l'assunzione di fibre e il rapporto proteine vegetali/proteine animali erano inversamente associate con la risposta glucidica e insulinica, espressa come iAUC ($p < 0.05$). L'assunzione di fibre correlava in maniera diretta con l'OGIS ($p < 0.05$). Il consumo di acidi grassi saturi non era associato con la risposta glucidica e l'OGIS, ma correlava in maniera diretta con la risposta insulinica plasmatica, espressa come iAUC ($p < 0.05$). Riguardo ai lipidi plasmatici, solo l'assunzione di acidi grassi saturi correlava con il colesterolo totale e le LDL ($p < 0.05$).

Per valutare la relazione di ogni componente della dieta sulla risposta insulinica e glucidica, è stata eseguita un'analisi di regressione multivariata con le fibre e il rapporto proteine animali/vegetali come covariate (per la risposta insulinica, anche gli acidi grassi saturi sono stati aggiunti come covariata). Solo l'assunzione di fibre restava inversamente associata con l'iAUC del glucosio e dell'insulina (rispettivamente $\beta = -0.478$, $p = 0.014$; $\beta = -0.570$, $p = 0.002$).

I livelli di SCFA a digiuno e in fase postprandiale. I livelli a digiuno e in fase postprandiale dell'acido acetico e propionico non differivano né al basale né al termine dell'intervento. Lo

stesso risultato è stato trovato per le concentrazioni dell'acido butirrico a digiuno. La risposta dell'acido butirrico ai test meal non differiva al basale, mentre la concentrazione di acido butirrico postprandiale, valutata come iAUC, aumentava significativamente alla fine dell'intervento solo nel gruppo Med-D, rispetto al gruppo Control-D (1530 ± 591 vs -295 ± 144 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.019$) (Tabella 8).

Tabella 8. Livelli degli SCFA a digiuno e in fase postprandiale (Area Incrementale) al basale e in fase postprandiale						
	Gruppo Med-D	Gruppo Control-D	p-value (Gruppo Med-D vs Control-D)	Gruppo Med-D	Gruppo Control-D	p-value (Gruppo Med-D vs Control-D)
	Basale			Dopo 8 settimane d'intervento		
	n=14	n=13		n=14	n=13	
Valori a digiuno						
Acido Acetico ($\mu\text{mol/L}$)	261 $\pm$ 95	299 $\pm$ 157	0.441	258 $\pm$ 110	272 $\pm$ 114	0.750
Acido Propionico ($\mu\text{mol/L}$)	27 $\pm$ 12	27 $\pm$ 11	0.927	32 $\pm$ 12	31 $\pm$ 12	0.824
Acido Butirrico ($\mu\text{mol/L}$)	30 $\pm$ 10	24 $\pm$ 10	0.126	29 $\pm$ 10	30 $\pm$ 15	0.743
Valori postprandiali (Area incrementale)						
Acido Acetico ($\mu\text{mol/L} \cdot 4\text{h}$)	-4991 $\pm$ 6691	-7379 $\pm$ 2883	0.774	-7650 $\pm$ 5173	-3889 $\pm$ 6211	0.645
Acido Propionico ($\mu\text{mol/L} \cdot 4\text{h}$)	-726 $\pm$ 419	670 $\pm$ 333	0.921	-728 $\pm$ 716	-6668 $\pm$ 5922	0.250
Acido Butirrico ($\mu\text{mol/L} \cdot 4\text{h}$)	-142 $\pm$ 554	792 $\pm$ 423	0.229	1530 $\pm$ 591	-295 $\pm$ 144	0.019
Media $\pm$ DS.						

L'iAUC dell'acido butirrico al termine dell'intervento era inversamente correlato con l'iAUC dell'insulina e direttamente con l'OGIS in tutta la popolazione (rispettivamente, $r: -0.411$, $p=0.046$ e $r=0.397$, $p=0.050$), così come nel gruppo Med-D ($r: -0.544$, $p=0.039$ e $r:0.449$, $p=0.045$), ma non nel gruppo Control-D (rispettivamente, $r: -0.309$, $p=0.385$ e $r:0.376$, $p=0.082$).

Effetti dell'intervento dietetico sulla composizione del microbiota. Sono state valutate le variazioni nella composizione del microbiota in questo specifico gruppo di soggetti al basale e dopo il trattamento nutrizionale confrontando i gruppi Med-D e Control-D. Un incremento significativo dell' α -diversità nel gruppo Med-D rispetto al gruppo Control-D è stato osservato al termine del trattamento ($p < 0.05$). Dopo 8 settimane d'intervento, è stata trovata una riduzione significativa nell'abbondanza di *Ruminococcus torques*, *Caprococcus comes*, *Streptococcus gallolyticus* e *Flavonifractor plautii* ($p < 0.05$) e un significativo aumento nell'abbondanza di *Intestimonas butyriciproducens* e *Akkermansia muciniphila* ($p < 0.05$) nel gruppo Med-D rispetto al gruppo Control-D. L'incremento dell'acido butirrico era positivamente correlato con l'abbondanza di *Bacteroides xylanisolvens* e *Roseburia hominis* (rispettivamente, $r: 0.26$, $p = 0.05$ e $r: 0.34$, $p = 0.015$).

Discussione

I risultati rilevanti e innovativi di questo studio, condotto su pazienti obesi/sovrappeso, sono: 1) un pasto test simile ad un pranzo Mediterraneo migliora in acuto la risposta glucidica e, in particolare, quella insulinica; 2) un intervento di 8 settimane, con una dieta simile alla dieta Mediterranea- basata su cereali integrali, legumi, verdura, frutta, pesce, noce, olio extravergine d'oliva e una ridotta assunzione di prodotti da cereali raffinati, carne e grassi animali-migliora ulteriormente la risposta insulinica e glucidica e incrementa l'indice di sensibilità insulinica post-pasto; inoltre, lo studio suggerisce il coinvolgimento dei metaboliti del microbiota intestinale – in particolare l'acido butirrico – nel miglioramento del metabolismo glucidico e nell'insulino-sensibilità. Vengono confermati, infine, gli effetti benefici della dieta mediterranea sui lipidi al digiuno, in particolare sui livelli di colesterolo LDL, anche in persone senza alterazioni metaboliche e con livelli dei lipidi plasmatici normali. Si dovrebbe enfatizzare che, nel nostro studio, la Dieta Mediterranea, caratterizzata

da bassi livelli di acidi grassi saturi (<10%), da alti livelli di acidi grassi Monoinsaturi e bassa aggiunta di zuccheri, migliora i fattori di rischio cardio-metabolici rispetto alla Dieta di Controllo, suggerendo che gli effetti benefici della dieta Mediterranea potrebbero essere più evidenti se la Dieta Controllo fosse una dieta occidentale più radicale. In base alla composizione dei nutrienti sopra riportata, i principali effetti benefici osservati nella Dieta Mediterranea potrebbero essere dovuti all'incremento del consumo di prodotti di origine vegetale e al pesce; tuttavia, non possiamo escludere che parte dei benefici indotta dalla Dieta Mediterranea sui fattori di rischio cardio-metabolici potrebbero essere anche dovuti ai polifenoli contenuti nell'olio extravergine d'oliva e nei prodotti di origine vegetale. Questi dati sono stati ottenuti in condizioni di vita quotidiana usando prodotti alimentari comunemente disponibili e senza l'uso di integratori alimentari, incrementando così l'unicità dei nostri risultati.

I possibili effetti della Dieta Mediterranea sono stati studiati in termine sia di fattori di rischio cardiovascolari che eventi cardiovascolari (Dinu M et al.,2018; Eleftheriou D et al.,2018); tuttavia, il suo possibile impatto sulla risposta glucidica e insulinemica postprandiale è ancora poco noto sebbene le anomalie postprandiali, in particolari del metabolismo glucidico, potrebbero contribuire al rischio cardiovascolare. A tal proposito, il nostro studio fornisce un importante contributo, in quanto dimostra che un pasto tipico della Dieta Mediterranea riduceva in acuto la risposta glucidica e insulinemica. In aggiunta, questo effetto benefico era rafforzato a medio termine, portando ad una riduzione clinicamente rilevante nella risposta glucidica e insulinica (57% e 67%, rispettivamente). Questi risultati sembrano suggerire un miglioramento della sensibilità insulinica rispetto alla Dieta di Controllo, molto simile per composizione ad un pattern alimentare occidentale.

I risultati del nostro studio sono in linea con le evidenze scientifiche che indicano come la dieta mediterranea possa rappresentare un modello alimentare utile nella riduzione del

rischio di sviluppare il diabete di tipo 2 sia in soggetti sani che in individui ad alto rischio cardiovascolare (Salas-Salvadó S et al., 2011).

Di notevole interesse è che il nostro intervento si basava sull'adozione di una dieta Mediterranea nel suo complesso da parte dei partecipanti, pertanto, i nostri risultati sono fortemente associati all'intero regime dietetico. Secondo l'analisi di regressione multivariata, l'assunzione di fibre rimaneva significativamente ed inversamente associata alla risposta glucidica e insulinica, suggerendo un ruolo chiave di questa componente nutrizionale nel miglioramento del metabolismo glucidico. L'effetto della fibra alimentare, principalmente di quelle viscosi, può essere dovuto a una ritardata digestione dei carboidrati e assorbimento del glucosio nel piccolo intestino. È probabile che nel nostro studio la composizione del pasto test della Dieta Mediterranea, più alta in fibre alimentare rispetto al pasto Controllo (29.0 g vs 5.7 g) e contenente il 50 % delle fibre derivate dai legumi (una fonte di fibre alimentari viscosi), spiegherebbe una ridotta risposta glucidica e insulinica post-pasto in acuto. Gli effetti benefici a medio termine della Dieta Mediterranea sul metabolismo glucidico e l'insulino-sensibilità postprandiale sembrano coinvolgere il microbiota intestinale e i suoi metaboliti (Tosti V et al., 2018; Martínez-Gonzalez M et al., 2015). Infatti, sono state osservate alcune interessanti variazioni nella composizione del microbiota intestinale, traendo un incremento della ricchezza delle specie, correlato con un miglioramento dello stato di salute, poiché una ridotta diversità microbica, valutata come α -diversità, è associata a diversi tipi di malattie, inclusa l'obesità (Turnbaugh PJ et al., 2009). In aggiunta, è stato ottenuto un aumento di batteri che degradavano le fibre come l'*Intestimonas butyriciproducens* (Bui TP et al., 2016), e, l'*Akkermansia miciniphila* (Cani PD et al., 2017). Dall'altro lato, è stata osservata una riduzione nei livelli di batteri potenziali pro-infiammatori come *Rominococcus torques* (Franzosa EA et al., 2019; Lloyd-Price J., 2019), *Streptococcus gallolyticus* (Grimm I et al., 2018) e *Flavonifractor plautii*, associati

con il cancro colon rettale (Gupta A et al., 2019); inoltre, è stata rilevata una relativa riduzione del *Coprococcus comes*, abbondante nel microbiota dei pazienti obesi (Liu R et al., 2017). La dieta mediterranea potrebbe contribuire nel ripristinare la condizione di eubiosi intestinale. In accordo con le variazioni della composizione del microbiota intestinale, l'intervento nutrizionale con la Dieta Mediterranea incrementava i livelli di acido butirrico postprandiale, inversamente correlati con la risposta insulinica e direttamente con l'OGIS, suggerendo un possibile ruolo di questo SCFA nel miglioramento del metabolismo glucidico e della sensibilità insulinica. L'acido butirrico, insieme all'acido propionico e acetico, sono prodotti dalla fermentazione delle fibre alimentari nell'intestino crasso e sono parzialmente assorbiti per raggiungere differenti tessuti.

L'intervento con la Dieta Mediterranea causava un incremento di batteri che degradano le fibre e le concentrazioni aumentate dell'acido butirrico erano positivamente correlati ai batteri xilanolitici *Bacteroides xylanisolvens* (Despres J et al., 2016) e ai batteri produttori di butirrato *Roseburia hominis* (Machiels K et al., 2014), suggerendo dunque un'effettiva interazione tra dieta, microbiota e metabolomica. Generalmente, la concentrazione nel sangue dell'acido propionico è associata con possibili effetti benefici sul metabolismo glucidico e sensibilità insulinica. Infatti, in un nostro precedente studio è stato dimostrato che un intervento di 12 settimane basato sui cereali integrali incrementava la concentrazione plasmatica dell'acido propionico a digiuno e tale aumento era associato con una riduzione dell'insulina postprandiale (Vetrani C et al., 2016). Nel presente studio, i livelli di propionato plasmatico non variavano né al digiuno, né in fase postprandiale, mentre le concentrazioni di acido butirrico erano incrementate dopo la Dieta Mediterranea. Abbiamo ipotizzato che i differenti risultati tra i due studi possano essere spiegati da un'alta varietà di fibre nella Dieta Mediterranea usata in questo studio rispetto alle fibre dei cereali integrali, che erano principalmente insolubili. Per quanto ne sappiamo, questa è la prima volta che vengono

considerati i livelli plasmatici postprandiale di acido butirrico. Studi in vitro e in vivo hanno dimostrato che l'acido butirrico potrebbe giocare un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo glucidico con una possibile azione sia a livello della secrezione insulinica sia dell'insulino-sensibilità. Infatti, è stato riportato che l'acido butirrico possa agire attraverso i recettori GPCR nell'intestino con la produzione del GLP-1, noto per incrementare la secrezione insulinica (Tolhurst G et al., 2017). Riguardo il miglioramento della sensibilità insulinica, il butirrato potrebbe agire riducendo la deposizione ectopica e l'infiammazione a livello del fegato e dei tessuti periferici attraverso un incremento della β -ossidazione degli acidi grassi (McNabney SM et al., 2017). In aggiunta, il butirrato potrebbe migliorare l'integrità intestinale con una conseguente riduzione dell'infiammazione sistemica e dello stress ossidativo conducendo al miglioramento della sensibilità insulinica (McNabney SM et al., 2017).

Oltre a fornire nuove evidenze sul metabolismo glucidico, i nostri studi indicano che la Dieta Mediterranea è riuscita a ridurre i livelli di colesterolo LDL anche in soggetti sovrappeso/obesi normolipidemicici, rinforzando i dati già ottenuti in soggetti con alti livelli di colesterolo LDL (Riccardi G et al., 1991). Gli effetti sui trigliceridi erano meno evidenti, con una tendente riduzione dei livelli a digiuno e nessuna variazione della risposta postprandiale. Questi risultati potrebbero essere dovuti ai bassi livelli dei trigliceridi dei partecipanti e, per quanto riguarda i dati postprandiali, ai pasti test che avevano un basso contenuto di acidi grassi totali (35 grammi) - uno dei determinanti della risposta dei trigliceridi postprandiali.

I principali punti di forza del nostro studio sono che 1) è uno studio d'intervento controllato eseguito in condizioni di vita libera, utilizzando un modello dietetico mediterraneo, seguito per secoli nelle popolazioni delle regioni mediterranee. Questo, ovviamente, incrementa la sua fattibilità e la possibilità di essere implementato per larga scala per un più lungo periodo

di tempo; 2) si è concentrato principalmente sul metabolismo glucidico postprandiale, un aspetto generalmente trascurato; 3) mostra una stretta relazione tra i parametri metabolici e il microbiota.

Lo studio presenta anche alcune limitazioni: 1) un intervento dietetico di 8 settimane non può rappresentare un reale esperimento a lungo termine; 2) è stato eseguito su un basso numero di partecipanti e 3) in partecipanti sovrappeso/obesi senza forti alterazioni metaboliche; dunque, i risultati ottenuti non potrebbero essere generalizzati su altre popolazioni. In conclusione, i risultati di questo studio su un sottogruppo di partecipanti dello studio di Meslier e colleghi (Meslier et al., 2020) fornisce forti evidenze che una dieta simile al modello tradizionale Mediterraneo migliora i fattori di rischio cardio-metabolici in condizioni di digiuno, il metabolismo glucidico postprandiale e l'insulino-sensibilità. Pertanto, gli effetti benefici di una Dieta Mediterranea nel prevenire le malattie cardiovascolari e il diabete di tipo 2 potrebbero essere anche mediati dal suo effetto sul metabolismo glucidico postprandiale. Il nostro studio evidenzia anche le implicazioni dell'acido butirrico e della fibra alimentare come precursore, nel mediare alcuni degli effetti benefici della Dieta Mediterranea. Sono richiesti studi meccanicistici per comprendere il potenziale ruolo della variazione della composizione del microbiota intestinale e il possibile ruolo degli SCFA nella prevenzione delle malattie metaboliche attraverso la dieta. Gli effetti benefici della Dieta Mediterranea dovuta all'azione di diversi prodotti di origini vegetali, in particolare la fibra, potrebbero spiegare gli effetti pleiotropici su differenti rischi cardiovascolari.

5.3 Linea di ricerca 3

A) La riduzione della lipogenesi de novo media gli effetti benefici di diete isoenergetiche sul grasso epatico. (pubblicazione n°5, Nutrients 2022)

Introduzione

La steatosi epatica non alcolica (NAS) è l'accumulo del grasso nel fegato in una quantità maggiore del 5.5% del parenchima, valutata mediante l'1H-MRS (Haas JT et al 2016). Il grasso epatico è considerato il primo passo della steatosi epatica non alcolica (NAFLD), una condizione patologica che comprende diverse caratteristiche istopatologiche con correlazioni cliniche di diversa gravità che vanno dalla steatosi epatica all'epatocarcinoma. La NAFLD è associata alle malattie cardiovascolari e all'insorgenza del rischio di diabete di tipo 2 (Anstee QM et al., 2013). Un'alta percentuale di pazienti con il diabete di tipo 2 presentano la NAFLD (Younossi, Z.M., 2019).

La perdita di peso e le modifiche qualitative della dieta, che consistono principalmente nella sostituzione degli acidi grassi saturi, con gli acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi, gli zuccheri semplici con carboidrati complessi e fibra e l'aumento di componenti alimentari con proprietà antiossidanti, come vitamine e polifenoli, rappresentano le principali strategie per ridurre il grasso epatico (Della Pepa G et al., 2017). Attraverso la modifica degli acidi grassi circolanti, gli interventi nutrizionali potrebbero ripristinare lo squilibrio tra i depositi lipidici (derivati dalla dieta, DNL e assorbimento degli acidi grassi), smaltimento (ossidazione e produzione delle VLDL) e partizione (attività delle desaturasi) che conducono all'accumulo di grasso epatico (Roumans, KHM, 2021).

Diversi studi hanno dimostrato che le diete ad alto contenuto di carboidrati incrementano la DNL al digiuno e in fase postprandiale, mentre la sostituzione dello zucchero con l'amido riduce la DNL (Hudgins, LC., et al 1998). Allo stesso modo, la supplementazione con i

PUFA n-3, EPA e DHA, ad una dose di 4g/d riduce sia la DNL sia a digiuno che in fase postprandiale (Green CJ et al., 2020). Alcuni studi hanno dimostrato che il grado di saturazione degli acidi grassi è un fattore determinante per entrare nel pathway di ossidazione, con i PUFA e i MUFA che vengono facilmente ossidati rispetto agli acidi grassi saturi (Hodson L et al., 2019).

I polifenoli sono componenti alimentari con proprietà antiossidanti che sono inversamente associate alla steatosi (Bozzetto L et al., 2016) e potrebbero riuscire a contrastare l'accumulo di grasso epatico attivando la cascata di segnalazione epatica PPAR- α -FGF21-AMPK-PCG-1 α che è associato con un' aumentata ossidazione degli acidi grassi, alla riduzione della DNL e al ripristino della funzionalità mitocondriale (Bozzetto L et al., 2016).

Scopo

In un nostro precedente studio (Della Pepa G et al., 2020), è stato dimostrato che una dieta isocalorica multifattoriale, caratterizzata da un alto contenuto in fibra, MUFA, PUFA n-6 e n-3, polifenoli e Vitamina D, E e C, riduceva del 40 % il contenuto di grasso epatico in pazienti con il diabete di tipo 2, rispetto ad una dieta con la stessa quantità in MUFA, che ha già dimostrato di essere capace di ridurre il contenuto di grasso epatico in un nostro precedente studio (Bozzetto L et al., 2012).

In questa analisi ancillare del nostro precedente studio (Della Pepa G et al., 2020), è stato valutato come la dieta multifattoriale e la dieta MUFA influenzano la composizione degli acidi grassi circolanti e se gli effetti benefici della dieta osservati sul grasso epatico erano mediati da variazioni della DNL epatica, attività della SCD-1 e/o β -ossidazione.

Materiali e metodi

Partecipanti. I partecipanti allo studio sono stati reclutati rispettando diversi criteri di inclusione e di esclusione tra i pazienti afferenti alla UOC di Diabetologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli che presentavano le seguenti caratteristiche:

- Diabete Mellito di tipo 2 in terapia con dieta e/o metoformina o sulfaniluree
- Uomini e donne (in post- menopausa) di età compresa tra 35 e 70 anni
- Indice di massa corporea compresa tra 27-35 kg/m²
- Discreto compenso glicemico (HbA1c < 7,5%)
- Terapia ipolipemizzante stabile (esclusi integratori, nutraceutici, ecc).

Sono stati esclusi i pazienti in terapia insulinica o con ipoglicemizzanti non previsti dai criteri di inclusione, individui affetti da epatopatia acuta o cronica e altre patologie compromettenti lo stato di salute (insufficienza renale, broncopneumopatia cronico-ostruttiva, neoplasie, ecc). Inoltre, sono stati esclusi i pazienti che presentavano concentrazioni plasmatiche di trigliceridi > 350mg/dl e di colesterolo LDL >130 mg/dl. Non erano reclutabili i soggetti che consumavano abitualmente bevande alcoliche, nutraceutici e integratori alimentari. Lo studio è stato approvato dal comitato etico della Federico II e registrato a ClinicalTrials.gov, numero NCT03380416. Il presente studio è stato condotto secondo le linee guida della dichiarazione di Helsinki. Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato scritto per partecipare allo studio.

Disegno dello studio. Lo studio è stato condotto secondo un disegno sperimentale randomizzato, controllato e a gruppi paralleli. Dopo un periodo iniziale di osservazione della durata di 3 settimane (run-in) durante il quale i partecipanti hanno continuato a seguire la loro dieta abituale, i pazienti sono stati assegnati, in maniera casuale, a uno dei due interventi

dietetici della durata di 8 settimane: Dieta Multifattoriale o dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi (Dieta MUFA), utilizzata come controllo. Ai partecipanti è stato chiesto di non modificare la frequenza della loro attività fisica abituale per tutto il periodo di intervento. La randomizzazione dei partecipanti è stata effettuata da un ricercatore non direttamente coinvolto nello studio e stratificata in base a sesso, indice di massa corporea (27-29 kg/m² o 30-35 kg/m²) e tipologia di terapia per il diabete.

I parametri antropometrici, metabolici, gli LCFA dei trigliceridi del siero e il contenuto di grasso epatico sono stati valutati prima e dopo 8 settimane d'intervento. I campioni di sangue sono stati prelevati a digiuno per determinare la glicemia, l'insulina, i trigliceridi, il colesterolo, l'HbA1C, il β -idrossibutirrato e la composizione dei trigliceridi del siero (Figura 10).

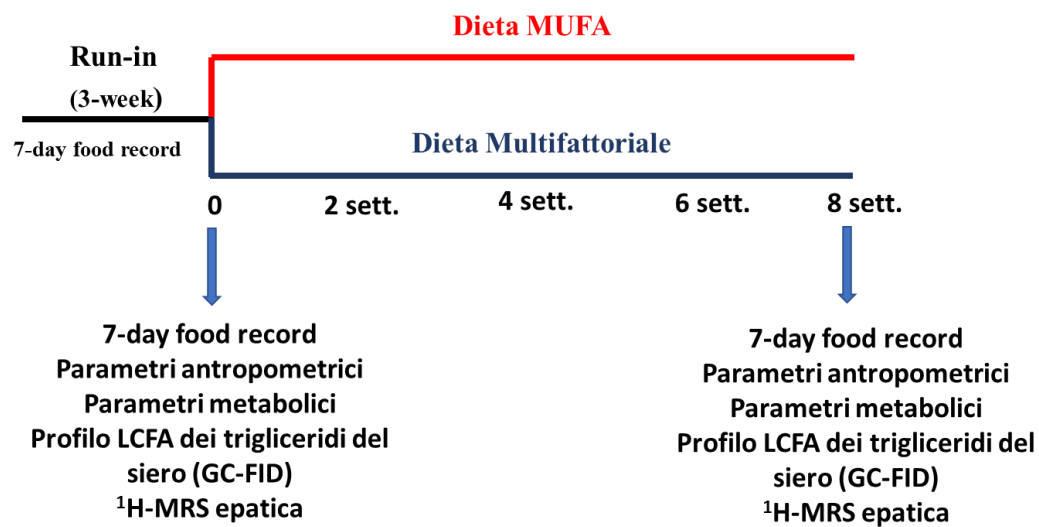


Figura 10: Disegno dello studio.

Diete Sperimentali. Le due diete sperimentali erano isoenergetiche e avevano la stessa composizione in micronutrienti.

Le uniche differenze erano rappresentate dal contenuto di:

- Fibre: Dieta MUFA = 10 g/1000 Kcal vs Dieta Multifattoriale = 24 g/1000 Kcal;
- Polifenoli: Dieta MUFA = 376 mg/die vs Dieta Multifattoriale = 2715,5 mg/die;

- Acidi grassi polinsaturi n-3: Dieta MUFA = 1,1 g/die (0,5%) vs Dieta Multifattoriale = 2,6 g/die (1,2%);
- Acidi grassi polinsaturi n-6: Dieta MUFA = 7,4 g/die (3,4%) vs Dieta Multifattoriale = 9,6 g/die (4,4%);
- Indice glicemico: Dieta MUFA = 58,5 % vs Dieta Multifattoriale: 47%;
- Carico Glicemico: Dieta MUFA=125 vs Dieta Multifattoriale = 94;
- ORAC: Dieta MUFA=7501 vs Dieta Multifattoriale= 14187;
- Vitamina D: MUFA= 1 mcg/die vs Dieta Multifattoriale = 5,3 mcg/die
- Vitamina C: MUFA= 88 mg/die vs Dieta Multifattoriale= 253 mg/die (Tabella 9).

Tabella 9: Composizione bromatologica dei due trattamenti nutrizionali		
Energia/nutrienti	Dieta MUFA	Dieta Multifattoriale
Energia (Kcal)	1972	1977
Proteine (%)	18	18
Grassi totali (%)	41	41
SFA (%)	7	6
MUFA (%)	28	26
PUFA totali (%)	4	5,8
PUFA n- 3 (g/die)	1,1 (0,5%)	2,6 (1,2%)
PUFA n-6 (g/die)	7,4 (3,4%)	9,6 (4,4%)
Carboidrati (%)	41	41
Carboidrati semplici (%)	11	9,8
Fibre (g/1000 Kcal)	10	24
Polifenoli (g/die)	376	2715,5
Indice glicemico (%)	58,5	47
Carico Glicemico	125	94
Vitamina E (mg)	22	23,6
Vitamina D (mcg)	1	5,3
Vitamina C (mg)	88	254
MUFA: Acidi grassi monoinsaturi; PUFA: Acidi grassi polinsaturi; SFA: Acidi grassi saturi.		

La differente composizione qualitativa dei due trattamenti nutrizionali è stata ottenuta mediante la selezione di specifici alimenti e bevande.

In particolare, l'uso di differenti varietà di olio extra-vergine d'oliva, il consumo di caffè decaffeinato e tè deteinato nella Dieta Multifattoriale consentiva un differente apporto di polifenoli rispetto alla Dieta MUFA; inoltre, è stata data un'indicazione qualitativa e

quantitativa del consumo di vegetali e di frutta con differente contenuto di vitamine e polifenoli. Infine, il differente contenuto in carboidrati a basso indice glicemico e di fibra alimentare è stato ottenuto utilizzando cereali integrali e legumi nella Dieta Multifattoriale rispetto a riso, pasta di semola e patate nella Dieta MUFA (Figura 11).

Dieta MUFA	Dieta Multifattoriale
FIBRE (10g/1000 kcal) -Prodotti ottenuti da farine raffinate (pasta, riso, pane e fette biscottate) -Patate -Frutta e verdura (zucchine, banana, cavolfiore)	FIBRE (24 g/1000 Kcal) -Prodotti ottenuti da farine integrali (pasta, riso, pane, fette biscottate) -Legumi (fagioli, lenticchie, piselli, ceci) almeno 4 volte a settimana -Verdura (broccoli, peperoni, funghi, carciofi, indivia)
POLIFENOLI (376 mg/die) -Frutta e verdura (spinaci e mele)	POLIFENOLI (2715,5 mg/die) -Frutta e verdura (rucola, carciofi, cipolle, arance) -Caffè decaffeinato (3 tazzine/die) e tè verde (400 ml/die)
MUFA -Olio extravergine di oliva (EVOO) a basso contenuto di polifenoli	MUFA -Olio extravergine di oliva (EVOO) ad alto contenuto di polifenoli
PUFA ω-6 (7,4 g/die)	PUFA ω-6 (9,6 g/die) -Mandorle (20g/die)
PUFA ω-3 (1,1 g/die)	PUFA ω-3 (2,6 g/die) -Salmone (almeno 3 volte a settimana)

Figura 11: Alimenti caratteristici della Dieta MUFA e della Dieta Multifattoriale

Analisi di laboratorio. Le concentrazioni plasmatiche di glucosio, colesterolo e trigliceridi sono state valutate con la metodica colorimetrica enzimatica (Roche Diagnostics, Milano, Italia and ABX Diagnostics, Montpellier, Francia) mediante ABX PENTRA 400 HORIBA Medical, Montpellier, Francia). Il colesterolo LDL è stato calcolato mediante le formule di Friedewald. La concentrazione plasmatica di insulina era determinata con la metodica ELISA (DIA-source ImmunoAssay S.A., Nivelles, Belgio) mediante analizzatore Triturus (Diagnostic Grifols S.A., Barcelona, Spain). HbA1c era misurata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (Agilent HPLC 1200, Santa Clara, CA, USA). Il β -idrossibutirrato è analizzato con il metodo endpoint enzimatico (DiaSys Diagnostic System, Holzheim,

Germania) mediante una metodica fotometrica automatizzata (ABX-Pentra 400; Horiba Medical Kyoto, Japan). Le percentuali degli acidi grassi nella frazione dei trigliceridi del siero sono state valutate mediante gascromatografia. Per prima cosa, le frazioni dei trigliceridi sono state separate dai lipidi totali del siero mediante estrazione a fase solida (Burdge GC et al., 1985). Successivamente, la frazione dei trigliceridi è stata idrolizzata per ottenere gli acidi grassi liberi che sono trans-esterificati per ottenere gli esteri metilici. L'analisi gascromatografica era eseguita con un GC Dani 1000 (DANI Instruments GC 1000, DANI Instruments, Cologno Monzese, Italia) dotato di rilevatore con ionizzazione di fiamma e colonna capillare (Burdge GC et al., 1985).

L' HOMA-IR è stato calcolato usando la seguente formula: glicemia al digiuno (mg/dL) x insulina a digiuno (μ U/mL)/405 (Matthews DR et al., 1985). L'indice di lipogenesi è stato calcolato come rapporto tra acido palmitico e acido linoleico (C16:0/C18:2n6) (Chong MF et al., 2008). Il rapporto tra palmitoleico e acido palmitico è stato calcolato (C16:1/C16:0) come indice indiretto dell'attività della steroil-CoA desaturasi (SCD-1) (Peter A et al., 2009).

Analisi statistiche. I dati sono espressi come media $\pm$ DS, salvo diversamente indicato. La differenza all'interno del gruppo (prima-dopo intervento) è stata valutata con il t-test a campioni accoppiati. Le differenze tra le due diete sono state valutate con l'analisi di varianza per misure ripetute (RM-ANOVA). Il test Shapiro-Wilk è stato eseguito per valutare se le variabili seguivano una distribuzione normale. Le correlazioni bivariate tra le variazioni (8 settimane – basale) della DNL, parametri metabolici e grasso epatico sono state valutate dalle correlazioni di Pearson o Spearman, se i dati non erano distribuiti normalmente, aggiustando per analisi multiple. Un'analisi di regressione stepwise è stata effettuata per determinare i predittori metabolici della variazione del grasso epatico,

inserendo la variazione del grasso epatico come variabile dipendente e le variazioni di glicemia, insulina, trigliceridi, β -idrossibutirrato come variabili indipendenti. Un p-value <0.05 è stato considerato significativo. Le analisi statistiche sono state eseguite usando il software SPSS v.25 (SPSS/PC).

Risultati

I dati presentati in questo lavoro si riferiscono ai 37 partecipanti per i quali la valutazione della composizione degli acidi grassi dei trigliceridi del siero era disponibile: 11 uomini e 9 donne erano assegnati alla Dieta MUFA e 9 uomini e 8 donne alla Dieta Multifattoriale.

Al basale, la distribuzione del sesso, dell'età, dei parametri antropometrici e metabolici e il contenuto di grasso epatico non differiva tra i due gruppi (Tabella 10).

Gli effetti delle due diete sui parametri metabolici e contenuto di grasso epatico. Dopo 8 settimane d'intervento, la riduzione del grasso epatico era significativamente più alta nella dieta multifattoriale rispetto alla dieta MUFA ($-4.1\% \pm 4.6\%$ vs $-1.5\% \pm 2.7\%$, rispettivamente, $p=0.040$). Una significativa, sebbene clinicamente trascurabile, riduzione del peso corporeo (~ 1 kg) e dell'HbA1c (-0.2%) è stata osservata in entrambi gli interventi nutrizionali senza differenze significative tra i due gruppi. Questi dati riproducono fedelmente quelli ottenuti nell'analisi intention-to-treat originale (ITT) (Tabella 10).

Tabella 10: Caratteristiche dei partecipanti, misure antropometriche, parametri metabolici e contenuto di grasso epatico all'inizio e al termine dell'intervento nutrizionale.

	Dieta MUFA (n=20)		Dieta Multifattoriale (n=17)		P-value Diet × Time[†]
	Basale	8 settimane	Basale	8 settimane	
Peso corporeo (kg)	84 (15)	83 (15)*	84 (9)	83 (9)*	0.860
BMI (kg/m ²)	31 (3)	30 (3)*	32 (4)	31 (4)*	0.535
Circonferenza vita (cm)	105 (10)	104 (11)	106 (10)	105 (10)	0.986
Colesterolo totale (mmol/L)	144 (29)	140 (26)	144 (25)	145 (32)	0.478
Colesterolo HDL (mmol/L)	39 (8)	38 (8)	41 (10)	38 (8)	0.088
Colesterolo LDL (mmol/L)	84 (24)	81 (21)	82 (21)	85 (26)	0.407
Trigliceridi (mmol/L)	109 (35)	107 (44)	105 (38)	110 (40)	0.783
Glicemia (mmol/L)	130 (18)	128 (17)	123 (14)	124 (19)	0.606
HbA1c (%)	6.5 (0.6)	6.3 (0.7)*	6.5 (0.4)	6.3 (0.6)*	0.681
Insulina (pmol/L)	19 (10)	20 (11)	19 (9)	15 (8)	0.090
HOMA-IR	6.0 (3.0)	6.4 (3.4)	5.8 (2.8)	4.6 (2.4)	0.216
Grasso epatico (%)	9.9 (9.0)	8.4 (9.0)*	9.5 (7.9)	5.4 (4.9)*	0.040

Data sono espressi come media (SD). *p <0.05 vs. basale; [†]ANOVA misure ripetute. BMI: indice di massa corporea; HDL: lipoproteine ad alta densità; HbA1c: emoglobina glicata; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; LDL: lipoproteine a bassa densità;

Gli effetti della dieta sulla composizione dei trigliceridi del siero. L'aderenza alla Dieta in entrambi i gruppi era ottima. La composizione degli acidi grassi dei trigliceridi è mostrata in tabella 11. L'acido miristico, palmitico e palmitoleico erano significativamente ridotti nella Dieta Multifattoriale, con una differenza statisticamente significativa tra i due interventi per l'acido miristico. Al contrario, l'EPA, DHA e PUFA n-3 totali aumentavano nella dieta ricca multifattoriale rispetto alla Dieta MUFA, con una differenza tra i due gruppi. L'acido linoleico non si modificava dopo entrambi gli interventi, mentre l'acido oleico aumentava significativamente con entrambe.

Tabella 11: Composizione degli acidi grassi dei trigliceridi del siero al basale e dopo l'intervento.					
	Dieta MUFA (n=20)		Dieta Multifattoriale (n=17)		P-value Diet × Time[†]
	Basale	8 settimane	Basale	8 settimane	
Acido Miristico (%)	1.9 (0.6)	2.1 (0.9)	2.4 (0.7) [‡]	1.8 (0.7)*	0.003
Acido Palmitico (%)	21.0 (5.7)	19.2 (3.8)	21.4 (3.9)	17.6 (4.6)*	0.262
Acido Stearico (%)	6.9 (3.8)	6.1 (2.3)	6.3 (2.1)	6.1 (1.6)	0.692
Acido Palmitoleico (%)	2.7 (1.2)	2.2 (0.8)	2.8 (1)	1.8 (0.6)*	0.087
Acido Oleico (%)	30.2 (6.9)	33.9 (6.2)*	30.8 (6.9)	34.7 (6.9)*	0.917
Acido Linoleico (%)	13.8 (3.6)	13.4 (3.4)	12.5 (3.8)	14.1(3.2)	0.121
Acido γ-Linolenico(%)	12.2 (3.5)	11.6 (4.2)	10.9 (3.9)	12.1 (3.5)	0.230
Acido arachidonico (%)	0.5 (0.3)	0.6 (0.5)	0.6 (0.3)	0.7 (0.5)	0.220
PUFA n-6 (%)	1.1 (0.5)	1.3 (0.6)	1.0 (0.4)	1.2 (0.5)	0.147
Acido α-Linolenico (%)	2.9 (1.0)	3.3 (1.1)*	2.5 (0.8)	4.4 (1.7)*	0.001
Acido Eicosapentanoico (%)	0.7 (0.3)	0.8 (0.4)	0.7 (0.4)	1.1 (0.6)*	0.092
Acido Docosapentanoico (%)	0.7 (0.4)	0.8 (0.5)	0.6 (0.4)	1.3 (0.8)*	0.009
Acido docosaenoico(%)	0.7 (0.4)	0.8 (0.5)	0.5 (0.3)	1.0 (0.8)*	0.115
PUFA n-3 (%)	0.8 (0.5)	1.0 (0.6)	0.7 (0.6)	1.3 (0.9)*	0.046
I dati sono espressi in media (SD). [‡] p <0.05 vs. Dieta Mufa al basale; *p <0.05 vs. basale [†] misure ripetute ANOVA. PUFA: acidi grassi polinsaturi					

Gli effetti delle diete sulla Lipogenesi De Novo, l'attività della steroil-CoA e la β-ossidazione. Al basale, l'indice di lipogenesi, l'attività della SCD-1 e le concentrazioni a digiuno di β-idrossibutirrato non erano statisticamente significative tra i due gruppi. L'indice di lipogenesi si riduceva significativamente dopo la dieta multifattoriale (2.2±0.8 vs. 1.5±0.5, p = 0.0001), ma non cambiava dopo la dieta MUFA (1.9±1.1 vs. 1.9±0.9, p = 0.949), con una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi (p=0.004). L'attività della SCD-1 si riduceva dopo la dieta multifattoriale (0.13±0.05 vs. 0.10±0.03, p = 0.001), ma non

variava dopo la Dieta MUFA (0.13 ± 0.06 vs. 0.12 ± 0.03 , $p = 0.121$), senza alcuna differenza tra i due gruppi ($p=0.205$). Le concentrazioni a digiuno del β -idrossibutirrato non si modificavano dopo entrambe le diete (Dieta Mufa, 0.11 ± 0.08 vs. 0.10 ± 0.05 mmol/L, $p = 0.706$; dieta multifattoriale, 0.11 ± 0.05 vs. 0.10 ± 0.04 mmol/L, $p = 0.439$) (Figura 12)

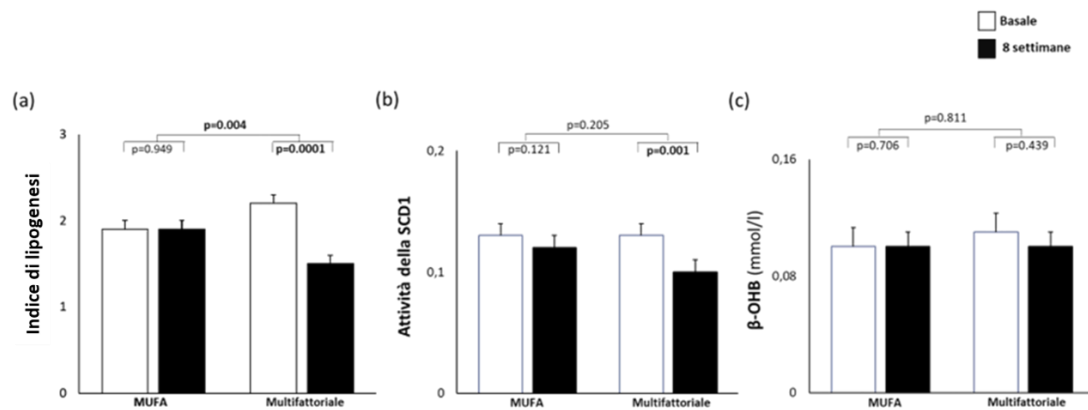


Figura 12: I dati sono espressi come Media $\pm$ SE. (a) Indice di lipogenesi, (b) Indice dell'attività SCD1, e (c) il plasma β -idrossibutirrato (β -OHB) al basale e al termine dell'intervento con la Dieta MUFA ($n=20$) o la Dieta Multifattoriale ($n=17$).

Analisi di correlazione. La variazione nel contenuto di grasso epatico dopo l'intervento dietetico (8 settimane – basale) correlavano in maniera diretta con le variazioni di acido miristico dei trigliceridi del siero ($r=0.453$, $p=0.040$), e in maniera inversa con i PUFA n-3 ($r=-0.469$, $p=0.024$) nell'intera popolazione. Inoltre, le variazioni nel contenuto di grasso epatico correlavano significativamente con l'indice di lipogenesi nell'intera popolazione ($r=0.436$, $p=0.042$), mentre le correlazioni non erano significative nei due gruppi considerati separatamente (Figura 13).

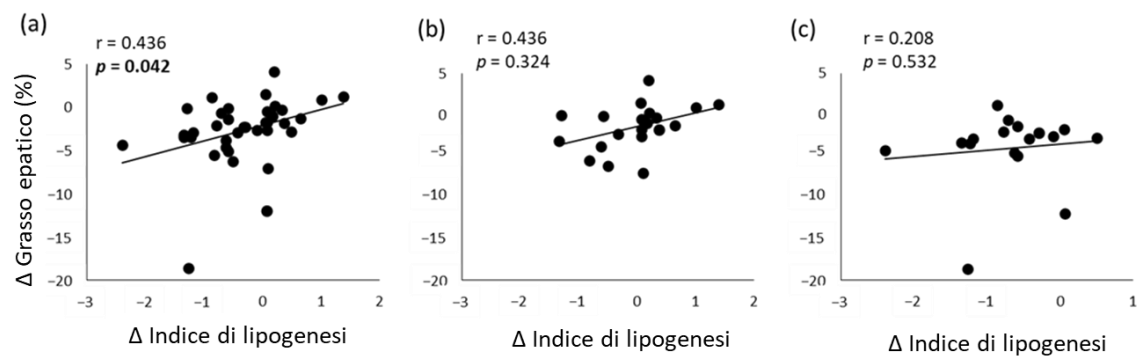


Figura 13: Correlazione tra le variazioni (Δ : 8 settimane - basale) dell'indice di lipogenesi e le variazioni del grasso epatico nella popolazione intera ($n = 37$) (a), nel gruppo MUFA ($n = 20$) (b) e nella dieta Multifattoriale ($n = 17$) (c). Analisi di correlazione di Spearman.

Un'analisi di regressione lineare, eseguita inserendo la variazione di grasso epatico come variabile dipendente e la variazione della glicemia, insulina, trigliceridi, β -idrossibutirrato e indice di lipogenesi come variabili indipendenti, prediceva le variazioni di grasso epatico ($R^2=0.118$), con le variazioni dell'indice di lipogenesi come unico predittore del modello ($\beta=0.344$, $p=0.043$).

Discussione

In questo studio la dieta multifattoriale induceva variazioni differenti nella composizione degli acidi grassi dei trigliceridi del siero, rispetto alla Dieta ricca in MUFA, influenzando il metabolismo epatico attraverso la riduzione della DNL; le variazioni dell'indice di lipogenesi erano significativamente associate alle modifiche nel contenuto di grasso epatico. Nessuna differenza è stata osservata tra le due diete per il compenso glucidico, l'insulino-resistenza e i lipidi plasmatici; questo potrebbe essere dovuto a fattori differenti, come il buon compenso glicemico dei pazienti al basale e al profilo salutare di entrambe le diete.

La lipogenesi de novo. Nel nostro studio la dieta multifattoriale induceva una riduzione significativa del 30% nell'indice di lipogenesi. Tale riduzione è più bassa di quella osservata con la drastica riduzione dei carboidrati nella dieta in cui la sostituzione isocalorica dei carboidrati (40% vs 4% TEI) con i grassi (42% vs 72% TEI) e proteine (42% vs 72% TEI)

in un intervento di 7 giorni induceva una riduzione del 79% nella DNL valutata mediante metodi isotopici in pazienti con obesità e NAFLD (Mardinoglu A et al., 2018). Nel nostro studio la quantità di carboidrati era la stessa in entrambi gli interventi nutrizionali quindi, il nostro risultato potrebbe essere spiegato dalla differenza di altre componenti dietetiche, quali: i grassi, i polifenoli e le fibre. Precedenti studi non hanno dimostrato variazioni nella DNL epatica valutata con isotopi in individui sani dopo un intervento nutrizionale con una dieta isoenergetica ad alto contenuto di acido palmitico e linoleico (Konrad SD et al 1998); lo stesso risultato è stato dimostrato in adulti sovrappeso e obesi dopo una dieta ipercalorica ricca in acidi grassi saturi o insaturi (Luukkonen PK et al., 2018). La supplementazione con PUFA n-3 (4g/giorno) induceva una riduzione della DNL, misurata con tecniche isotopiche standard, in individui maschi sani (Green CJ et al.,2020).

In un precedente studio, in un contesto di una dieta ad alto contenuto di carboidrati, l'indice di lipogenesi diminuiva del 40% in soggetti sani quando gli zuccheri erano sostituiti con l'amido (Hudgins LC et al.,1998). La nostra dieta multifattoriale era ricca in fibre e polifenoli e a basso indice glicemico. Queste componenti dietetiche potrebbero aver ridotto il substrato disponibile per la via lipogenica, inibendo l'assorbimento dei carboidrati a livello intestinale e/o attraverso la composizione del microbiota intestinale (Vetrani C et al., 2020). Le variazioni dell'indice di lipogenesi correlavano in maniera diretta e significativa con le modifiche del grasso epatico. Nell'analisi di regressione, includendo i diversi fattori metabolici associati in maniera significativa alla riduzione del grasso epatico (variazioni della glicemia, insulina, trigliceridi, β -idrossibutirrato e indice di lipogenesi), è stato osservato che la variazione dell'indice di lipogenesi era l'unico fattore significativamente associato alle modifiche del contenuto del grasso epatico. La riduzione dell'indice di lipogenesi, come meccanismo centrale nella riduzione del grasso epatico, è supportata dalla nozione che l'alterazione di questa via metabolica contribuisca all'accumulo di grasso

epatico. La DNL è responsabile di circa il 30% della produzione di trigliceridi nelle persone con NAFLD e insulino-resistenza, di contro risulta essere <5% nei soggetti sani (Lambert, J.E et al 2014). L'impatto dietetico sulla DNL è clinicamente significativo in termine di rischio al diabete e compenso glicemico, come indicato dalla forte correlazione tra acidi grassi saturi derivati dalla DNL e resistenza insulinica epatica (Roumans KHM et al 2020).

Composizione degli Acidi Grassi dei trigliceridi del siero. Gli interventi dietetici inducevano variazioni nel profilo degli acidi grassi dei trigliceridi del siero che erano in linea con le variazioni dell'intake dietetico. L'ottima adesione agli interventi nutrizionali era confermata dalla riduzione degli acid grassi saturi e dall'aumento dei PUFA osservati nei trigliceridi del siero soprattutto dopo l'intervento con la dieta multifattoriale, di contro l'acido oleico aumentava in entrambe le diete. La riduzione dell'acido miristico e un incremento dei PUFA n-3 erano correlati con una riduzione del grasso epatico. I nostri risultati sono in linea con precedenti studi, che hanno mostrato come una riduzione dell'acido palmitico e miristico e l'incremento dell'acido linoleico era associato a variazioni nel contenuto di grasso in pazienti obesi sottoposti ad una dieta ricca in acidi grassi saturi o PUFA n-6 (Bjermo, H et al., 2012). Un recente studio osservazionale ha riportato simili risultati che hanno dimostrato come l'acido linoleico era correlato inversamente al grasso epatico dopo la correzione con fattori confondenti (Fridén, M et al., 2021). In accordo con questi risultati, altri studi hanno mostrato che pazienti con la NAFLD sono caratterizzati da un aumento dei MUFA e da una riduzione dell'acido linoleico nel plasma e il loro profilo degli acidi grassi è associato ad un aumento della lipogenesi (Puri P et al., 2009; von Loeffelholz et al., 2017).

L'attività della steroil-CoA. La via metabolica regolata dalla SCD-1 ha un effetto potenziale sull'accumulo del grasso epatico attraverso la ripartizione degli acidi grassi. L'acido

palmitico che entra nel pathway della SCD-1 è derivato dalla DNL o dalle fonti alimentari (Hodson L et al., 2013). Nel nostro studio l'indice indiretto dell'attività della SCD-1 si riduce principalmente dopo la dieta multifattoriale; dunque, è plausibile che le variazioni dell'attività della SCD-1 potrebbero aver contribuito agli effetti dietetici sulla steatosi epatica, che è in linea con precedenti studi con una numerosità più ampia del nostro che dimostravano una correlazione diretta tra l'attività della SCD-1 e il grasso epatico (Bjermo H et al., 2012; Hodson L et al., 2013).

β-Idrossibutirrato. Le concentrazioni del β-idrossibutirrato non si modificavano dopo gli interventi dietetici. Precedenti studi hanno dimostrato che la riduzione della DNL è simultanea all'aumento della β-ossidazione, soprattutto quando queste variazioni sono guidate da un aumento dietetico dei PUFA (Davidson MH et al 2006). In un precedente studio (Bozzetto L et al., 2016) una dieta ricca in MUFA riduceva il β-idrossibutirrato nelle persone con diabete di tipo 2. Questa incongruenza nei risultati potrebbe derivare dalle differenze nell'età e nella distribuzione del genere dei partecipanti tra gli studi, ma anche dalle differenti caratteristiche fisiopatologiche della steatosi epatica. Gli individui con la NALFD potrebbero avere, più basse (Crocì I et al., 2013), simili (Kotronen, A et al., 2009) o più alte concentrazioni di β-idrossibutirrato (Bugianesi E et al., 2005). In particolare, l'aumento del β-idrossibutirrato è proporzionale al carico di Acidi Grassi Liberi (FFA) al fegato, indipendentemente dalla DNL. Quindi un'aumentata lipolisi aumenta le concentrazioni di β-idrossibutirrato (Luukkonen et al., 2018). Il contributo relativo della DNL e dell'ossidazione dei lipidi potrebbe variare a seconda del background genetico e metabolico dell'individuo (Luukkonen PK et al., 2022).

Punti di forza e limiti. Un punto di forza del seguente studio è il disegno randomizzato e controllato che assicura un'alta riproducibilità dei risultati clinici e meccanicistici. La principale limitazione è l'uso dell'indice di lipogenesi e dell'attività di Stereol-CoA. L'uso di questi indici, soprattutto l'indice di lipogenesi, è stato messo in discussione nel contesto di studi trasversali poichè l'assunzione dietetica negli studi osservazionali è abitualmente non standardizzata (Rosqvist F et al., 2019). Questo problema è stato reso meno rilevante utilizzando le variazioni degli indici di lipogenesi e dell'attività di SCD-1. Le analisi sono fornite nel contesto di un'assunzione dietetica standardizzata con una simile quantità di acido palmitico al basale e dopo l'intervento. Un'altra limitazione del nostro studio potrebbe essere rappresentata dalla mancanza dei biomarker plasmatici dell'assunzione delle fibre, vitamine e polifenoli; inoltre, questi ultimi mostrano una bassa disponibilità; dunque, è difficile definire il loro reale contributo nel contesto della dieta complessiva (Di Lorenzo C et al., 2021).

Conclusione

Il nostro studio mostra come una dieta ricca in componenti con molteplici proprietà benefiche, che può essere considerata una variante della Dieta Mediterranea, sebbene ricca in fonti alimentari di altri modelli salutari, come polifenoli, riduce maggiormente l'accumulo di grasso epatico rispetto ad una dieta benefica ricca soltanto in MUFA, inibendo, almeno in parte, la DNL. Questo effetto è probabilmente mediato dalla sinergia di tutti i componenti alimentari sulla disponibilità di substrato della DNL e la sua regolazione ormonale e genetica. Questi risultati offrono nuove informazioni sulla comprensione dell'insorgenza della NAFLD e l'applicazione di nuovi potenziali approcci terapeutici non farmacologici.

B) Una dieta multifattoriale riduce il grasso pancreatico e incrementa la risposta insulinica postprandiale in pazienti con diabete di tipo 2 (pubblicazione n° 6, Diabetes Care, 2022)

Introduzione

Il grasso ectopico è definito come la deposizione dei trigliceridi all'interno di cellule non adipose (Ferrara D et al., 2019), come fegato, reni, muscolo scheletrico e pancreas ed è associata ad una ridotta capacità di accumulare il grasso nel tessuto adiposo (Ahmed B et al., 2021). La deposizione del grasso ectopico in differenti tessuti e organi è uno dei meccanismi fisiopatologici più comuni delle malattie cardio-metaboliche (Despres JP et al. 2021). Per molto tempo è stata attribuita grande attenzione alla deposizione del grasso nel fegato e nel cuore, ma negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per l'accumulo del grasso pancreatico (steatosi pancreatica o steatosi pancreatica non alcolica) (Wagner R et al., 2022). L'accumulo del grasso pancreatico è comune nella popolazione generale (Wagner R et al., 2022), e nel lungo termine, potrebbe peggiorare sia le funzioni esocrine, conducendo a pancreatiti acute e croniche, fibrosi pancreatica e cancro al pancreas (Petrov MS et al., 2022; Jiang Y et al., 2019), sia le funzioni endocrine, probabilmente riducendo la secrezione insulinica, agendo così sul metabolismo glucidico (Jiang Y et al., 2019; Kozowa J et al., 2021; Ishibashi C et al., 2020). A tal proposito, alcuni studi hanno dimostrato una correlazione diretta tra grasso pancreatico e la disfunzione delle β -cellule riducendo, così, la secrezione d'insulina in soggetti sani (Tushuizen ME et al., 2007; Ishibashi C et al., 2018), con prediabete (Heni M et al., 2010) o diabete di tipo 2 (Ishibashi C et al 2020; Horii T et al., 2020).

Di conseguenza, alcuni potenziali approcci per ridurre il grasso pancreatico potrebbero impattare in maniera positiva sulla secrezione insulinica, un fattore chiave coinvolto nella fisiopatologia del diabete (Inaishi J et al 2020), prevenendo l'insorgenza del diabete di tipo

2 o migliorando il compenso glicemico in individui con diabete di tipo 2. La perdita di peso ottenuta mediante differenti strategie rappresenta il principale obiettivo terapeutico per trattare l'obesità e il grasso viscerale (Gaesser GA et al., 2021); tuttavia, al momento, solo una rilevante perdita di peso ottenuta mediante una dieta fortemente ipocalorica o la chirurgia bariatrica, è riuscita ad indurre una riduzione clinicamente rilevante del grasso pancreatico (Jiang Y et al., 2019; Steven S et al., 2016; Gaborit B et al., 2015; Lim et al., 2011; Al-Mrabeh A et al., 2020; Rossi AP et al., 2012; Thomsen MN et al., 2022).

Nonostante le consistenti evidenze che hanno dimostrato come la perdita di peso è associata ad una riduzione del grasso pancreatico, queste strategie eccessivamente radicali potrebbero essere poco applicabili su larga scala (Arterburn DE et al., 2020) e il mantenimento del calo ponderale nel lungo termine in seguito ad una dieta fortemente ipocalorica rappresenta una grande sfida (Rehackova L et al., 2016). Le variazioni nella composizione della dieta, indipendentemente dalle modifiche dell'intake energetico, sono efficaci nella riduzione del grasso ectopico in differenti distretti corporei, offrendo un trattamento maggiormente flessibile e un'alternativa sicura alla restrizione energetica (Della Pepa et al., 2017; Trouwborst I et al., 2018); tuttavia, si sa molto poco sugli effetti della composizione della dieta stessa, indipendentemente dalla riduzione del peso corporeo, sul contenuto di grasso pancreatico.

Scopo

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare gli effetti di una dieta isocalorica multifattoriale caratterizzata da un alto contenuto di PUFA, soprattutto PUFA n-3, MUFA, fibre alimentari, polifenoli, vitamine D, E e C, rispetto con una dieta isocalorica ricca in MUFA e simile per altri macronutrienti sulla riduzione del grasso pancreatico in pazienti sovrappeso/obesi con diabete di tipo 2. Altri due obiettivi di questo studio erano di valutare

se la possibile riduzione del grasso pancreatico era associato con un miglioramento della risposta insulinica postprandiale e i possibili meccanismi di riduzione del grasso pancreatico.

Materiali e metodi

Partecipanti dello studio. I partecipanti allo studio sono stati reclutati rispettando diversi criteri di inclusione e di esclusione tra i pazienti afferenti alla UOC di Diabetologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli che presentavano le seguenti caratteristiche:

- Diabete Mellito di tipo 2 in terapia con dieta e/o metoformina o sulfaniluree
- Uomini e donne (in post- menopausa) di età compresa tra 35 e 70 anni
- Indice di massa corporea compresa tra 27-35 kg/m²
- Discreto compenso glicemico (HbA1c < 7,5%)
- Terapia ipolipemizzante stabile (esclusi integratori, nutraceutici, ecc).

Sono stati esclusi i pazienti in terapia insulinica o con ipoglicemizzanti non previsti dai criteri di inclusione, individui affetti da epatopatia acuta o cronica e altre patologie compromettenti lo stato di salute (insufficienza renale, broncopneumopatia cronico-ostruttiva, neoplasie, ecc); inoltre, sono stati esclusi i pazienti che presentavano concentrazioni plasmatiche di trigliceridi > 350mg/dl e di colesterolo LDL >130 mg/dl. Non erano reclutabili i soggetti che consumavano abitualmente bevande alcoliche, nutraceutici e integratori alimentari.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico della Federico II e registrato a ClinicalTrials.gov, numero NCT03380416. Il presente studio è stato condotto secondo le linee guida della dichiarazione di Helsinki. Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato scritto per partecipare allo studio.

Disegno dello studio. Lo studio è stato condotto secondo un disegno sperimentale randomizzato, controllato e a gruppi paralleli. Dopo un periodo iniziale di osservazione della durata di 3 settimane (run-in) durante il quale i partecipanti hanno continuato a seguire la loro dieta abituale (Vitale M et al., 2016), i pazienti sono stati assegnati, in maniera casuale, a uno dei due interventi dietetici della durata di 8 settimane: Dieta Multifattoriale o Dieta simile per contenuto in MUFA, utilizzata come controllo (Della Pepa G et al., 2020). Ai partecipanti è stato chiesto di non modificare la frequenza della loro attività fisica abituale per tutto il periodo di intervento. La randomizzazione dei partecipanti è stata effettuata da un ricercatore non direttamente coinvolto nello studio e stratificata in base a sesso, indice di massa corporea ($27-29 \text{ kg/m}^2$ o $30-35 \text{ kg/m}^2$) e tipologia di terapia per il diabete.

I parametri antropometrici, metabolici e il contenuto di grasso pancreatico sono stati valutati prima e dopo un periodo di 8 settimane d'intervento. I campioni di sangue sono stati prelevati a digiuno per determinare la glicemia, l'insulina, l'HbA1C, il β -idrossibutirrato e la composizione degli acidi grassi dei trigliceridi del siero (Figura 14).

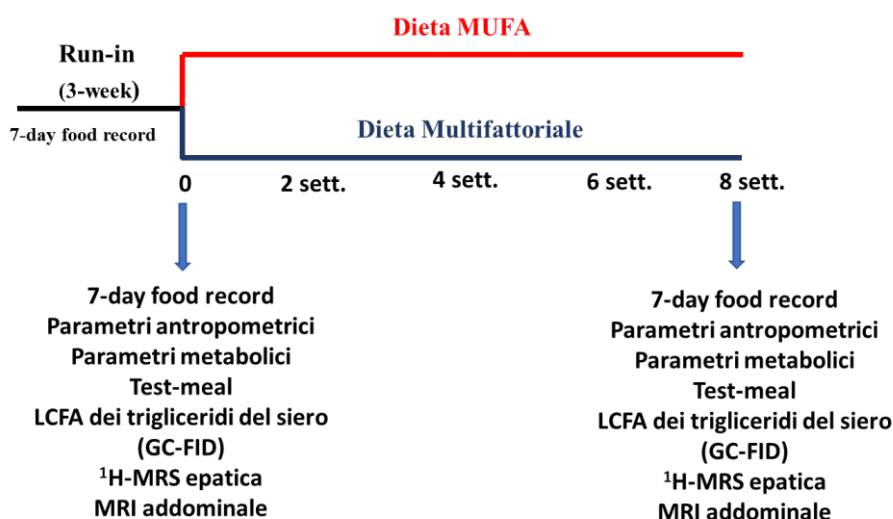


Figura 14: Disegno dello studio

Diete sperimentali e pasti test. La composizione delle due diete sperimentali è descritta nella tabella 9. All'inizio e alla fine dell'intervento, allo scopo di valutare i parametri metabolici

si prelevavano dei campioni di sangue sia a digiuno sia durante la fase postprandiale dopo il pasto test, che rispecchiava la composizione della dieta a cui i pazienti erano assegnati. Il pasto test analogo alla Dieta Multifattoriale era composto da pasta integrale, fagioli secchi, salmone, bresaola, olio extravergine d'oliva, rucola, arance e tè verde; il pasto test analogo alla Dieta MUFA era composto da riso, passata di pomodoro, uova, filetto di vitello, bresaola, olio extravergine d'oliva, piselli surgelati e banana (Tabella 12).

Tabella 12: Alimenti caratteristici dei due pasti test.

DIETA MUFA	DIETA MULTIFATTORIALE
85g riso	70g pasta
100g pomodoro passata	40g fagioli secchi
30g uova	32g salmone
95g vitello filetto	32g bresaola
13g bresaola	32g olio extravergine di oliva
33g olio extravergine di oliva	100g rucola
30g piselli surgelati	115g arance
100g banana	200 ml tè verde (2 bustine)

I due pasti test venivano preparati nella cucina metabolica dai dietisti con una quantità standardizzata di tutti gli alimenti e in modo che la loro composizione rispecchiasse quella della dieta a cui i partecipanti erano assegnati (Tabella 13).

Tabella 13: Composizione bromatologica dei pasti

Energia/nutrienti	Dieta MUFA	Dieta Multifattoriale
Energia (Kcal)	843	821
Proteine (%)	18	18
Grassi totali (%)	42	42
SFA (%)	7	7
MUFA (%)	28	28
PUFA totali (%)	4	5,8
OMEGA 3 (g/die)	0,36 (0,4%)	1,20 (1,31%)
OMEGA 6 (g/die)	2,87(3,0%)	2,91 (3,2%)
Carboidrati (%)	40	40
Carboidrati semplici (%)	7,6	7,9
Fibre (g/1000 Kcal)	7,7	14,2
Polifenoli (g/die)	15,6	758,3
Vitamina E (mg)	8,3	8,53
Vitamina D (mcg)	1,83	2,72
Vitamina C (mg)	33	167,5

MUFA: Acidi grassi monoinsaturi; PUFA: Acidi grassi polinsaturi; SFA: Acidi grassi saturi.

Analisi di laboratorio. I campioni di sangue sono stati prelevati sia al digiuno e durante le 4 ore successive al pasto test sia al basale che dopo 8 settimane. I campioni di sangue sono stati raccolti dalla vena anticubitale e poi conservati a -80°C fino al momento dell'analisi. La concentrazione plasmatica di glucosio è stata valutata con la metodica colorimetrica enzimatica (Roche Diagnostics, Milano, Italia and ABX Diagnostics, Montpellier, Francia) mediante ABX PENTRA 400 HORIBA Medical, Montpellier, Francia). La concentrazione

plasmatica di insulina è stata determinata con la metodica ELISA (DIA-source ImmunoAssay S.A., Nivelles, Belgio) mediante analizzatore Triturus (Diagnostic Grifols S.A., Barcelona, Spain). HbA1c è stata misurata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (Agilent HPLC 1200, Santa Clara, CA, USA). Il β -idrossibutirrato è stato analizzato con il metodo endpoint enzimatico (DiaSys Diagnostic System, Holzheim, Germania) mediante una metodica fotometrica automatizzata (ABX-Pentra 400; Horiba Medical Kyoto, Japan). Le proporzioni degli acidi grassi nella frazione dei trigliceridi del siero sono state valutate mediante gascromatografia. Per prima cosa, le frazioni dei trigliceridi sono state separate dai lipidi totali del siero mediante estrazione a fase solida. Successivamente, la frazione dei trigliceridi è stata trans-esterificata per ottenere gli esteri metilici degli acidi grassi. L'analisi gascromatografica è stata eseguita con un GC Dani 1000 (DANI Instruments GC 1000, DANI Instruments, Cologno Monzese, Italia) dotato di rilevatore con ionizzazione di fiamma e colonna capillare (Burdge GC et al., 2000). L' HOMA-IR è stato calcolato usando la seguente formula: glicemia al digiuno (mg/dL) x insulina a digiuno (μ U/mL)/405. L'indice di lipogenesi è stato calcolato come rapporto tra acido palmitico e acido linoleico (C16:0/C18:2n6) come un indice indiretto di DNL (Hudgins LC et al., 1996).

Analisi statistica. Il *sample size* è stato calcolato sull'outcome primario del trial (Riduzione della percentuale di contenuto di grasso epatico) (Della Pepa G et al., 2020). Secondo i risultati di un precedente studio che ha valutato gli effetti di un intervento dietetico ipocalorico sul grasso pancreatico (Gepner Y et al., 2018), un *sample size* di 18 partecipanti per ogni gruppo era necessario per rilevare una differenza del 10% nel grasso pancreatico con un 80% di potenza ad un livello di significatività al 5%, assumendo un tasso di dropout del 15%. I dati sono espressi come media $\pm$ DS, salvo diversamente indicato. Le differenze

all'interno del gruppo (Valori di 8 settimane – basale) sono state valutate mediante t-test per dati appaiati. Le differenze tra i due gruppi sono state valutate mediante t-test per campioni indipendenti sulle variazioni (8 settimane – basale). Per valutare l'impatto delle variazioni nel contenuto nel grasso pancreatico, grasso epatico e peso corporeo, le differenze tra i trattamenti sono state valutate mediante modello lineare generalizzato ANCOVA, prendendo le variazioni nel contenuto del grasso pancreatico (8 settimane – basale) come variabili dipendenti, il trattamento come fattore fisso e le variazioni nel contenuto di grasso epatico e peso corporeo come covariate.

Le aree incrementali postprandiali (iAUC) sono state calcolate utilizzando la regola trapezoidale dopo sottrazione del valore al basale. Le associazioni bivariate tra le variazioni di grasso ectopico (contenuto di grasso pancreatico ed epatico) e la risposta glucidica e insulinica postprandiale (iAUC), β -idrossibutirrato e indice di lipogenesi sono state valutate mediante correlazioni di Pearson; è stata anche valutata la correlazione tra contenuto di grasso pancreatico ed epatico. Per tutte le analisi, i livelli di significatività statistica sono stati fissati a $p < 0.05$. Le analisi statistiche sono state eseguite usando il software SPSS 25.0 (SPSS/PC; IBM, Armonk NY).

Risultati

Parametri antropometrici e metabolici. Quarantatré individui hanno completato lo studio, ma i dati sul contenuto del grasso pancreatico erano disponibili solo per 39 partecipanti, che erano inclusi nell'analisi (n=21 Dieta MUFA; n=18 Dieta Multifattoriale). Al basale, i partecipanti nei due gruppi avevano una simile distribuzione del sesso, età, parametri antropometrici e metabolici. L'aderenza alla dieta dei partecipanti era ottimale, come dimostrato dal diario alimentare che compilavano ogni 7 giorni durante il trial. Dopo 8 settimane d'intervento, una riduzione del peso corporeo statisticamente significativa (-1.2

kg) era osservata dopo entrambe le diete senza differenze tra i due gruppi. I livelli di Hb1AC miglioravano in maniera significativa dopo la dieta multifattoriale (da $6.5 \pm 0.4\%$ [48 ± 4 mmol/mol] a $6.3 \pm 0.6\%$ [45 ± 7 mmol/mol]; $P=0.013$) e la dieta MUFA (da $6.5 \pm 0.6\%$ [48 ± 7 mmol/mol] a $6.4 \pm 0.7\%$ [46 ± 8 mmol/mol]; $P=0.012$), senza alcuna differenza tra i due gruppi ($P=0.763$). Tra i due gruppi non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa della glicemia, insulina e β -idrossibutirrato a digiuno e l'indice HOMA-IR; al contrario, l'indice di lipogenesi si riduceva significativamente dopo la dieta multifattoriale (da 2.2 ± 0.8 a 1.5 ± 0.5 ; $P \leq 0.0001$) ma non cambiava dopo la dieta MUFA (da 1.9 ± 1.1 a 1.9 ± 0.9 ; $P = 0.949$) con una significativa differenza tra i gruppi per le variazioni dal basale al termine dell'intervento (Tabella 14).

Tab 14: Caratteristiche antropometriche e metaboliche dei partecipanti al basale e al termine dei due interventi.

	Dieta MUFA (n=21)		Dieta Multifattoriale (n=18)		<i>p value</i> [†]
	Basale	8 settimane	Basale	8 settimane	
Peso corporeo (kg)	84.1 (14.9)	83.1 (14.6)*	84.6 (9.3)	83.3 (9.1)*	0.749
BMI (kg/m ²)	30.8 (3.5)	30.3 (3.4)*	31.8 (3.7)	31.3 (3.7)*	0.985
Circonferenza vita (cm)	105 (10)	104 (10)	107 (10)	106 (10)	0.525
Glicemia (mmol/L)	7.2 (0.9)	7.2 (0.9)	6.8 (0.8)	6.9 (1.1)	0.995
HbA1c (%)	6.5 (0.6)	6.4 (0.7)*	6.5 (0.4)	6.3 (0.6)*	0.450
HbA1c (mmol/mol)	48 (7)	46 (8)*	48 (4)	45 (7)*	0.450
Insulina (pmol/L)	114 (60)	120 (66)	114 (54)	96 (48)	0.118
HOMA-IR	5.9 (3.0)	6.3 (3.6)	5.8 (2.8)	4.7 (2.4)	0.204
Indice di lipogenesi	1.9 (1.1)	1.9 (0.9)	2.2 (0.8)	1.5 (0.5)**	0.004
β -idrossibutirrato (mmol/L)	0.11 (0.08)	0.10 (0.05)	0.11 (0.05)	0.10 (0.04)	0.811

I dati sono espresso come Media (SD). * $p < 0.05$ vs. basale; ** $p < 0.0001$ vs. basale; [†] differenza tra le variazioni (valori delle 8 settimane - basale) tra i gruppi; BMI: indice di massa corporea; HbA1c: emoglobina glicata; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance .

Contenuto del grasso pancreatico. Al basale il contenuto di grasso pancreatico non differiva tra i due gruppi. Dopo 8 settimane di intervento dietetico, il contenuto di grasso pancreatico si riduceva in maniera significativamente nella dieta multifattoriale (da $15.7 \pm 6.5\%$ a $14.1 \pm 6.3\%$; $P=0.024$), mentre non si modificava nella Dieta MUFA ($17.1 \pm 10.1\%$ to $18.6 \pm 10.6\%$; $P=0.139$). Le variazioni nel contenuto di grasso pancreatico (8 settimane – basale) erano significativamente differenti tra la dieta multifattoriale e la dieta MUFA in termini di valore assoluto (rispettivamente, $-1.6 \pm 2.6\%$ vs. $1.5 \pm 4.5\%$; $P=0.014$) o percentuale (rispettivamente, $-8 \pm 20\%$ vs. $10 \pm 23\%$; $P=0.012$). Le differenze nelle variazioni del grasso pancreatico tra le due diete restano statisticamente significative dopo l'aggiustamento per la variazione del contenuto di grasso epatico e peso corporeo ($P=0.035$, analisi di modello lineare generalizzato ANCOVA) (Figura 15).

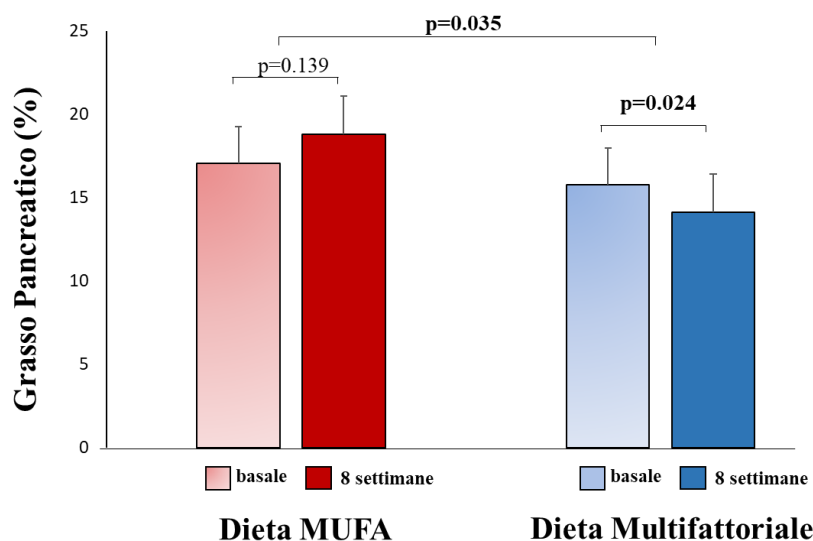


Figura 15: I dati sono espressi come Media $\pm$ SE. Le differenze all'interno del gruppo erano eseguite con il t-test per dati appaiati; le differenze tra i due trattamenti erano eseguiti mediante il modello lineare generale ANCOVA, prendendo come le variazioni del contenuto del grasso pancreatico (8 settimane – basale) come variabile dipendente, il trattamento dietetico come fattori fissi e le variazioni del grasso epatico e del peso corporeo come covariate.

Risposta postprandiale glucidica e insulinica. Dopo 8 settimane di intervento nutrizionale la risposta glicemica al test meal era simile al basale in entrambi i gruppi sia come profilo sia come iAUC (Figura 16, Pannello A). La risposta insulinica postprandiale non si modificava dopo la dieta ricca in MUFA, mentre era statisticamente più alta ai tempi 30,60 e 120 dopo il pasto ($p < 0.05$ per tutti), dopo 8 settimane d'intervento con la dieta multifattoriale. In maniera analoga, la risposta insulinica postprandiale, valutata come iAUC fino al tempo 240 minuti dopo il pasto, incrementava in maniera significativa nella dieta multifattoriale (da 54115 ± 39829 a 65484 ± 40448 pmol/L/min; $P = 0.041$), mentre tendeva a ridursi dopo la Dieta MUFA (da 65769 ± 33329 a 56254 ± 22786 pmol/L/min; $P = 0.083$), con una differenza significativa tra i due gruppi ($P = 0.007$). Le differenze nella risposta insulinica postprandiale erano da ascrivere principalmente a quella osservata nella prima parte della curva. L'iAUC dell'insulina, fino al tempo 120 minuti, infatti, incrementava significativamente dopo la dieta multifattoriale (da 36340 ± 34954 a 44138 ± 31878 pmol/L/min; $P = 0.037$), mentre non variava dopo la Dieta MUFA (da 31754 ± 18446 a 26976 ± 12265 pmol/L/min; $P = 0.178$), con una differenza significativa tra i due gruppi ($P = 0.023$); al contrario, la risposta insulinica postprandiale, valutata come iAUC tra 120-240 minuti, non mostrava alcuna differenza tra i due gruppi (Figura 16, pannello B). Il rapporto tra iAUC insulina/iAUCglicemia invece, non si modificava sia nelle prime due ore successive al pasto test (0-120) sia nelle ultime due ore successive al pasto test (120-240) (Figura 16, pannello C).

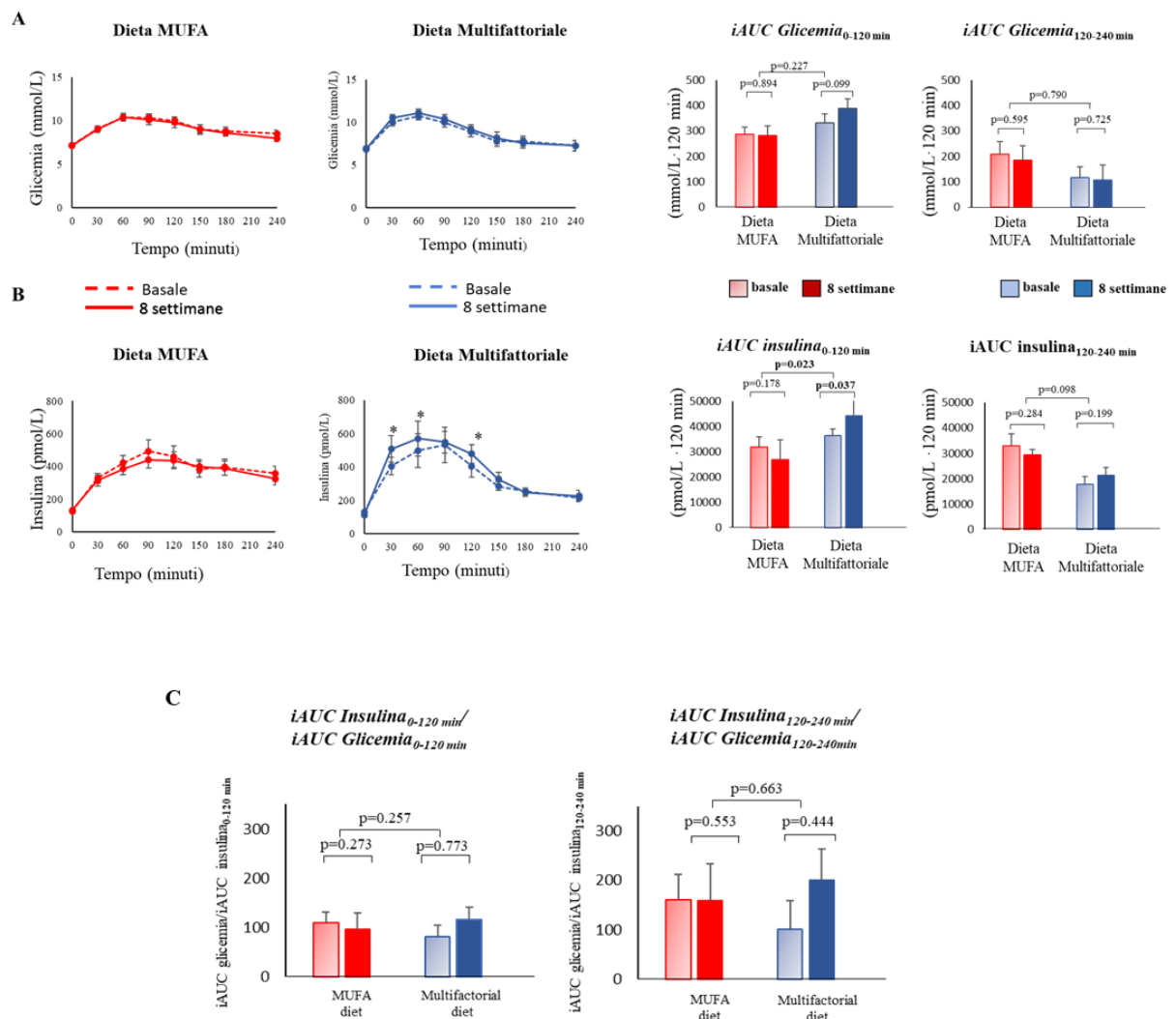


Figura 16: I dati sono espressi come Media $\pm$ SEM. Le risposte postprandiali glucidica (A) e insulinica (B) al pasto test e c) il rapporto iAUCInsulina/iAUCglicemia al basale e dopo 8 settimane d'intervento con la dieta multifattoriale sono state rappresentate come profilo (linea tratteggiata basale; linea continua 8 settimane) o come Area incrementale (iAUC). Le differenze all'interno del gruppo sono state valutate mediante t-test per campioni appaiati (* $p < 0.05$ vs basale; le differenze tra le variazioni indotte dalla dieta (8 settimane – basale) sono state valutate mediante t-test per campioni indipendenti. I dati sull'insulina erano disponibili per 35 partecipanti (n=18 nel gruppo MUFA; n=17 nel gruppo multifattoriale).

Le analisi di correlazioni erano eseguite raggruppando i due gruppi di partecipanti.

Le variazioni (8 settimane – basale) del contenuto di grasso pancreatico e della risposta postprandiale insulinica precoce (iAUC₀₋₁₂₀) erano inversamente correlate ($r = -0.383$; $P = 0.023$) (Figura 17), mentre nessuna correlazione era osservata con le variazioni della risposta postprandiale insulinica tardiva espressa come iAUC_{120-240 min} ($r = -0.189$; $p = 0.276$), dell'indice di lipogenesi ($r = 0.006$; $p = 0.973$), e del β -idrossibutirrato ($r = 0.239$; $P = 0.154$). Le variazioni nel contenuto di grasso pancreatico non correlavano con quelle del

grasso epatico ($r=0.163$; $P=0.309$). Le correlazioni nel contenuto di grasso epatico non si correlavano con la risposta insulinica precoce ($iAUC_{0-120}$) ($r= -0.174$; $P=0.309$), β -idrossibutirrato a digiuno ($r=0.101$; $p=0.550$), mentre correlava direttamente con l'indice di lipogenesi ($r=0.436$; $p=0.007$).

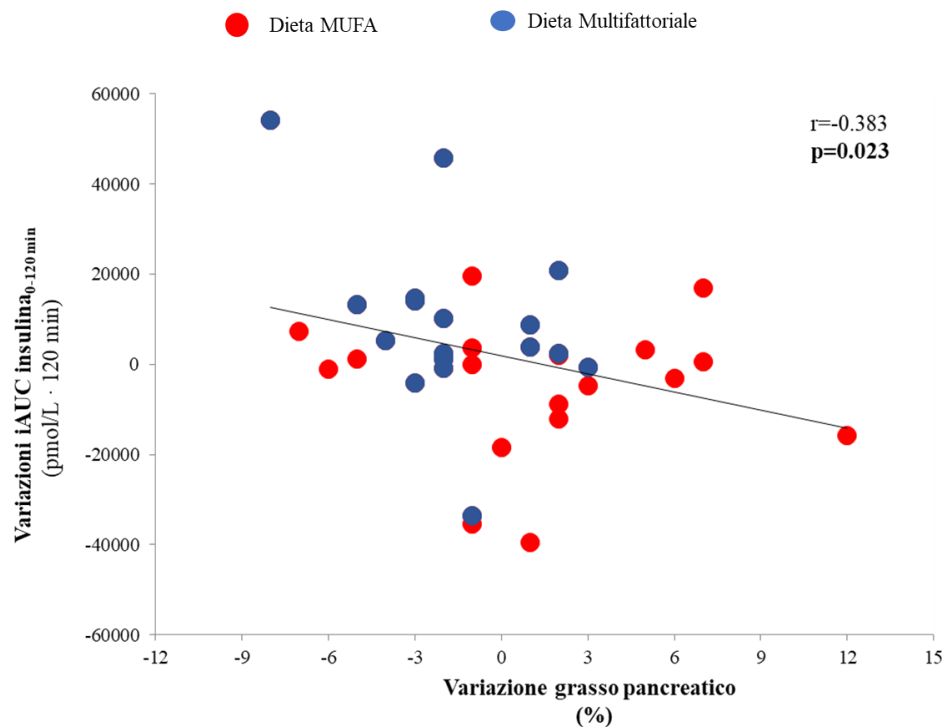


Figura 17: Correlazioni tra le variazioni (8 settimane – basale) del contenuto del grasso pancreatico e la risposta postprandiale insulinica precoce ($iAUC_{0-120}$) in tutti i partecipanti ($n=35$).

Discussione

In questo studio abbiamo mostrato che una dieta multifattoriale isocalorica, naturalmente ricca in differenti componenti benefiche, riduceva significativamente del ~20% il contenuto di grasso pancreatico in pazienti sovrappeso/obesi con diabete di tipo 2, indipendentemente alla perdita di peso, rispetto ad una dieta con contenuto simile in proteine, grassi e carboidrati ma differente per qualità di questi nutrienti. I nostri dati confermano ed estendono gli effetti benefici di questa dieta sull'accumulo di grasso ectopico, come già dimostrato per il fegato (Della Pepa et al., 2020); inoltre, il nostro studio ha dimostrato che la riduzione nel contenuto di grasso pancreatico è associato ad un incremento nella risposta insulinica postprandiale

nella fase postprandiale precoce, che è un marker di buona funzionalità β -cellulare. Questo gioca un ruolo importante nella regolazione dell'omeostasi glucidica, contribuendo a prevenire la deregolazione del controllo metabolico a lungo termine e ritardare l'insorgenza del diabete di tipo 2 in individui ad alto rischio (Galicia-Garcia U et al., 2020). A tal riguardo, una riduzione simile del grasso pancreatico era ottenuta dopo una sostanziale perdita di peso nel "DIRECT Study" ed era associata alla remissione del diabete (Lean ME et al., 2018).

Considerando l'aumento dell'interesse scientifico e clinico per quanto riguarda il grasso pancreatico, è necessario porre maggiore attenzione ai possibili trattamenti.

La perdita di peso, raggiunta attraverso diversi approcci, potrebbe rappresentare il principale target terapeutico per trattare il grasso pancreatico così come altri grassi ectopici (Gaesser GA et al., 2021). Sia la chirurgia bariatrica sia la sostanziale perdita di peso, eseguita attraverso l'intervento con diete fortemente ipocaloriche, sono associate con una riduzione del grasso pancreatico statisticamente significativa e clinicamente rilevante. La chirurgia bariatrica, con la conseguente perdita di peso, riduceva il contenuto di grasso pancreatico nei pazienti con il diabete di tipo 2, nel quale è stata riportata anche un miglioramento della secrezione precoce dell'insulina (Steven S et al., 2016; Gaborit B et al., 2015). In maniera simile, le diete ipocaloriche da sole (Jiang Y et al., 2019; Lim EL et al., 2011; Al-Mrabeh A et al., 2020; Rossi AP et al., 2012; Thomsen MN et al., 2022) o in combinazione con l'attività fisica (Gepner Y et al., 2018; Tene L et al., 2018; Heiskanen MA 2018) riducevano il contenuto di grasso pancreatico e miglioravano la funzionalità delle β -cellule (Lim EL et al., 2011; Heiskanen MA 2018). Il nostro studio indica che, oltre alla riduzione dell'assunzione calorica e alla perdita di peso, la composizione della dieta potrebbe avere un impatto sul contenuto del grasso pancreatico, così come mostrato anche sul grasso epatico. Precedenti studi hanno valutato gli effetti sul grasso pancreatico di diete ipocaloriche con differente composizione in macronutrienti, che mostravano anche una significativa e rilevante perdita

di peso. A questo riguardo, un recente trial ha mostrato che una dieta alta in proteine e bassa in carboidrati (rispettivamente, 30% carboidrati, 30% proteine e 40% grassi), riduceva il contenuto di grasso pancreatico meno rispetto alla dieta convenzionale in pazienti con il diabete, al contrario dei suoi effetti osservati sul grasso epatico (Thomsen MN et al., 2022). Questo risultato era ottenuto insieme ad una significativa perdita di peso (-5.8 kg) che era simile nella dieta test e nella dieta controllo, ma che probabilmente contribuiva agli effetti osservati. Il nostro studio, invece, dimostra chiaramente che la composizione della dieta di per sé è efficace nell'influenzare il contenuto di grasso pancreatico in quanto la riduzione di peso osservata con entrambe le diete era simile e minima quindi, di entità tale da non aver alcun effetto clinico e metabolico. Una riduzione del peso del 5-10% è necessaria per modificare in maniera significativa lo stato metabolico nelle persone con diabete o prediabete (Pi-Sunyer X, et al., 2007). Al meglio delle nostre conoscenze, l'unico studio che valutava gli effetti della composizione della dieta, indipendentemente dalle variazioni della perdita di peso, sul contenuto di grasso pancreatico in pazienti con diabete di tipo 2 mostrava che una dieta a basso contenuto di carboidrati e ad alto contenuto di proteine riduceva il contenuto di grasso pancreatico rispetto alla dieta convenzionale per il diabete (Skytte MJ et al., 2019). L'adesione a lungo termine ad una dieta a basso contenuto di carboidrati potrebbe essere difficile da mantenere e i risultati di questo studio potrebbero avere un'applicabilità limitata nella pratica clinica; al contrario, il nostro studio ha usato una dieta, che essendo multifattoriale, non richiede variazioni importanti nella quantità dei vari nutrienti. L'aumento nelle quantità di fibre, polifenoli e vitamine era ottenuto usando alimenti presenti ampiamente nella dieta abituale in ogni parte del mondo e, in particolar modo, tipici della dieta Mediterranea, un modello dietetico non solo salutare, ma anche gastronomicamente appetibile. I meccanismi mediante i quali la composizione della nostra dieta agisce sul contenuto del grasso pancreatico non sono chiari (Sakai NS et al., 2018). Sebbene ci si

potrebbe aspettare che gli stessi meccanismi che portano all'accumulo del grasso ectopico, soprattutto a livello del fegato, potrebbero agire sul pancreas, i meccanismi dell'accumulo di grasso pancreatico sembrano essere più complessi e parzialmente diversi da quello del grasso epatico (Costabile G et al., 2022). Nel nostro studio, attraverso l'uso degli indici indiretti, abbiamo valutato i due possibili meccanismi associati alla regolazione del grasso pancreatico (la DNL e l'ossidazione dei grassi). L'indice di lipogenesi si riduceva in maniera significativa con la dieta multifattoriale e questa riduzione era statisticamente associata alla riduzione di grasso epatico. Nessuna variazione è stata osservata per gli indici dell'ossidazione dei grassi. La mancata correlazione tra il grasso pancreatico e l'indice di lipogenesi suggerisce che differenti meccanismi potrebbero spiegare gli effetti dietetici sulla risposta epatica e pancreatica e che la DNL, rilevante per l'accumulo di grasso epatico, potrebbe non essere coinvolta nell'accumulo di grasso pancreatico. Considerando le molteplici caratteristiche della dieta multifattoriale, è probabile che la sua efficacia dipenda dalla sinergia delle varie componenti alimentari. Non sono presenti studi che hanno valutato i possibili meccanismi attraverso i quali le componenti dietetiche potrebbero impattare sul grasso pancreatico; possiamo ipotizzare che l'assunzione di polifenoli, altri antiossidanti, fibre e PUFA, potrebbero avere un ruolo poiché possono influenzare l'accumulo di grasso ectopico in altri distretti mediante differenti meccanismi, incluso modifiche del microbiota, infiammazione e stress ossidativo. La nostra dieta multifattoriale riusciva ad incrementare la risposta insulinica postprandiale precoce. La riduzione del grasso pancreatico e l'incremento della risposta insulinica postprandiale erano inversamente associate, supportando l'ipotesi di una relazione casuale. I possibili meccanismi mediante i quali la riduzione del grasso pancreatico potrebbe migliorare la risposta insulinica postprandiale sono ancora poco chiari. La riduzione del grasso intrapancreatico potrebbe aver modificato gli effetti dell'eccesso di tessuto adiposo nel pancreas. Gli adipociti all'interno del pancreas potrebbero condurre ad

un rilascio degli FFA con conseguente apoptosi delle β -cellule e riduzione della secrezione insulinica (Gerst F et al., 2019); inoltre, potrebbero favorire un ambiente infiammatorio e promuovere il rilascio di citochine, chemochine e altri metaboliti che potrebbero peggiorare la funzione β -cellulare per via paracrina (Wagner R et al., 2022). Sebbene gli adipociti intrapancreatici rappresentino la maggior parte del contenuto di grasso pancreatico (Wagner R et al., 2022), i possibili effetti dannosi sulla secrezione insulinica potrebbero dipendere dall'accumulo dei trigliceridi all'interno delle β -cellule. Questo potrebbe ridurre l'attività della glucocinasi, enzima coinvolto nella secrezione insulinica, come riportato in precedenti studi eseguiti in vitro e su modelli animali (Campbell JE et al., 2021). I punti di forza del nostro studio sono l'aderenza ottimale dei partecipanti alla dieta e il disegno randomizzato e controllato di sufficiente durata per valutare gli effetti dell'intervento nutrizionale sul contenuto di grasso pancreatico. Naturalmente, lo studio presenta delle limitazioni. Il primo include solo pazienti con diabete di tipo 2 con un buon compenso glicemico e, dunque, i risultati non possono essere generalizzati a pazienti con diverse forme della malattia o a quelli con prediabete e sindrome metaboliche. Un'altra limitazione del nostro studio è rappresentata dal fatto che la secrezione insulinica non è valutata con metodiche gold-standard, come il clamp euglicemico iperinsulinemico, e dalla mancata valutazione della secrezione pre-epatica, perché non disponibili le concentrazioni di C-peptide. Tuttavia, la risposta insulinica al test meal usato nel nostro trial è un approccio più rilevante da un punto di vista clinico e fisiologico.

Conclusione

In sintesi, noi abbiamo mostrato per la prima volta in questo studio che, una dieta isocalorica multifattoriale naturalmente ricca in differenti componenti alimentari benefiche, dimostratasi già essere efficace nella riduzione del grasso epatico, riesce, indipendentemente

dalle variazioni del peso corporeo, a ridurre il grasso pancreatico in pazienti sovrappeso/obesi con diabete di tipo 2. La riduzione nel grasso pancreatico è associata ad una riduzione della risposta postprandiale precoce, che nel lungo termine potrebbe contribuire a preservare il compenso glicemico, ritardando così l'insuccesso dei trattamenti ipoglicemicizzanti.

6. Considerazioni conclusive

Lo scopo della mia tesi di dottorato è stato quello di cercare di chiarire alcuni punti ancora non ben definiti nella relazione tra abitudini alimentari, microbiota intestinale, metabolismo glico-lipidico e grasso ectopico, quali:

- 1) eventuali differenze nella capacità fermentativa degli individui ad alto rischio cardiometabolico;
- 2) effetti di alimenti ricchi in fibre/amilosio e di diete a base di prodotti di origine vegetale sui livelli sierici di SCFA e il loro possibile ruolo nella regolazione del metabolismo glucidico;
- 3) ruolo della DNL nella riduzione del grasso epatico e pancreatico dopo specifici interventi nutrizionali.

Per quanto riguarda il primo punto, i risultati ottenuti nei pazienti con diabete dimostrano che le concentrazioni dell'acido acetico, propionico e butirrico sono ridotte rispetto a quelli dei soggetti sovrappeso/obesi non diabetici; tuttavia, solo la riduzione dell'acido propionico è associata al diabete di per sé, indipendentemente da altri fattori come l'età, la distribuzione del grasso, il colesterolo, i trigliceridi, la pressione arteriosa e il trattamento farmacologico. L'acido acetico e butirrico sono influenzati da altri fattori oltre che dal diabete. La riduzione dell'acido butirrico è associata all'età, indicando una riduzione della capacità fermentativa del microbiota intestinale con l'avanzare dell'età, mentre l'acido acetico è associato al colesterolo-LDL. Questi risultati sono importanti perché indicano chiaramente che la capacità fermentativa del microbiota intestinale è diversa a seconda della presenza o meno del diabete e di queste differenze si deve tener conto quando si valutano i risultati dei diversi studi presenti in letteratura.

In relazione al secondo punto è stato dimostrato che:

- 1) il consumo in acuto di pane ricco in amilosio è capace di migliorare in soggetti sovrappeso/obesi la risposta della glicemia e dell'insulina in fase postprandiale, aumentando allo stesso tempo i livelli postprandiali di acido propionico. Tale aumento è, inoltre, associato alla riduzione della risposta insulinica postprandiale suggerendo un possibile ruolo dell'acido propionico nel miglioramento della sensibilità insulinica in fase postprandiale;
- 2) una dieta ispirata al modello mediterraneo rispetto ad una dieta occidentale migliora, sia in acuto che in cronico, la risposta della glicemia e dell'insulina in fase postprandiale inducendo un miglioramento della sensibilità insulinica in questa fase. La Dieta Mediterranea determina un aumento dei batteri che fermentano le fibre con conseguente aumento, in particolare, dell'acido butirrico. Questo aumento si associa significativamente al miglioramento della sensibilità insulinica ottenuto in fase postprandiale con la dieta mediterranea, suggerendo che proprio la modifica della composizione del microbiota e l'aumento dell'acido butirrico giochino un ruolo fondamentale nel miglioramento del metabolismo glucidico in fase postprandiale.

I risultati di questi due studi pongono le basi per identificare alimenti funzionali e strategie nutrizionali da utilizzare nella prevenzione e nel trattamento del diabete di tipo 2 e delle malattie cardiovascolari.

Infine, per quanto riguarda il terzo punto, abbiamo visto che:

- 1) una dieta multifattoriale, con diverse componenti bioattive, ispirata ancora una volta ad un modello Mediterraneo, rispetto ad una dieta ricca in MUFA, anche essa già dimostratasi “salutare”, è capace di agire non solo sul metabolismo intermedio ma anche di ridurre significativamente sia il grasso epatico che il grasso pancreatico. In particolare, mentre la riduzione del grasso epatico sembra essere in relazione con la riduzione della DNL, valutata come rapporto acido palmitico/acido linoleico, questo

non avviene con la riduzione del grasso pancreatico, i cui meccanismi potrebbero essere diversi e devono essere ulteriormente indagati

Dal punto di vista clinico, questi ultimi due studi rafforzano la necessità di utilizzare le strategie nutrizionali idonee, basate sull'evidenze derivanti da studi d'intervento, per la prevenzione ed il trattamento non solo del diabete, ma anche della steatosi epatica e pancreatica.

7. BIBLIOGRAFIA

Ahmed B, Sultana R, Greene MW. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed Pharmacother* 2021;137:111315

Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Castro Cabezas M. Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atherosclerosis Suppl* 2008;9(2):39e44.

Al-Mrabeh A, Hollingsworth KG, Shaw JAM, et al. 2-year remission of type 2 diabetes and pancreas morphology: a post-hoc analysis of the DiRECTopen-label, cluster-randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8:939–948

Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jun;10(6):330-44.

Arterburn DE, Telem DA, Kushner RF, Courcoulas AP. Benefits and Risks of Bariatric Surgery in Adults: A Review. *JAMA*. 2020 Sep 1;324(9):879-887.

Augustin LSA, Kendall CWC, Jenkins DJA, Willett WC, Astrup A, Barclay AW, Björck I, Brand-Miller JC, Brighenti F, Buyken AE, Ceriello A, La Vecchia C, Livesey G, Liu S, Riccardi G, Rizkalla SW, Sievenpiper JL, Trichopoulou A, Wolever TMS, Baer-Sinnott S, Poli A. Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC). *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015 Sep;25(9):795-815.

Behall KM, Hallfrisch J. Plasma glucose and insulin reduction after consumption of breads varying in amylose content. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:913–20.

Belobrajdic DP, Regina A, Klingner B, Zajac I, Chapron S, Berbezy P, Bird AR. High-Amylose Wheat Lowers the Postprandial Glycemic Response to Bread in Healthy Adults: A Randomized Controlled Crossover Trial. *J Nutr* 2019;149:1335-1345.

Birt DF, Boylston T, Hendrich S, Jane JL, Hollis J, Li L, McClelland J, Moore S, Phillips GJ, Rowling M, Schalinske K, Scott MP, Whitley EM. Resistant starch: promise for improving human health. *Adv Nutr*. 2013 Nov 6;4(6):587-601.

Bjermo H, Iggman D, Kullberg J, Dahlman I, Johansson L, Persson L, Berglund J, Pulkki K, Basu S, Uusitupa M, Rudling M, Arner P, Cederholm T, Ahlström H, Risérus U. Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2012 May;95(5):1003-12

Blaak EE, Canfora EE, Theis S, Frost G, Groen AK, Mithieux G, Nauta A, Scott K, Stahl B, van Harselaar J, van Tol R, Vaughan EE, Verbeke K. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Benef Microbes*. 2020 Sep 1;11(5):411-455. doi: 10.3920/BM2020.0057

Bodinham CL, Al-Mana NM, Smith L, Robertson MD. Endogenous plasma glucagon-like peptide-1 following acute dietary fibre consumption. *Br J Nutr* 2013;110:1429-33

Bonaccio M, Di Castelnuovo A, Costanzo S, Gialluisi A, Persichillo M, Cerletti C, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L. Mediterranean diet and mortality in the elderly: a prospective cohort study and a meta-analysis. *Br J Nutr*. 2018 Oct;120(8):841-854.

Bozzetto L, Annuzzi G, Ragucci M, Di Donato O, Della Pepa G, Della Corte G, Griffo E, Anniballi G, Giacco A, Mancini M, Rivellese AA. Insulin resistance, postprandial GLP-1 and adaptive immunity are the main predictors of NAFLD in a homogeneous population at high cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016 Jul;26(7):623-629.

Bozzetto L, Costabile G, Luongo D, Naviglio D, Cicala V, Piantadosi C, Patti L, Cipriano P, Annuzzi G, Rivellese AA. Reduction in liver fat by dietary MUFA in type 2 diabetes is helped by enhanced hepatic fat oxidation. *Diabetologia*. 2016 Dec;59(12):2697-2701.

Bozzetto L, Prinster A, Annuzzi G, Costagliola L, Mangione A, Vitelli A, Mazzarella R, Longobardo M, Mancini M, Vigorito C, Riccardi G, Rivellese AA. Liver fat is reduced by an isoenergetic MUFA diet in a controlled randomized study in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2012 Jul;35(7):1429-35.

Brahe L. K, A. Astrup A and L. H. Larsen L. H. Is butyrate the link between diet, intestinal microbiota and obesity-related metabolic diseases? *Obesity Reviews* 2013; 14:950–959.

Brooks L, Viardot A, Tsakmaki A, Stolarczyk E, Howard JK, Cani PD, Everard A, Sleeth ML, Psichas A, Anastasovskaj J, Bell JD, Bell-Anderson K, Mackay CR, Ghatei MA, Bloom SR, Frost G, Bewick GA. Fermentable carbohydrate stimulates FFAR2-dependent colonic PYY cell expansion to increase satiety. *Mol Metab*. 2016 Nov 4;6(1):48-60.

Bugianesi, E.; Gastaldelli, A.; Vanni, E.; Gambino, R.; Cassader, M.; Baldi, S.; Ponti, V.; Pagano, G.; Ferrannini, E.; Rizzetto, M.
Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: Sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005, 48, 634–642.

Bui TP, Shetty SA, Lagkouvardos I, Ritari J, Chamlagain B, Douillard FP, et al. Comparative genomics and physiology of the butyrate-producing bacterium *Intestinimonas butyriciproducens*. *Environ Microbiol Rep* 2016;8(6):1024e37.

Burdge GC, Wright P, Jones AE, Wootton SA. A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction. *Br J Nutr*. 2000 Nov;84(5):781-7.

Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, Torres TP, Byndloss AJ, Faber F, Gao Y, Litvak Y, Lopez CA, Xu G, Napoli E, Giulivi C, Tsois RM, Revzin A, Lebrilla CB, Bäumlér AJ. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science*. 2017 Aug 11;357(6351):570-575. 49.

Byrne CS, Chambers ES, Preston T, Tedford C, Brignardello J, Garcia-Perez I, Holmes E, Wallis GA, Morrison DJ, Frost GS. Effects of Inulin Propionate Ester Incorporated into Palatable Food Products on Appetite and Resting Energy Expenditure: A Randomised Crossover Study. *Nutrients*. 2019 Apr 16;11(4):861.

Cai M, Dou B, Pugh JE, Lett AM, Frost GS. The impact of starchy food structure on postprandial glycemic response and appetite: a systematic review with meta-analysis of randomized crossover trials. *Am J Clin Nutr* 2021;114(2):472-487.

Campbell JE, Newgard CB. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Feb;22(2):142-158.

Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Oct;11(10):577-91.

Cani PD, de Vos WM. Next-generation beneficial microbes: the case of. *Front Microbiol* 2017;8:1765.

Carnevale R, Loffredo L, Del Ben M, Angelico F, Nocella C, Petruccioli A, Bartimoccia S, Monticolo R, Cava E, Violi F. Extra virgin olive oil improves post-prandial glycemic and lipid profile in patients with impaired fasting glucose. *Clin Nutr*. 2017 Jun;36(3):782-787.

Chambers ES, Byrne CS, Morrison DJ, Murphy KG, Preston T, Tedford C, Garcia-Perez I, Fountana S, Serrano-Contreras JI, Holmes E, Reynolds CJ, Roberts JF, Boyton RJ, Altmann DM, McDonald JAK, Marchesi JR, Akbar AN, Riddell NE, Wallis GA, Frost GS. Dietary supplementation with inulin-propionate ester or inulin improves insulin sensitivity in adults with overweight and obesity with distinct effects on the gut microbiota, plasma metabolome and systemic inflammatory responses: a randomised cross-over trial. *Gut*. 2019 Aug;68(8):1430-1438.

Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SE, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, Blundell JE, Bell JD, Thomas EL, Mt-Isa S, Ashby D, Gibson GR, Kolida S, Dhillon WS, Bloom SR, Morley W, Clegg S, Frost G. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*. 2015 Nov;64(11):1744-54. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307913

Charidemou E, Ashmore T, Li X, McNally BD, West JA, Liggi S, Harvey M, Orford E, Griffin JL. A randomized 3-way crossover study indicates that high-protein feeding induces de novo lipogenesis in healthy humans. *JCI Insight*. 2019 May 30;4(12):e124819.

Chong MF, Fielding BA, Frayn KN. Metabolic interaction of dietary sugars and plasma lipids with a focus on mechanisms and de novo lipogenesis. *Proc Nutr Soc*. 2007 Feb;66(1):52-9.

Chong MF, Hodson L, Bickerton AS, Roberts R, Neville M, Karpe F, Frayn KN, Fielding BA. Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding. *Am J Clin Nutr*. 2008 Apr;87(4):817-23.

Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, Bailey CJ, Ceriello A, Delgado V, Federici M, Filippatos G, Grobbee DE, Hansen TB, et al; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J*. 2020;41:255-323.

Costabile G, Della Pepa G, Salamone D, Luongo D, Naviglio D, Brancato V, Cavaliere C, Salvatore M, Cipriano P, Vitale M, Corrado A, Rivellese AA, Annuzzi G, Bozzetto L.

Reduction of De Novo Lipogenesis Mediates Beneficial Effects of Isoenergetic Diets on Fatty Liver: Mechanistic Insights from the MEDEA Randomized Clinical Trial. *Nutrients*. 2022 May 23;14(10):2178.

Croci, I.; Byrne, N.M.; Choquette, S.; Hills, A.P.; Chachay, V.S.; Clouston, A.D.; O'Moore-Sullivan, T.M.; Macdonald, G.A.; Prins, J.B.; Hickman, I.J. Whole-body substrate metabolism is associated with disease severity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2013, 62, 1625–1633.

Dainty SA, Klingel SL, Pilkey SE, McDonald E, McKeown B, Emes MJ, Duncan AM. Resistant Starch Bagels Reduce Fasting and Postprandial Insulin in Adults at Risk of Type 2 Diabetes. *J Nutr* 2016;146:2252-2259.

D'Alessandro A, De Pergola G. The Mediterranean Diet: its definition and evaluation of a priori dietary indexes in primary cardiovascular prevention. *Int J Food Sci Nutr*. 2018 Sep;69(6):647-659.

Damiot A, Demangel R, Noone J, Chery I, Zahariev A, Normand S, Brioché T, Crampes F, de Glisezinski I, Lefai E, Bareille MP, Chopard A, Draï J, Collin-Chavagnac D, Heer M, Gauquelin-Koch G, Prost M, Simon P, Py G, Blanc S, Simon C, Bergouignan A, O'Gorman DJ. A nutrient cocktail prevents lipid metabolism alterations induced by 20 days of daily steps reduction and fructose overfeeding: result from a randomized study. *J Appl Physiol* (1985). 2019 Jan 1;126(1):88-101.

David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan 23;505(7484):559-63.

Davidson, M.H. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am. J. Cardiol*. 2006, 98, 27i–33i.

De Filippis F, Paparo L, Nocerino R, Della Gatta G, Carucci L, Russo R, Pasolli E, Ercolini D, Berni Canani R. Specific gut microbiome signatures and the associated pro-inflammatory functions are linked to pediatric allergy and acquisition of immune tolerance. *Nat Commun*. 2021;12:5958.

De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Stora A, Laghi L, Serrazanetti DI, Di Cagno R, Ferrocino I, Lazzi C, Turroni S, Cocolin L, Brigidi P, Neviani E, Gobbetti M, O'Toole PW, Ercolini D. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*. 2016 Nov;65(11):1812-1821.

De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14691-6.

Defoort C, Vincent-Baudry S, Lairon D. Effects of 3-month Mediterranean-type diet on postprandial TAG and apolipoprotein B48 in the Medi-RIVAGE cohort. *Publ Health Nutr* 2011;14(12A):2302e8.

Della Pepa G, Vetrani C, Brancato V, Vitale M, Monti S, Annuzzi G, Lombardi G, Izzo A, Tommasone M, Cipriano P, Clemente G, Mirabelli P, Mancini M, Salvatore M, Riccardi G, Rivellese AA, Bozzetto L. Effects of a multifactorial ecosustainable isocaloric diet on liver fat in patients with type 2 diabetes: randomized clinical trial. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020 May;8(1):e001342.

Della Pepa G, Vetrani C, Lombardi G, Bozzetto L, Annuzzi G, Rivellese AA. Isocaloric Dietary Changes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High Cardiometabolic Risk Individuals. *Nutrients*. 2017 Sep 26;9(10):1065.

Della Pepa G, Vetrani C, Lupoli R, Massimino E, Lembo E, Riccardi G, Capaldo B. Uncooked cornstarch for the prevention of hypoglycemic events. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022;62:3250-3263.

Demigné C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Rémésy C. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr*. 1995 Aug;74(2):209-19.

Despres J, Forano E, Lepercq P, Comtet-Marre S, Jubelin G, Chambon C, Yeoman CJ, Berg Miller ME, Fields CJ, Martens E, Terrapon N, Henrissat B, White BA, Mosoni P. Xylan degradation by the human gut *Bacteroides xylanisolvens* XB1A(T) involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level. *BMC Genomics*. 2016 May 4;17:326 .

Despres JP. Visceral obesity with excess ectopic fat: a prevalent and high-risk condition requiring concerted clinical and public health actions. *Cardiometab Syndr J*. 2021;1:1–17

Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 2021 Jan 19;13(1):273.

Dinu M, Pagliai G, Casini A, Sofi F. Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *Eur J Clin Nutr* 2018;72(1):30e43.

Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*. 2003 Nov;29(5):478-85.

Doblado-Maldonado AF, Gomand SV, Goderis B, Delcour JA. Methodologies for producing amylose: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57:407-417.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1343-51.

El Hage R, Hernandez-Sanabria E, Calatayud Arroyo M, Van de Wiele T. Supplementation of a propionate-producing consortium improves markers of insulin resistance in an in vitro model of gut-liver axis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2020;318:E742-E749.

Eleftheriou D, Benetou V, Trichopoulou A, La Vecchia C, Bamia C. Mediterranean diet and its components in relation to all-cause mortality: meta-analysis. *Br J Nutr* 2018;120(10):1081e97.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Fitó M, Gea A, Hernán MA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med*. 2018 Jun 21;378(25):e34.

Evans S, Royston P, Day S. Minim: allocation by minimisation in clinical trials. <http://www-users.york.ac.uk/~mb55/guide/minim.htm>.

Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):424-31.

Ferrara D, Montecucco F, Dallegri F, Carbone F. Impact of different ectopic fat depots on cardiovascular and metabolic diseases. *J Cell Physiol* 2019;234:21630–21641

Flint HJ, Scott KP, Louis P et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9(10):577–589.

Franzosa EA, Sirota-Madi A, Avila-Pacheco J, Fornelos N, Haiser HJ, Reinker S, et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol* 2019;4(2):293e305.

Fridén, M.; Rosqvist, F.; Kullberg, J.; Ahlström, H.; Lind, L.; Risérus, U. Associations between fatty acid composition in serum cholesteryl esters and liver fat, basal fat oxidation, and resting energy expenditure: A population-based study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2021, 114, 1743–1751.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18(6):499e502.

Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, Anastasovska J, Ghourab S, Hankir M, Zhang S, Carling D, Swann JR, Gibson G, Viardot A, Morrison D, Louise Thomas E, Bell JD. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*. 2014 Apr 29;5:3611.

Gaborit B, Abdesselam I, Kober F, Jacquier A, Ronsin O, Emungania O, Lesavre N, Alessi MC, Martin JC, Bernard M, Dutour A. Ectopic fat storage in the pancreas using 1H-MRS: importance of diabetic status and modulation with bariatric surgery-induced weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2015 Mar;39(3):480-7.

Gaesser GA, Angadi SS. Obesity treatment: weight loss versus increasing fitness and physical activity for reducing health risks. *iScience* 2021;24:102995.

Galbete C, Schwingshackl L, Schwedhelm C, Boeing H, Schulze MB. Evaluating Mediterranean diet and risk of chronic disease in cohort studies: an umbrella review of meta-analyses. *Eur J Epidemiol*. 2018 Oct;33(10):909-931.

Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 30;21(17):6275.

Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, Cefalu WT, Ye J. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1509-17.

Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Front Microbiol*. 2018 May 7;9:890.

Geidl-Flueck B, Hochuli M, Németh Á, Eberl A, Derron N, Köfeler HC, Tappy L, Berneis K, Spinass GA, Gerber PA. Fructose- and sucrose- but not glucose-sweetened beverages promote hepatic de novo lipogenesis: A randomized controlled trial. *J Hepatol*. 2021 Jul;75(1):46-54.

Gepner Y, Shelef I, Schwarzfuchs D, Zelicha H, Tene L, Yaskolka Meir A, Tsaban G, Cohen N, Bril N, Rein M, Serfaty D, Kenigsbuch S, Komy O, Wolak A, Chassidim Y, Golan R, Avni-Hassid H, Bilitzky A, Sarusi B, Goshen E, Shemesh E, Henkin Y, Stumvoll M, Blüher M, Thiery J, Ceglarek U, Rudich A, Stampfer MJ, Shai I. Effect of Distinct Lifestyle Interventions on Mobilization of Fat Storage Pools: CENTRAL Magnetic Resonance Imaging Randomized Controlled Trial. *Circulation*. 2018 Mar 13;137(11):1143-1157.

Gerst F, Wagner R, Oquendo MB, Siegel-Axel D, Fritsche A, Heni M, Staiger H, Häring HU, Ullrich S. What role do fat cells play in pancreatic tissue? *Mol Metab*. 2019 Jul;25:1-10.

Giacco R, Costabile G, Della Pepa G, Anniballi G, Griffio E, Mangione A, Cipriano P, Viscovo D, Clemente G, Landberg R, Pacini G, Rivellese AA, Riccardi G. A whole-grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 Aug;24(8):837-44.

Giacco R, Costabile G, Riccardi G. Metabolic effects of dietary carbohydrates: The importance of food digestion. *Food Research International* 2016;8: 336-341. 10.1016/j.foodres.2015.10.026.

Gnagnarella P, Salvini S, Parpinel M. Food composition database for epidemiological studies in Italy. Version 1.2015 Website, <http://www.bda-ieo.it/>.

Gondalia SV, Wymond B, Benassi-Evans B, Berbezy P, Bird AR, Belobrajdic DP. Substitution of Refined Conventional Wheat Flour with Wheat High in Resistant Starch Modulates the Intestinal Microbiota and Fecal Metabolites in Healthy Adults: A Randomized, Controlled Trial. *J Nutr* 2022;152:1426-1437.

Green CJ, Pramfalk C, Charlton CA, Gunn PJ, Cornfield T, Pavlides M, Karpe F, Hodson L. Hepatic de novo lipogenesis is suppressed and fat oxidation is increased by omega-3 fatty

acids at the expense of glucose metabolism. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020 Mar;8(1):e000871.

Grimm I, Vollmer T. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* pathogenesis: current state of play. *Future Microbiol* 2018;13:731e5.

Gupta A, Dhakan DB, Maji A, Saxena R, P K VP, Mahajan S, Pulikkan J, Kurian J, Gomez AM, Scaria J, Amato KR, Sharma AK, Sharma VK. Association of *Flavonifractor plautii*, a Flavonoid-Degrading Bacterium, with the Gut Microbiome of Colorectal Cancer Patients in India. *mSystems*. 2019 Nov 12;4(6):e00438-19.

Gutiérrez-Díaz I, Fernández-Navarro T, Sánchez B, Margolles A, González S. Mediterranean diet and faecal microbiota: a transversal study. *Food Funct*. 2016 May 18;7(5):2347-56.

Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:181-205

Hald S, Schioldan AG, Moore ME, Dige A, Lærke HN, Agnholt J, Bach Knudsen KE, Hermansen K, Marco ML, Gregersen S, Dahlerup JF. Effects of Arabinoxylan and Resistant Starch on Intestinal Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Subjects with Metabolic Syndrome: A Randomised Crossover Study. *PLoS One*. 2016 Jul 19;11(7):e0159223.

Hallström E, Sestili F, Lafiandra D, Björck I, Ostman E A novel wheat variety with elevated content of amylose increases resistant starch formation and may beneficially influence glycaemia in healthy subjects. *Food Nutr Res* 2011; 55.

Haro C, Montes-Borrego M, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Quintana-Navarro GM, Tinahones FJ, Landa BB, López-Miranda J, Camargo A, Pérez-Jiménez F. Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Jan;101(1):233-42.

He J, Zhang P, Shen L, Niu L, Tan Y, Chen L, Zhao Y, Bai L, Hao X, Li X, Zhang S, Zhu L. Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 2;21(17):6356. doi: 10.3390/ijms21176356.

Heiskanen MA, Motiani KK, Mari A, Saunavaara V, Eskelinen JJ, Virtanen KA, Koivumäki M, Löyttyniemi E, Nuutila P, Kalliokoski KK, Hannukainen JC. Exercise training decreases pancreatic fat content and improves beta cell function regardless of baseline glucose tolerance: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2018 Aug;61(8):1817-1828.

Hellerstein MK. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr*. 1999 Apr;53 Suppl 1:S53-65

Heni M, Machann J, Staiger H, Schwenzer NF, Peter A, Schick F, Claussen CD, Stefan N, Häring HU, Fritsche A. Pancreatic fat is negatively associated with insulin secretion in individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance: a nuclear magnetic resonance study. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010 Mar;26(3):200-5.

Hernández MAG, Canfora EE, Jocken JWE, Blaak EE. The Short-Chain Fatty Acid Acetate in Body Weight Control and Insulin Sensitivity. *Nutrients*. 2019 Aug 18;11(8):1943. doi: 10.3390/nu11081943.

Higgins JA, Higbee DR, Donahoo WT, Brown IL, Bell ML, Bessesen DH. Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. *Nutr Metab* 2004;1:8.

Hodson, L.; Fielding, B.A. Stearoyl-CoA desaturase: Rogue or innocent bystander? *Prog. Lipid Res.* 2013, 52, 15–42.

Hodson L, Rosqvist F, Parry SA. The influence of dietary fatty acids on liver fat content and metabolism. *Proc Nutr Soc.* 2020 Feb;79(1):30-41. doi: 10.1017/S0029665119000569. Epub 2019 Apr 3

Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res.* 2008 Sep;47(5):348-80. doi: 10.1016/j.plipres.2008.03.003. Epub 2008 Apr 4.

Holscher H D, Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* 2017; 8:172–184

Horii T, Fujita Y, Ishibashi C, Fukui K, Eguchi H, Kozawa J, Shimomura I. Islet inflammation is associated with pancreatic fatty infiltration and hyperglycemia in type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2020 Aug;8(1):e001508.

Hudgins LC, Hellerstein M, Seidman C, Neese R, Diakun J, Hirsch J. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J Clin Invest.* 1996 May 1;97(9):2081-91.

Hudgins LC, Seidman CE, Diakun J, Hirsch J. Human fatty acid synthesis is reduced after the substitution of dietary starch for sugar. *Am J Clin Nutr.* 1998 Apr;67(4):631-9.

Inaishi J, Saisho Y. Beta-Cell Mass in Obesity and Type 2 Diabetes, and Its Relation to Pancreas Fat: A Mini-Review. *Nutrients*. 2020 Dec 16;12(12):3846.

Ishibashi C, Kozawa J, Fujita Y, Yoneda S, Uno S, Kimura T, Fukui K, Nojima S, Morii E, Eguchi H, Iwahashi H, Imagawa A, Shimomura I. Glucose Intolerance After Pancreatectomy Was Associated With Preoperative Hemoglobin A1c, Insulin Resistance, and Histological Pancreatic Fatty Infiltration. *Pancreas.* 2018 Sep;47(8):e48-e50.

Ishibashi C, Kozawa J, Hosakawa Y, Yoneda S, Kimura T, Fujita Y, Fukui K, Iwahashi H, Shimomura I. Pancreatic fat is related to the longitudinal decrease in the increment of C-peptide in glucagon stimulation test in type 2 diabetes patients. *J Diabetes Investig.* 2020 Jan;11(1):80-87. doi: 10.1111/jdi.13108. Epub 2019 Jul 27.

Jiang L, Wang J, Liu Z, Jiang A, Li S, Wu D, Zhang Y, Zhu X, Zhou E, Wei Z, Yang Z. Sodium Butyrate Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses by Down-Regulation of NF- κ B, NLRP3 Signaling Pathway, and Activating Histone Acetylation in Bovine Macrophages. *Front Vet Sci.* 2020 Nov 5;7:579674.

Jiang Y, Spurny M, Schübel R, Nonnenmacher T, Schlett CL, von Stackelberg O, Ulrich CM, Kaaks R, Kauczor HU, Kühn T, Nattenmüller J. Changes in Pancreatic Fat Content Following Diet-Induced Weight Loss. *Nutrients*. 2019 Apr 23;11(4):912.

Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013 Jun 6;498(7452):99-103.

Kespohl M, Vachharajani N, Luu M, Harb H, Pautz S, Wolff S, Sillner N, Walker A, Schmitt-Kopplin P, Boettger T, Renz H, Offermanns S, Steinhoff U, Visekruna A. The Microbial Metabolite Butyrate Induces Expression of Th1-Associated Factors in CD4⁺ T Cells. *Front Immunol*. 2017 Aug 28;8:1036.

Kodama S, Saito K, Tanaka S, Horikawa C, Fujiwara K, Hirasawa R, Yachi Y, Sone Y, Tada Iida K, Shimano H, et al. Fasting and post-challenge glucose as quantitative cardiovascular risk factors: a meta-analysis. *J Atheroscler Thromb* 2012;19:385-96.

Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P and Backhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 2016; 165:1332-1345.

Konrad, S.D.; Cook, S.L.; Goh, Y.K.; French, M.A.; Clandinin, M.T. Use of deuterium oxide to measure de novo fatty acid synthesis in normal subjects consuming different dietary fatty acid composition¹. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1393, 143–152.

Kotronen A, Seppänen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepää AL, Oresic M, Yki-Järvinen H. Hepatic stearyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes*. 2009 Jan;58(1):203-8

Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, Hallen A, Martens E, Björck I, Bäckhed F. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab*. 2015 Dec 1;22(6):971-82.

Kreznar et al 2015 Kreznar JH, Keller MP, Traeger LL et al. Host genotype and gut microbiome modulate insulin secretion and diet-induced metabolic phenotypes. *Cell Rep* 2017; 18(7):1739–1750

Lambert, J.E.; Ramos-Roman, M.A.; Browning, J.D.; Parks, E.J. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2014, 146, 726–735.

Lean ME, Leslie WS, Barnes AC, Brosnahan N, Thom G, McCombie L, Peters C, Zhyzhneuskaya S, Al-Mrabeh A, Hollingsworth KG, Rodrigues AM, Rehackova L, Adamson AJ, Sniehotta FF, Mathers JC, Ross HM, McIlvenna Y, Stefanetti R, Trenell M, Welsh P, Kean S, Ford I, McConnachie A, Sattar N, Taylor R. Primary care-led weight management for remission of type 2 diabetes (DiRECT): an open-label, cluster-randomised trial. *Lancet*. 2018 Feb 10;391(10120):541-551.

Lee JJ, Lambert JE, Hovhannisyan Y, Ramos-Roman MA, Trombold JR, Wagner DA, Parks EJ. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2015 Jan;101(1):34-43.

Lee WN, Lim S, Bassilian S, Bergner EA, Edmond J. Fatty acid cycling in human hepatoma cells and the effects of troglitazone. *J Biol Chem*. 1998 Aug 14;273(33):20929-34.

Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P et al. Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* 2005; 102(31):1070–11075.

Lim EL, Hollingsworth KG, Aribisala BS, Chen MJ, Mathers JC, Taylor R. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia* 2011;54:2506–2514

Lin X, Xu Y, Pan X, Xu J, Ding Y, Sun X, Song X, Ren Y, Shan PF. Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Sci Rep* 2020;10:14790.

Liu L, Villavicencio F, Yeung D, Perin J, Lopez G, Strong KL, Black RE. National, regional, and global causes of mortality in 5-19-year-olds from 2000 to 2019: a systematic analysis. *Lancet Glob Health* 2022;10:e337-e347.

Liu R, Hong J, Xu X, Feng Q, Zhang D, Gu Y, Shi J, Zhao S, Liu W, Wang X, Xia H, Liu Z, Cui B, Liang P, Xi L, Jin J, Ying X, Wang X, Zhao X, Li W, Jia H, Lan Z, Li F, Wang R, Sun Y, Yang M, Shen Y, Jie Z, Li J, Chen X, Zhong H, Xie H, Zhang Y, Gu W, Deng X, Shen B, Xu X, Yang H, Xu G, Bi Y, Lai S, Wang J, Qi L, Madsen L, Wang J, Ning G, Kristiansen K, Wang W. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med*. 2017 Jul;23(7):859-868.

Liu T, Li J, Liu Y, Xiao N, Suo H, Xie K, Yang C, Wu C. Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B pathway in RAW264.7 cells. *Inflammation*. 2012 Oct;35(5):1676-84.

Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW, et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature* 2019 ;569(7758): 655e62

Look AHEAD Research Group; Pi-Sunyer X, Blackburn G, Brancati FL, Bray GA, Bright R, Clark JM, Curtis JM, Espeland MA, Foreyt JP, Graves K, Haffner SM, Harrison B, Hill JO, Horton ES, Jakicic J, Jeffery RW, Johnson KC, Kahn S, Kelley DE, Kitabchi AE, Knowler WC, Lewis CE, Maschak-Carey BJ, Montgomery B, Nathan DM, Patricio J, Peters A, Redmon JB, Reeves RS, Ryan DH, Safford M, Van Dorsten B, Wadden TA, Wagenknecht L, Wesche-Thobaben J, Wing RR, Yanovski SZ. Reduction in weight and cardiovascular disease risk factors in individuals with type 2 diabetes: one-year results of the look AHEAD trial. *Diabetes Care*. 2007 Jun;30(6):1374-83.

Lovegrove A, Edwards CH, De Noni I, Patel H, El SN, Grassby T, Zielke C, Ulmius M, Nilsson L, Butterworth PJ, Ellis PR, Shewry PR. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 Jan 22;57(2):237-253

Lu Q, Tian X, Wu H, Huang J, Li M, Mei Z, Zhou L, Xie H, Zheng S. Metabolic Changes of Hepatocytes in NAFLD. *Front Physiol.* 2021 Aug 30;12:710420.

Luo J, Rizkalla SW, Alamowitch C, Boussairi A, Blayo A, Barry JL, Laffitte A, Guyon F, Bornet FR, Slama G. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. *Am J Clin Nutr* 1996;63:939-45.

Luukkonen PK, Qadri S, Ahlholm N, Porthan K, Männistö V, Sammalkorpi H, Penttilä AK, Hakkarainen A, Lehtimäki TE, Gaggini M, Gastaldelli A, Ala-Korpela M, Orho-Melander M, Arola J, Juuti A, Pihlajamäki J, Hodson L, Yki-Järvinen H. Distinct contributions of metabolic dysfunction and genetic risk factors in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2022 Mar;76(3):526-535. doi: 10.1016/j.jhep.2021.10.013.

Luukkonen PK, Sädevirta S, Zhou Y, Kayser B, Ali A, Ahonen L, Lallukka S, Pelloux V, Gaggini M, Jian C, Hakkarainen A, Lundbom N, Gylling H, Salonen A, Orešič M, Hyötyläinen T, Orho-Melander M, Rissanen A, Gastaldelli A, Clément K, Hodson L, Yki-Järvinen H. Saturated Fat Is More Metabolically Harmful for the Human Liver Than Unsaturated Fat or Simple Sugars. *Diabetes Care.* 2018 Aug;41(8):1732-1739.

Lynch S.V and Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *The New England Journal of Medicine* 2016; 375:2369-79.

Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Van Immerseel F, Verbeke K, Ferrante M, Verhaegen J, Rutgeerts P, Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014 Aug;63(8):1275-83.

Makki K, Deehan E.C, Walter J and Backhed F. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host & Microbe* 2018; 705-715.

Mardinoglu A, Wu H, Bjornson E, Zhang C, Hakkarainen A, Räsänen SM, Lee S, Mancina RM, Bergentall M, Pietiläinen KH, Söderlund S, Matikainen N, Ståhlman M, Bergh PO, Adiels M, Piening BD, Granér M, Lundbom N, Williams KJ, Romeo S, Nielsen J, Snyder M, Uhlén M, Bergström G, Perkins R, Marschall HU, Bäckhed F, Taskinen MR, Borén J. An Integrated Understanding of the Rapid Metabolic Benefits of a Carbohydrate-Restricted Diet on Hepatic Steatosis in Humans. *Cell Metab.* 2018 Mar 6;27(3):559-571.e5.

Marin-Alejandro BA, Cantero I, Perez-Diaz-Del-Campo N, Monreal JI, Elorz M, Herrero JI, Benito-Boillos A, Quiroga J, Martinez-Echeverria A, Uriz-Otano JI, Huarte-Muniesa MP, Tur JA, Martinez JA, Abete I, Zulet MA. Effects of two personalized dietary strategies during a 2-year intervention in subjects with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized trial. *Liver Int.* 2021 Jul;41(7):1532-1544

Marizzoni M, Cattaneo A, Mirabelli P, Festari C, Lopizzo N, Nicolosi V, Mombelli E, Mazzelli M, Luongo D, Naviglio D, Coppola L, Salvatore M, Frisoni GB. Short-Chain Fatty Acids and Lipopolysaccharide as Mediators Between Gut Dysbiosis and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2020;78(2):683-697

Martínez-Gonzalez M, Ruiz-Canela M, Hruby A, Liang L, Trichopoulou A, Hu FB. Intervention trials with the Mediterranean diet in cardiovascular prevention: understanding potential mechanisms through metabolomic profiling. *J Nutr* 2015;146(4):913Se9S.

Martínez-González MA, de la Fuente-Arrillaga C, Nunez-Cordoba JM, Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Vazquez Z, Benito S, Tortosa A, Bes-Rastrollo M. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. *BMJ*. 2008 Jun 14;336(7657):1348-51.

Mattace Raso G, Simeoli R, Russo R, Iacono A, Santoro A, Paciello O, Ferrante MC, Canani RB, Calignano A, Meli R. Effects of sodium butyrate and its synthetic amide derivative on liver inflammation and glucose tolerance in an animal model of steatosis induced by high fat diet. *PLoS One*. 2013 Jul 5;8(7):e68626

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.

McMurdie PJ, Stoeva MK, Justice N, Nemchek M, Sieber CMK, Tyagi S, Gines J, Skennerton CT, Souza M, Kolterman O, Eid J. Increased circulating butyrate and ursodeoxycholate during probiotic intervention in humans with type 2 diabetes. *BMC Microbiol*. 2022 Jan 8;22(1):19.

McNabney S. M and M. Henagan T.M. Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance; *Nutrients* 2017; 9, 1348

Mekki N, Dubois C, Charbonnier M, Cara L, Senft M, Pauli AM, Portugal H, Gassin AL, Lafont H, Lairon D. Effects of lowering fat and increasing dietary fiber on fasting and postprandial plasma lipids in hypercholesterolemic subjects consuming a mixed Mediterranean-Western diet. *Am J Clin Nutr*. 1997 Dec;66(6):1443-51.

Meslier V, Laiola M, Roager HM, De Filippis F, Roume H, Quinquis B, Giacco R, Mennella I, Ferracane R, Pons N, Pasolli E, Rivellese A, Dragsted LO, Vitaglione P, Ehrlich SD, Ercolini D. Mediterranean diet intervention in overweight and obese subjects lowers plasma cholesterol and causes changes in the gut microbiome and metabolome independently of energy intake. *Gut*. 2020 Jul;69(7):1258-1268.

Mitsou EK, Kakali A, Antonopoulou S, Mountzouris KC, Yannakoulia M, Panagiotakos DB, Kyriacou A. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and gastrointestinal characteristics in an adult population. *Br J Nutr*. 2017 Jun;117(12):1645-1655.

Montel MC, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, Berthier F. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int J Food Microbiol*. 2014 May 2;177:136-54.

Moschen I, Bröer A, Galić S, Lang F, Bröer S. Significance of short chain fatty acid transport by members of the monocarboxylate transporter family (MCT). *Neurochem Res*. 2012 Nov;37(11):2562-8.

Mozaffarian D, Marfisi R, Levantesi G, Silletta MG, Tavazzi L, Tognoni G, Valagussa F, Marchioli R. Incidence of new-onset diabetes and impaired fasting glucose in patients with recent myocardial infarction and the effect of clinical and lifestyle risk factors. *Lancet*. 2007 Aug 25;370(9588):667-75.

Müller M, Hernández MAG, Goossens GH, Reijnders D, Holst JJ, Jocken JWE, van Eijk H, Canfora EE, Blaak EE. Circulating but not faecal short-chain fatty acids are related to insulin sensitivity, lipolysis and GLP-1 concentrations in humans. *Sci Rep* 2019; ;9:12515.
Nadkarni P, Chepurny OG, Holz GG. Regulation of glucose homeostasis by GLP-1. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014;121:23-65.

Nilsson AC, Johansson-Boll EV, Björck IM. Increased gut hormones and insulin sensitivity index following a 3-d intervention with a barley kernel-based product: a randomised cross-over study in healthy middle-aged subjects. *Br J Nutr*. 2015 Sep 28;114(6):899-907.

O'Keefe JH, Gheewala NM, O'Keefe JO. Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Jan 22;51(3):249-55.

Pacini G, Mari A. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and beta-cell function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol* 2003;17(3):305e22.

Paglialunga S, Dehn CA. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis*. 2016 Sep 17;15(1):159.

Palacios T, Vitetta L, Coulson S, Madigan CD, Lam YY, Manuel R, Briskey D, Hendy C, Kim JN, Ishoey T, Soto-Giron MJ, Schott EM, Toledo G, Caterson ID. Targeting the Intestinal Microbiota to Prevent Type 2 Diabetes and Enhance the Effect of Metformin on Glycaemia: A Randomised Controlled Pilot Study. *Nutrients*. 2020 Jul 9;12(7):2041.

Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sánchez E, Romero I, Vidal-Puig A, Berral FJ, Escribano A, Moyano MJ, Pérez-Martínez P, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr*. 2007 Oct;26(5):434-44.

Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*. 2009 Sep;139(9):1619-25.

Peter A, Cegan A, Wagner S, Lehmann R, Stefan N, Königsrainer A, Königsrainer I, Häring HU, Schleicher E. Hepatic lipid composition and stearoyl-coenzyme A desaturase 1 mRNA expression can be estimated from plasma VLDL fatty acid ratios. *Clin Chem*. 2009 Dec;55(12):2113-20

Peterson CM, Beyl RA, Marlatt KL, Martin CK, Aryana KJ, Marco ML, Martin RJ, Keenan MJ, Ravussin E. Effect of 12 wk of resistant starch supplementation on cardiometabolic risk factors in adults with prediabetes: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2018;108:492-501

Petrov MS, Taylor R. Intra-pancreatic fat deposition: bringing hidden fat to the fore. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2022;19:153–168

Pingitore A, Chambers ES, Hill T, Maldonado IR, Liu B, Bewick G, Morrison DJ, Preston T, Wallis GA, Tedford C, Castañera González R, Huang GC, Choudhary P, Frost G, Persaud SJ. The diet-derived short chain fatty acid propionate improves beta-cell function in humans and stimulates insulin secretion from human islets in vitro. *Diabetes Obes Metab*. 2017 Feb;19(2):257-265.

Pinnick KE, Collins SC, Londos C, Gauguier D, Clark A, Fielding BA. Pancreatic ectopic fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Mar;16(3):522-30.

Podszun MC, Alawad AS, Lingala S, Morris N, Huang WA, Yang S, Schoenfeld M, Rolt A, Ouwerkerk R, Valdez K, Umarova R, Ma Y, Fatima SZ, Lin DD, Mahajan LS, Samala N, Violet PC, Levine M, Shamburek R, Gharib AM, Kleiner DE, Garraffo HM, Cai H, Walter PJ, Rotman Y. Vitamin E treatment in NAFLD patients demonstrates that oxidative stress drives steatosis through upregulation of de-novo lipogenesis. *Redox Biol*. 2020 Oct;37:101710.

Portincasa P, Bonfrate L, Vacca M, De Angelis M, Farella I, Lanza E, Khalil M, Wang DQ, Sperandio M, Di Ciaula A. Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 20;23(3):1105.

Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007 Oct;46(4):1081-90.

Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, Contos MJ, Sterling RK, Fuchs M, Zhou H, Watkins SM, Sanyal AJ. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):1827-38.

Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):55-60.

Ragonnaud E, Biragyn A. Gut microbiota as the key controllers of "healthy" aging of elderly people. *Immun Ageing*. 2021 Jan 5;18(1):2.

Rahat-Rozenbloom S, Fernandes J, Cheng J, Gloor GB, Wolever TM. The acute effects of inulin and resistant starch on postprandial serum short-chain fatty acids and second-meal glycemic response in lean and overweight humans. *Eur J Clin Nutr* 2017;71:227-233.

Rashed AA, Saparuddin F, Rathi DG, Nasir NNM, Lokman EF. Effects of Resistant Starch Interventions on Metabolic Biomarkers in Pre-Diabetes and Diabetes Adults. *Front Nutr* 2022;8:793414.

Rehackova L, Arnott B, Araujo-Soares V, Adamson AA, Taylor R, Sniehotta FF. Efficacy and acceptability of very low energy diets in overweight and obese people with type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analyses. *Diabet Med* 2016;33:580–591.

Remesy C, Demigne C. Determination of volatile fatty acids in plasma after ethanolic extraction. *Biochem J* 1974;141(1):85e91.

Riccardi G, Rivellese AA. Effects of dietary fiber and carbohydrate on glucose and lipoprotein metabolism in diabetic patients. *Diabetes Care* 1991;14(12):1115e25.

Ritzhaupt A, Wood IS, Ellis A, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J Physiol.* 1998 Dec 15;513 (Pt 3)(Pt 3):719-32.

Rosqvist F, Iggman D, Kullberg J, Cedernaes J, Johansson HE, Larsson A, Johansson L, Ahlström H, Arner P, Dahlman I, Risérus U. Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes.* 2014 Jul;63(7):2356-68.

Rosqvist F, McNeil CA, Pramfalk C, Parry SA, Low WS, Cornfield T, Fielding BA, Hodson L. Fasting hepatic de novo lipogenesis is not reliably assessed using circulating fatty acid markers. *Am J Clin Nutr.* 2019 Feb 1;109(2):260-268.

Rossi AP, Fantin F, Zamboni GA, Mazzali G, Zoico E, Bambace C, Antonioli A, Pozzi Mucelli R, Zamboni M. Effect of moderate weight loss on hepatic, pancreatic and visceral lipids in obese subjects. *Nutr Diabetes.* 2012 Mar 5;2(3):e32.

Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 2018; 555:210–215

Roumans KHM, Basset Sagarminaga J, Peters HPF, Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling VB. Liver fat storage pathways: methodologies and dietary effects. *Curr Opin Lipidol.* 2021 Feb 1;32(1):9-15.

Roumans KHM, Lindeboom L, Veeraiah P, Remie CME, Phielix E, Havekes B, Bruls YMH, Brouwers MCGJ, Ståhlman M, Alssema M, Peters HPF, de Mutsert R, Staels B, Taskinen MR, Borén J, Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling VB. Hepatic saturated fatty acid fraction is associated with de novo lipogenesis and hepatic insulin resistance. *Nat Commun.* 2020 Apr 20;11(1):1891.

Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R; IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019 Nov;157:107843.

Sakai NS, Taylor SA, Chouhan MD. Obesity, metabolic disease and the pancreas-quantitative imaging of pancreatic fat. *Br J Radiol* 2018;91:20180267

Salamone D, Rivellese A. A, Vetrani C. The relationship between gut microbiota, short-chain fatty acids and type 2 diabetes mellitus: the possible role of dietary fibre. *Acta Diabetologica* 2021; 58:1131–1138

Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MÁ, Ibarrola-Jurado N, Basora J, Estruch R, Covas MI, Corella D, Arós F, Ruiz-Gutiérrez V, Ros E; PREDIMED Study Investigators. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care*. 2011 Jan;34(1):14-9

Salgaço MK, Oliveira LGS, Costa GN, Bianchi F, Sivieri K. Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Dec;103(23-24):9229-9238.

Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, Kurilshikov A, Vich Vila A, Vösa U, Mujagic Z, Masclee AAM, Jonkers DMAE, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Franke L, Zhernakova A, Fu J, Wijmenga C, McCarthy MI. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet*. 2019 Apr;51(4):600-605.

Schönfeld P, Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J Lipid Res*. 2016

Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr*. 2003 Jan;77(1):43-50.

Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottière HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000 Sep;47(3):397-403

Simpson H.L and Campbell B.J. Review article: dietary fibre–microbiota interactions. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2015; 42: 158–179

Skytte MJ, Samkani A, Petersen AD, Thomsen MN, Astrup A, Chabanova E, Frystyk J, Holst JJ, Thomsen HS, Madsbad S, Larsen TM, Haugaard SB, Krarup T. A carbohydrate-reduced high-protein diet improves HbA1c and liver fat content in weight stable participants with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2019 Nov;62(11):2066-2078.

Smith GI, Shankaran M, Yoshino M, Schweitzer GG, Chondronikola M, Beals JW, Okunade AL, Patterson BW, Nyangau E, Field T, Sirlin CB, Talukdar S, Hellerstein MK, Klein S. Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2020 Mar 2;130(3):1453-1460.

Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013 Aug 2;341(6145):569-73

Steven S, Hollingsworth KG, Small PK, Woodcock SA, Pucci A, Aribisala B, Al-Mrabeh A, Daly AK, Batterham RL, Taylor R. Weight Loss Decreases Excess Pancreatic Triacylglycerol Specifically in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2016 Jan;39(1):158-65.

Tabelle di composizione degli alimenti, Aggiornamento 2019- Website a cura di L. Marletta e E. Camilli. <https://www.alimentinutrizione.it/sezioni/tabellenutrizionali>

Tene L, Shelef I, Schwarzfuchs D, Gepner Y, Yaskolka Meir A, Tsaban G, Zelicha H, Bilitzky A, Komy O, Cohen N, Bril N, Rein M, Serfaty D, Kenigsbuch S, Chassidim Y, Sarusy B, Ceglarek U, Stumvoll M, Blüher M, Thiery J, Stampfer MJ, Rudich A, Shai I. The effect of long-term weight-loss intervention strategies on the dynamics of pancreatic-fat and morphology: An MRI RCT study. *Clin Nutr ESPEN*. 2018 Apr;24:82-89.

Thomsen MN, Skytte MJ, Samkani A, Carl MH, Weber P, Astrup A, Chabanova E, Fenger M, Frystyk J, Hartmann B, Holst JJ, Larsen TM, Madsbad S, Magkos F, Thomsen HS, Haugaard SB, Krarup T. Dietary carbohydrate restriction augments weight loss-induced improvements in glycaemic control and liver fat in individuals with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2022 Mar;65(3):506-517.

Tiret L, Gerdes C, Murphy MJ, Dallongeville J, Nicaud V, O'Reilly DS, Beisiegel U, De Backer G. Postprandial response to a fat tolerance test in young adults with a paternal history of premature coronary heart disease - the EARS II study (European Atherosclerosis Research Study). *Eur J Clin Invest*. 2000 Jul;30(7):578-85.

Titus E, Ahearn GA. Short-chain fatty acid transport in the intestine of a herbivorous teleost. *J Exp Biol*. 1988 Mar;135:77-94

Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, Cameron J, Grosse J, Reimann F, Gribble FM. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*. 2012 Feb;61(2):364-71. doi: 10.2337/db11-1019.

Tosti V, Bertozzi B, Fontana L. Health benefits of the Mediterranean diet:metabolic and molecular mechanisms. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2018;73(3):318e26.

Trouwborst I, Bowser SM, Goossens GH, Blaak EE. Ectopic fat accumulation in distinct insulin resistant phenotypes; targets for personalized nutritional interventions. *Front Nutr* 2018;5:77.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457(7228):480e4.

Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, van Waesberghe JH, Schindhelm RK, Mari A, Heine RJ, Diamant M. Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Nov;30(11):2916-21.

Vetrani C, Costabile G, Luongo D, Naviglio D, Rivellese AA, Riccardi G, Giacco R. Effects of whole-grain cereal foods on plasma short chain fatty acid concentrations in individuals with the metabolic syndrome. *Nutrition*. 2016 Feb;32(2):217-21.

Vetrani C, Sestili F, Vitale M, Botticella E, Giacco R, Griffo E, Costabile G, Cipriano P, Tura A, Pacini G, Rivellese AA, Lafiandra D, Riccardi G. Metabolic response to amylose-rich wheat-based rusks in overweight individuals. *Eur J Clin Nutr.* 2018 Jun;72(6):904-912.

Vetrani, C.; Maukonen, J.; Bozzetto, L.; Della Pepa, G.; Vitale, M.; Costabile, G.; Riccardi, G.; Rivellese, A.A.; Saarela, M.; Annuzzi, G. Diets naturally rich in polyphenols and/or long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids differently affect microbiota composition in high-cardiometabolic-risk individuals. *Acta Diabetol.* 2020, 57, 853–860.

Vitale M, Giacco R, Laiola M, Della Pepa G, Luongo D, Mangione A, Salamone D, Vitaglione P, Ercolini D, Rivellese AA. Acute and chronic improvement in postprandial glucose metabolism by a diet resembling the traditional Mediterranean dietary pattern: Can SCFAs play a role? *Clin Nutr.* 2021 Feb;40(2):428-437.

Vitale M, Masulli M, Cocozza S, Anichini R, Babini AC, Boemi M, Bonora E, Buzzetti R, Carpinteri R, Caselli C, Ceccarelli E, Cignarelli M, Citro G, Clemente G, Consoli A, Corsi L, De Gregorio A, Di Bartolo P, Di Cianni G, Fontana L, Garofolo M, Giorda CB, Giordano C, Grioni S, Iovine C, Longhitano S, Mancastroppa G, Mazzucchelli C, Montani V, Mori M, Perriello G, Rinaldi ME, Ruffo MC, Salvi L, Sartore G, Scaranna C, Tonutti L, Zamboni C, Zogheri A, Krogh V, Cappellini F, Signorini S, Riccardi G, Vaccaro O; TOSCA.IT Study Group. Sex differences in food choices, adherence to dietary recommendations and plasma lipid profile in type 2 diabetes - The TOSCA.IT study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016 Oct;26(10):879-85

Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Nov 1;36(5):1455-60.

von Loeffelholz C, Döcke S, Lock JF, Lieske S, Horn P, Kriebel J, Wahl S, Singmann P, de Las Heras Gala T, Grallert H, Raschzok N, Sauer IM, Heller R, Jahreis G, Claus RA, Bauer M, Stockmann M, Birkenfeld AL, Pfeiffer AFH. Increased lipogenesis in spite of upregulated hepatic 5'AMP-activated protein kinase in human non-alcoholic fatty liver. *Hepatol Res.* 2017 Aug;47(9):890-901.

Wagner R, Eckstein SS, Yamazaki H, Gerst F, Machann J, Jaghutriz BA, Schürmann A, Solimena M, Singer S, Königsrainer A, Birkenfeld AL, Häring HU, Fritsche A, Ullrich S, Heni M. Metabolic implications of pancreatic fat accumulation. *Nat Rev Endocrinol.* 2022 Jan;18(1):43-54.

Wang D, Liu J, Zhou L, Zhang Q, Li M, Xiao X. Effects of Oral Glucose-Lowering Agents on Gut Microbiota and Microbial Metabolites. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Jul 13;13:905171. doi: 10.3389/fendo.2022.905171

Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Mitchell E, Jayaprakasam B, Nair MG, Peters JM, Busik JV, Olson LK, Jump DB. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res.* 2006 Sep;47(9):2028-41.

Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Nov;16(11):678-89. doi: 10.1038/nrm4074. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Jan;17(1):64.

Wilke MS, French MA, Goh YK, Ryan EA, Jones PJ, Clandinin MT. Synthesis of specific fatty acids contributes to VLDL-triacylglycerol composition in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009 Aug;52(8):1628-37.

Williams EJ, Baines KJ, Berthon BS, Wood LG. Effects of an Encapsulated Fruit and Vegetable Juice Concentrate on Obesity-Induced Systemic Inflammation: A Randomised Controlled Trial. *Nutrients*. 2017 Feb 8;9(2):116.

Wolever TM, Schrade KB, Vogt JA, Tsihlias EB, McBurney MI. Do colonic short-chain fatty acids contribute to the long-term adaptation of blood lipids in subjects with type 2 diabetes consuming a high-fiber diet? *Am J Clin Nutr*. 2002 Jun;75(6):1023-30.

Wolever TM, Spadafora PJ, Cunnane SC, Pencharz PB. Propionate inhibits incorporation of colonic [1,2-¹³C] acetate into plasma lipids in humans. *Am J Clin Nutr*. 1995 Jun;61(6):1241-7.

Wolfe BE, Dutton RJ. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell*. 2015 Mar 26;161(1):49-55.

Wu H, Tremaroli V, Schmidt C, Lundqvist A, Olsson LM, Krämer M, Gummesson A, Perkins R, Bergström G, Bäckhed F. The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Cell Metab*. 2020 Sep 1;32(3):379-390.e3.

Wu JH, Lemaitre RN, Imamura F, King IB, Song X, Spiegelman D, Siscovick DS, Mozaffarian D. Fatty acids in the de novo lipogenesis pathway and risk of coronary heart disease: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr*. 2011 Aug;94(2):431-8.

Yadav H, Lee JH, Lloyd J, Walter P, Rane SG. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *J Biol Chem*. 2013 Aug 30;288(35):25088-25097.

Yamashita H, Maruta H, Jozuka M, Kimura R, Iwabuchi H, Yamato M, Saito T, Fujisawa K, Takahashi Y, Kimoto M, Hiemori M, Tsuji H. Effects of acetate on lipid metabolism in muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009 Mar 23;73(3):570-6.

Yamashita H. Biological Function of Acetic Acid-Improvement in Obesity and Glucose Tolerance by Acetic Acid in Type 2 Diabetic Rats. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016 Jul 29;56 Suppl 1:S171-5. doi: 10.1080/10408398.2015.1045966. PMID: 26176799.

Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, Qiu Y, Burns L, Afendy A, Nader F. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2019 Oct;71(4):793-801.

Zenel AM, Stewart ML. High amylose white rice reduces postprandial glycemic response but not appetite in humans. *Nutrients* 2015;7:5362–74.

Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, Ji L. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*. 2013 Aug 27;8(8):e71108.

Zhao L, Lou H, Peng Y, Chen S, Fan L, Li X. Elevated levels of circulating short-chain fatty acids and bile acids in type 2 diabetes are linked to gut barrier disruption and disordered gut microbiota. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020 Nov;169:108418.

Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, Fu H, Xue X, Lu C, Ma J, Yu L, Xu C, Ren Z, Xu Y, Xu S, Shen H, Zhu X, Shi Y, Shen Q, Dong W, Liu R, Ling Y, Zeng Y, Wang X, Zhang Q, Wang J, Wang L, Wu Y, Zeng B, Wei H, Zhang M, Peng Y, Zhang C. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science.* 2018 Mar 9;359(6380):1151-1156.

Zhong Y, Qu JZ, Liu X, Ding L, Liu Y, Bertoft E, Petersen BL, Hamaker BR, Hebelstrup KH, Blennow A. Different genetic strategies to generate high amylose starch mutants by engineering the starch biosynthetic pathways. *Carbohydr Polym* 2022;287:119327

Zhou J, Martin RJ, Tulley RT, Raggio AM, McCutcheon KL, Shen L, Danna SC, Tripathy S, Hegsted M, Keenan MJ. Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Nov;295(5):E1160-6.

8. APPENDICE

TABELLA 1. Studi osservazionali che hanno messo in relazione la composizione del microbiota , lo stato patologico e le abitudini alimentari (Modificato da Salamone D et al., Acta Diabetologica 2021).

Autori	Partecipanti	Resultati
Zhang X,2013	44 partecipanti sani BMI 23,38 kg/m ² 64 partecipanti con prediabete BMI 24,95 Kg/m ² 13 partecipanti con T2D BMI 26,50 Kg/m ²	↑ Batteri produttori di butirrato in individui sani ↑ Bacteroides e costridii in pazienti con prediabete e T2D
Wu H, 2020	206 partecipanti sani BMI 28.2 kg/m ² 220 partecipanti con prediabete BMI 28.3 kg/m ² 58 partecipanti con T2D BMI 31.6 kg/m ²	↓ Batteri produttori di butirrato in pazienti con prediabete e T2D
Karlosson, 2013	53 partecipanti con T2D BMI 20-40 Kg/m ² 49 partecipanti con prediabete BMI 20-40 Kg/m ² 43 partecipanti sani BMI 20-40 Kg/m ²	↑ Roseburia ↑ Faecalibacterium prausnitzii in partecipanti sani ↓ Roseburia ↓ Faecalibacterium prausnitzii in partecipanti con T2D
Qin,2012	182 partecipanti sani BMI 18-40Kg/m ² 183 partecipanti con T2D BMI 18-40Kg/m ²	↑ Roseburia ↑ Faecalibacterium prausnitzii in partecipanti sani ↓ Roseburia ↓ Faecalibacterium prausnitzii in partecipanti con T2D
Senna 2019	952 partecipanti sani selezionati su basi genomiche, metagenomiche e SCFA	Batteri produttori di butirrato giocano un ruolo protettivo contro il T2D Batteri produttori di propionato promuovono l'insorgenza del T2D
De Filippo,2010	30 bambini (1-6 anni) africani (n°15) e italiani (n°15)	Dieta a base di alimenti di origine vegetale (FFQ) ↑ Prevotella ↑ Xylanibacter ↓ Firmicutes Dieta a base di alimenti di origine animale (FFQ) ↓ Prevotella ↓ Xylanibacter ↑ Firmicutes
Garcia-Mentrana I,2018	27 partecipanti sani 16 donne BMI 21,95±2,72 kg/m ² 11 maschi BMI 25,29±2,76 kg/m ²	Alta aderenza alla Dieta Mediterranea (FFQ) ↑ Bifidobacteria ↑ Bacteroidates ↓ Firmicutes:Bacteroidates ↑ SCFA fecali ↑ Propionato fecale Ata assunzione di proteine di origine animale (FFQ) ↓ Bacteroidates ↑ Firmicutes:Bacteroidates
Gutierrez-Diaz I, 2016	31 partecipanti sani 10 partecipanti sani con bassa aderenza alla dieta mediterranea BMI 26,2±5 Kg/m ² 21 partecipanti sani con alta aderenza alla dieta mediterranea BMI 26,3±4,7 Kg/m ²	Alta aderenza alla Dieta Mediterranea (FFQ) ↑ SCFA Fecali ↑ Propionato fecale ↑ Butirrato Fecale

Mitsou E.K., 2017	116 partecipanti sani BMI 25-30 Kg/m ²	Alta aderenza alla Dieta Mediterranea (FFQ) ↑Bifidobacteria ↑SCFA fecali
De Filippis, 2016	51 partecipanti vegetariani BMI 21.9 ± 2.5 kg/m ² 51 partecipanti vegani BMI 21.3 ± 2.2 kg/m ² 51 partecipanti onnivori BMI 22± 2.0 kg/m ²	Dieta vegetariana, dieta vegana e dieta onnivora ad alta aderenza alla Dieta Mediterranea ↑Prevotella ↑Propionato fecale ↓Valerato fecale ↓Caproato
BMI: Indice di massa corporea; FFQ: Questionario di frequenza di consumo degli alimenti; SCFA: Acidi grassi a corta catena, T2D: Diabete tipo 2		

TABELLA 2. Studi d'intervento che hanno valutato l'effetto di specifici interventi dietetici a base di prodotti di origine vegetale o alimenti ricchi in fibra sulla composizione del microbiota intestinale sulla produzione di SCFA e il loro possibile ruolo nella regolazione del metabolismo glucidico. (Modificato da Salamone D et al., Acta Diabetologica 2021).

Autore	Disegno dello studio	Partecipanti	Durata	Intervento	Effetto osservato
David 2014	RCT Crossover	10 partecipanti sani BMI 19-32 Kg/m ²	4 giorni	Dieta a base di prodotti di origine vegetale (fibre: 26g/1000 kcal) Vs Dieta occidentale (fibre:9.3g/ 1000 kcal)	Dieta a base di prodotti di origine vegetale ↑Prevotella ↑Roseburia ↑Butirrato fecale Dieta Occidentale ↓Prevotella↑Bacteroides
Zhao 2018	RCT Parallelo	43 partecipanti con T2D BMI 25-35 kg/m ²	12 settimane	Dieta ad alto contenuto di fibre (fibre:37,10 g) Vs Diet Controllo (fibre:16,06 g)	Dieta ad alto contenuto di fibre ↑Butirrato fecale ↓HbA1c ↓glicemia a digiuno
Haro 2016	RCT Parallelo	20 partecipanti con Sindrome Metabolica BMI 30-40Kg/m ²	1 anno	Dieta Mediterranea ricca in prodotti vegetali (fibre: 146,6g/1000kcal) e noci (fibre:5,6g/1000 Kcal) Vs Dieta ricca in fibra derivati da cereali integrali (fibre: 40,1 g/1000kcal)	Dieta Mediterranea ↑Roseburia ↓Prevotella ↑ISI Dieta a basso contenuto di acidi grassi e ad alto contenuto di fibre ↓Roseburia ↑Prevotella ↑ISI
Hald 2016	RCT Crossover	19 partecipanti con Sindrome Metabolica BMI 25,9-41 Kg/m ²	4 settimane	Dieta ricca in arabinoxilani e amido resistenza (fibre:64 g) Vs Dieta Occidentale (fibre:17,6 g)	Dieta ricca in arabinoxilani e amido resistenza ↑Bifidobacteria ↑Fecal SCFA ↑Fecal Butyrate
Vetrani 2015	RCT Parallelo	40 partecipanti con Sindrome metabolica BMI 25-35 kg/m ²	12 settimane	Dieta ricca in cereale integrale (total fibre: 40 g; fibre da cereali: 28.9 g) Vs Dieta a base di cereali raffinati (fibre totali: 22,1g; fibre da cereali 11.8 g)	Dieta ricca in cereali integrali ↑Propionato plasmatico ↓Insulina Plasmatica
Kovatcheva 2015	RCT Crossover	39 Partecipanti sani BMI 18-28 Kg/m ²	3 giorni	Pane a base d'orzo (fibre:37,6 g) Vs	Pane a base d'orzo ↑Prevotella:Bacteroides

				Pane bianco (fibre:9,1 g)	↓Postprandial glucose
Nillson 2015	RCT Crossover	39 Partecipanti sani BMI 18-28 Kg/m ²	3 giorni	Pane a base d'orzo (fibre:37,6 g) Vs Pane bianco (fibre:9,1 g)	Pane a base d'orzo ↑SCFA plasmatici ↓Glucosio ↓Insulina
BMI: Indice di Massa corporea; HbA1c: Emoglobina Glicosilata; ISI: Indice di sensibilità insulinica; OGIS: Indice di sensibilità insulinica al glucosio orale; RCT: Studio clinico randomizzato; SCFA: Acidi grassi a corta catena					

Bibliografia

TABELLA 1

De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Stora A, Laghi L, Serrazanetti DI, Di Cagno R, Ferrocino I, Lazzi C, Turrone S, Cocolin L, Brigidi P, Neviani E, Gobetti M, O'Toole PW, Ercolini D. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*. 2016 Nov;65(11):1812-1821.

De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14691-6.

Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Front Microbiol*. 2018 May 7;9:890.

Gutiérrez-Díaz I, Fernández-Navarro T, Sánchez B, Margolles A, González S. Mediterranean diet and faecal microbiota: a transversal study. *Food Funct*. 2016 May 18;7(5):2347-56.

Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013 Jun 6;498(7452):99-103.

Mitsou EK, Kakali A, Antonopoulou S, Mountzouris KC, Yannakoulia M, Panagiotakos DB, Kyriacou A. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and gastrointestinal characteristics in an adult population. *Br J Nutr*. 2017 Jun;117(12):1645-1655.

Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):55-60.

Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, Kurilshikov A, Vich Vila A, Vösa U, Mujagic Z, Masclee AAM, Jonkers DMAE, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Franke L, Zhernakova A, Fu J, Wijmenga C, McCarthy MI. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet*. 2019 Apr;51(4):600-605.

Wu H, Tremaroli V, Schmidt C, Lundqvist A, Olsson LM, Krämer M, Gummesson A, Perkins R, Bergström G, Bäckhed F. The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Cell Metab*. 2020 Sep 1;32(3):379-390.e3.

Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, Ji L. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*. 2013 Aug 27;8(8):e71108.

TABELLA 2

David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan 23;505(7484):559-63.

Hald S, Schioldan AG, Moore ME, Dige A, Lærke HN, Agnholt J, Bach Knudsen KE, Hermansen K, Marco ML, Gregersen S, Dahlerup JF. Effects of Arabinoxylan and Resistant Starch on Intestinal Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Subjects with Metabolic Syndrome: A Randomised Crossover Study. *PLoS One*. 2016 Jul 19;11(7):e0159223.

Haro C, Montes-Borrego M, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Quintana-Navarro GM, Tinahones FJ, Landa BB, López-Miranda J, Camargo A, Pérez-Jiménez F. Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Jan;101(1):233-42.

Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, Hallen A, Martens E, Björck I, Bäckhed F. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab*. 2015 Dec 1;22(6):971-82.

Nilsson AC, Johansson-Boll EV, Björck IM. Increased gut hormones and insulin sensitivity index following a 3-d intervention with a barley kernel-based product: a randomised cross-over study in healthy middle-aged subjects. *Br J Nutr*. 2015 Sep 28;114(6):899-907.

Vetrani C, Costabile G, Luongo D, Naviglio D, Rivelles AA, Riccardi G, Giacco R. Effects of whole-grain cereal foods on plasma short chain fatty acid concentrations in individuals with the metabolic syndrome. *Nutrition*. 2016 Feb;32(2):217-21.

Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, Fu H, Xue X, Lu C, Ma J, Yu L, Xu C, Ren Z, Xu Y, Xu S, Shen H, Zhu X, Shi Y, Shen Q, Dong W, Liu R, Ling Y, Zeng Y, Wang X, Zhang Q, Wang J, Wang L, Wu Y, Zeng B, Wei H, Zhang M, Peng Y, Zhang C. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*. 2018 Mar 9;359(6380):1151-1156.

9. PUBBLICAZIONI OGGETTO DELLA TESI DEL DOTTORATO

1. **Salamone D**, Rivellese AA, Vetrani C. The relationship between gut microbiota, short-chain fatty acids and type 2 diabetes mellitus: the possible role of dietary fibre. *Acta Diabetol.* 2021 Sep;58(9):1131-1138.
2. **Salamone D**, Costabile G, Corrado A, Della Pepa G, Vitale M, Giacco R, Luongo D, Testa R, Rivellese AA, Annuzzi G, Bozzetto L. Circulating short-chain fatty acids in type 2 diabetic patients and overweight/obese individuals. *Acta Diabetol.* 2022 Dec;59(12):1653-1656.
3. Costabile G, Vetrani C, Calabrese I, Vitale M, Cipriano, P **Salamone D**, Testa R, Paparo L, Russo R, Rivellese AA, Giacco R, Riccardi G. High Amylose Wheat Bread at Breakfast Increases Plasma Propionate Concentrations and Reduces the Postprandial Insulin Response to the Following Meal in Overweight Adults, *The Journal of Nutrition*, 2022.
4. Vitale M, Giacco R, Laiola M, Della Pepa G, Luongo D, Mangione A, **Salamone D**, Vitaglione P, Ercolini D, Rivellese AA. Acute and chronic improvement in postprandial glucose metabolism by a diet resembling the traditional Mediterranean dietary pattern: Can SCFAs play a role? *Clin Nutr.* 2021 Feb;40(2):428-437.
5. Costabile G, Della Pepa G, **Salamone D**, Luongo D, Naviglio D, Brancato V, Cavaliere C, Salvatore M, Cipriano P, Vitale M, Corrado A, Rivellese AA, Annuzzi G, Bozzetto L. Reduction of De Novo Lipogenesis Mediates Beneficial Effects of Isoenergetic Diets on Fatty Liver: Mechanistic Insights from the MEDEA Randomized Clinical Trial. *Nutrients.* 2022 May 23;14(10):2178.
6. Della Pepa G, Brancato V, Costabile G, **Salamone D**, Corrado A, Vitale M, Cavaliere C, Mancini M, Salvatore M, Luongo D, Riccardi G, Rivellese AA, Annuzzi G, Bozzetto L. An Isoenergetic Multifactorial Diet Reduces Pancreatic Fat and Increases Postprandial Insulin Response in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial. *Diabetes Care.* 2022 Sep 1;45(9):1935-1942.

ALTRE PUBBLICAZIONI

1. Costabile G, Della Pepa G, Vetrani C, Vitaglione P, Griffo E, Giacco R, Vitale M, **Salamone D**, Rivellese AA, Annuzzi G, Bozzetto L. An Oily Fish Diet Improves Subclinical Inflammation in People at High Cardiovascular Risk: A Randomized Controlled Study. *Molecules.* 2021 Jun 2;26(11):3369.