

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione
XXII CICLO
Coordinatore: Prof. Franco Contaldo**

**"Infiammazione subclinica associata ad obesità e/o
diabete di tipo 2: meccanismi patogenetici e possibili
strategie di terapia nutrizionale"**

Relatore
Prof. Gabriele Riccardi

Dottoranda
Dott.ssa Simona Maione

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Malattia cardiovascolare, aterosclerosi ed infiammazione	3
1.1.1 Proteina C-Reattiva: struttura, sintesi e funzione	6
1.2 Obesità ed infiammazione	9
1.3 Diabete ed infiammazione	10
1.4 Dieta ed infiammazione	11
1.4.1 Grassi ed infiammazione	12
1.4.2 Carboidrati, fibre, micronutrienti ed infiammazione	14
1.4.3 Frutta, verdura, noci ed infiammazione	15
2. SCOPI	16
3. METODOLOGIE	18
3.1 PCR e metodi di dosaggio	18
3.2 Metodo utilizzato per il dosaggio della PCR	21
3.2.1 Principio del metodo	21
3.2.2 Descrizione del metodo	22
3.2.3 Principio dell'esecuzione del test	26
3.2.4 Controllo di qualità	30
3.2.5 Raccolta e conservazione dei campioni	32
3.2.6 Altre determinazioni	33

4. ANALISI STATISTICA	34
5. STUDI	35
5.1 L'adiposità addominale è associata con elevati livelli di Proteina C-Reattiva indipendentemente dall'IMC nei soggetti non obesi.	35
5.2 Relazione tra i livelli di PCR circolanti, obesità e grado di compenso glicemico in soggetti con diabete di tipo 2.	41
5.3 Valutazione degli effetti a medio termine della dieta ricca in cereali integrali sui principali fattori di rischio cardiovascolare in individui sani.	51
5.4 Effetti di prodotti da forno arricchiti in acidi grassi n-3, folati, betaglucani e tocoferoli in soggetti con dislipidemia.	60
5.5 Health grain	71
6. CONCLUSIONI	83
7. BIBLIOGRAFIA	86
8. APPENDICE: Pubblicazioni	101

1. INTRODUZIONE

1.1 Malattia cardiovascolare, aterosclerosi ed infiammazione

La malattia cardiovascolare (CV) è la maggiore causa di morte nel mondo industrializzato ed è la manifestazione clinica dell' aterosclerosi, un processo che inizia precocemente nella vita ma progredisce lentamente ed in maniera silente per molti anni. Essa, solitamente, si manifesta clinicamente attraverso varie patologie acute come l'infarto del miocardio, ictus, angina, morte improvvisa. Il colesterolo plasmatico e la sua distribuzione nelle lipoproteine LDL ed HDL sono dei buoni predittori di rischio cardiovascolare nell'individuo, così come l'ipertensione arteriosa, il fumo di sigarette ed il diabete. Tuttavia, più della metà degli eventi cardiovascolari si verificano in individui apparentemente sani che hanno concentrazioni normali di colesterolo e nessuno degli altri maggiori fattori di rischio cardiovascolari (1). Di conseguenza, una crescente attenzione è stata rivolta al probabile ruolo di altri fattori coinvolti nello sviluppo dell'aterosclerosi e delle sue manifestazioni cliniche (2, 3, 4). In passato si pensava che l'aterosclerosi fosse una malattia causata solo dal deposito dei lipidi nella parete arteriosa. Oggi, ci sono numerose evidenze cliniche e sperimentali che dimostrano che anche l'infiammazione gioca un ruolo determinante nell'iniziazione, progressione e destabilizzazione delle placche ateromasiche della parete arteriosa, i cui maggiori costituenti sono tipiche cellule infiammatorie quali cellule mononucleate, macrofagi e linfociti T (2, 5). La lesione aterosclerotica più precocemente identificabile

è la stria lipidica dalla quale si arriva alla placca fibrosa attraverso un processo che coinvolge una complessa interazione tra endotelio, citochine infiammatorie e numerose cellule del sangue (5).

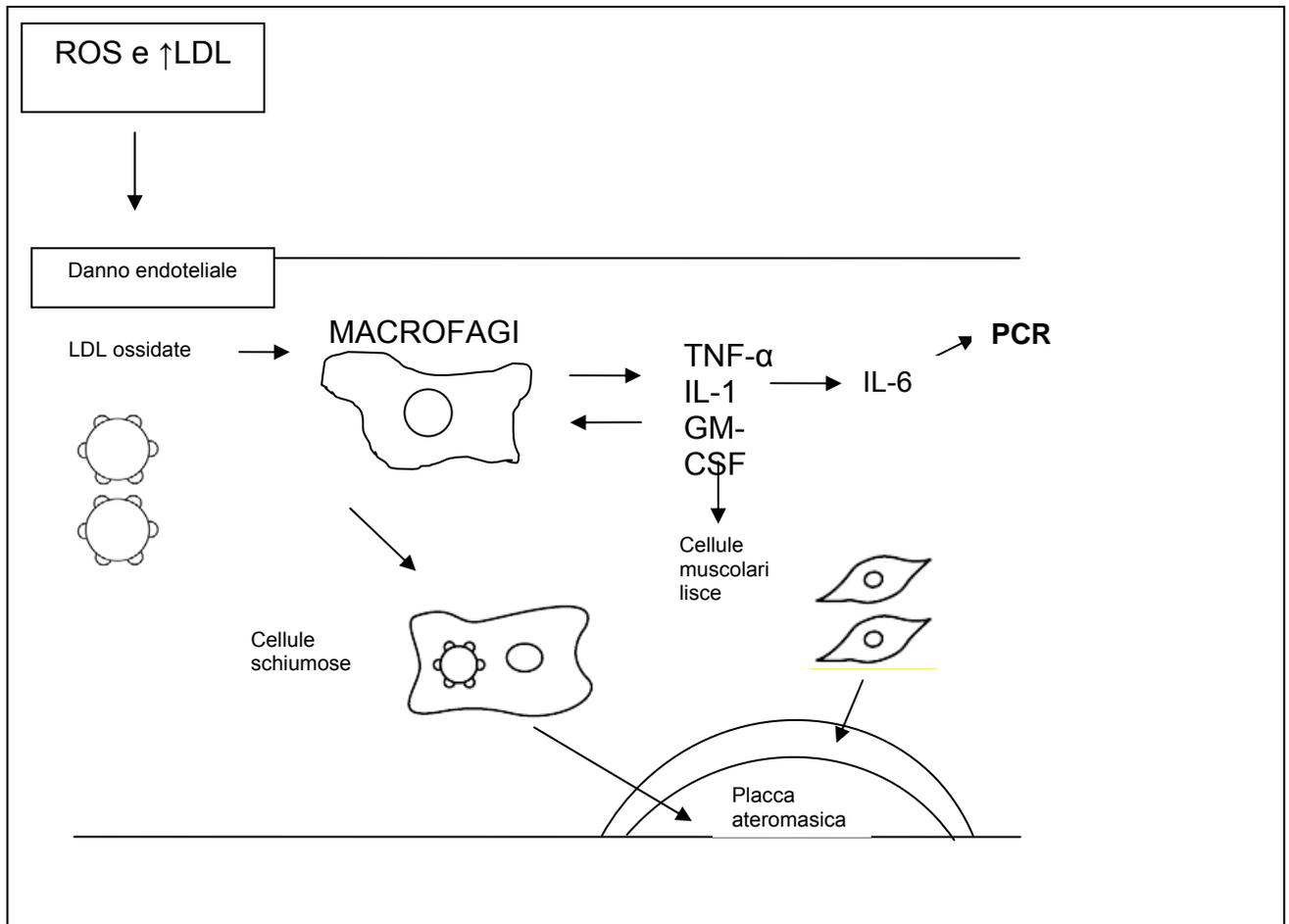


Figura 1. Possibili meccanismi attraverso cui l'infiammazione contribuisce allo sviluppo dell'aterosclerosi.

Abbreviazioni: ROS=radicali liberi dell'ossigeno; LDL=low density lipoprotein; TNF- α =tumor necrosis factor; IL=interleuchine; GM-CSF=Granulocyte-macrophage-Colony Stimulating Factor

Anche la regione della placca che sporge nel lume arterioso e che è il sito più vulnerabile di rottura, è fortemente infiltrato da cellule infiammatorie.

Ci si è, quindi, indirizzati alla ricerca di marcatori biologici

dell'inflammation che potessero essere potenziali, precoci, indicatori di rischio cardiovascolare.

Sono numerosi i mediatori dell'inflammation proposti come indicatori del rischio di malattia CV come: le citochine proinflammatorie (interleuchina-6, interleuchina-1, TNF- α), le molecole di adesione intracellulare e vascolare (ICAM-1, VCAM-1) ed alcune proteine markers di attivazione cellulare (PAPP-A, HSP60). Sebbene molti di essi siano di potenziale interesse clinico, l'attenzione si è focalizzata sulla Proteina-C Reattiva (PCR), a causa delle sue caratteristiche biologiche di stabilità, per la relativa facilità di determinazione e per l'esistenza in commercio di metodi analitici standardizzati di alta sensibilità e di costo moderato.

1.1.1 Proteina C- Reattiva: struttura, sintesi e funzione

La PCR è uno dei reattanti aspecifici della fase acuta dell'inflammatione, appartenente alla famiglia delle pentraxine, la quale, quando presente in circolo a basse concentrazioni, indica uno stato infiammatorio cronico. Essa è sintetizzata "de novo" dal fegato e la sua produzione è controllata dall'interleuchina-6. E' composta da 5 subunità di 25 kDa ciascuna ed ha una lunga emivita plasmatica di circa 18-20 ore e non è consumata né prodotta durante la reazione infiammatoria. La sua variabilità biologica intraindividuale è molto bassa (6) (7). Inoltre, poiché non si modifica in seguito all'assunzione di un pasto e non sembra avere un ritmo circadiano, per la sua valutazione non occorre essere in una condizione di digiuno (8). Queste sue caratteristiche biologiche la rendono un'analita molto stabile che può, quindi, essere accuratamente determinata, sia su campioni freschi che congelati, senza richiedere speciali procedure di raccolta dei campioni. Per tutti questi motivi, la PCR è diventata il marker di inflammatione più ampiamente studiato in studi prognostici di valutazione del rischio cardiovascolare.

La PCR è un consolidato indicatore dell'inflammatione, la cui concentrazione plasmatica aumenta notevolmente in risposta a stimoli infiammatori quali danni tissutali o infezioni. Sebbene la PCR fosse, inizialmente, considerata soltanto un indicatore di inflammatione vascolare, alcune ricerche indicano che essa gioca un ruolo attivo anche nell'aterogenesi (9, 10). Essa è identificabile negli stadi precoci di sviluppo

della placca ateromasica e si pensa sia coinvolta nel processo di formazione della placca. Inoltre, sembra che la sua concentrazione plasmatica rifletta la vulnerabilità della lesione ateromasica e la probabilità di rottura della placca (10).

E' stato anche proposto che le cellule muscolari lisce delle arterie coronariche umane siano in grado di produrre PCR in risposta alle citochine infiammatorie e che questa PCR prodotta localmente partecipi al processo aterogeno (11). Inoltre, è stato anche suggerito che la perdita della simmetria pentamerica della PCR determina la formazione di una PCR monometrica, la quale sarebbe il maggiore promotore della risposta proinfiammatoria nelle arterie coronariche (12). Alla luce di queste considerazioni, la PCR è stata considerata come potenziale marker precoce del rischio di aterosclerosi e predittore di futuri eventi coronarici in individui apparentemente sani. La sua determinazione, in aggiunta a quella dei lipidi plasmatici, migliora, infatti, la predizione del rischio globale (8). Allo scopo di valutare il rischio di futuri eventi coronarici, le concentrazioni di PCR dovrebbero essere interpretate usando degli intervalli che definiscono le classi di rischio, stabiliti sulla base dei risultati di studi prospettici ed i pazienti dovrebbero essere classificati in base a queste classi di rischio. A tutt'oggi, utilizzando i metodi di dosaggio ad alta sensibilità standardizzati dagli organismi internazionali, sono state identificate tre classi di rischio con livelli di PCR <1 mg/L, compresi tra 1 e

3 mg/L e >3 mg/L, corrispondenti, rispettivamente, a gruppi a basso, moderato ed alto rischio per futuri eventi cardiovascolari (8).

1.2 Obesità ed infiammazione

In letteratura esistono molti studi che sostengono che l'obesità ed in particolare la distribuzione centrale del grasso corporeo, che consiste in un abnorme accumulo di grasso a livello addominale, misurato valutando la circonferenza vita o il rapporto tra la circonferenza vita e la circonferenza fianchi, è maggiormente associata ad un aumento del rischio cardiovascolare rispetto alla misurazione dell'indice di massa corporea (IMC), che è una misura dell'adiposità generale (13, 14,15). Tuttavia, i meccanismi che legano l'obesità alla malattia cardiovascolare non sono del tutto noti. Infatti, l'aumento del rischio cardiometabolico associato all'obesità è solamente in parte spiegato dai maggiori fattori di rischio cardiovascolari. Un importante ruolo aggiuntivo può essere attribuito all'infiammazione subclinica (16). Diversi studi hanno valutato la relazione della PCR con gli indici di adiposità addominale e generale, mostrando risultati contrastanti, anche perché gli studi erano stati condotti su pazienti obesi, nei quali è più difficile valutare il diverso impatto dell'adiposità addominale e generale (17-21).

1.3 Diabete ed infiammazione

Valori elevati di PCR sono stati associati ad un aumentato rischio di sviluppo di diabete mellito e soggetti diabetici hanno valori di PCR più alti se comparati ai non diabetici. Le possibili spiegazioni di questa relazione sono: 1. i pazienti con diabete hanno anche un'aterosclerosi sottostante. 2. i pazienti diabetici hanno una maggiore quota di adiposità, specialmente viscerale. Sappiamo che l'interleuchina-6 (IL-6), che regola la sintesi di PCR è prodotta specialmente dal grasso viscerale e sottocutaneo (22) (23). In ogni caso, un'associazione significativa tra la PCR ed il rischio di diabete si mantiene anche dopo correlazione per IMC e circonferenza vita. 3. la disfunzione endoteliale che è presente nei diabetici e che promuove l'insulino resistenza è altresì associata ad un aumento di PCR (57-58).

1.4 Dieta ed infiammazione

La dieta può svolgere un ruolo di primaria importanza nel prevenire le malattie cardiovascolari influenzando più fattori di rischio cardiovascolare attraverso molteplici meccanismi.

La dieta è, inoltre, uno dei fattori ambientali che può avere maggiore impatto sui livelli di proteina c-reattiva.

Risale agli inizi degli anni '90 l'ipotesi di una “dieta health”, ossia sana, legata al fatto che una dieta povera in colesterolo ed acidi grassi saturi, ma ricca in fibre, acidi grassi mono- e polinsaturi ed antiossidanti (vitamina C, E e flavonoidi), potesse ridurre l'incidenza di malattie cardiovascolari (24).

La riduzione del peso corporeo, dovuta ad interventi dietetici di diverso tipo, è associata ad una riduzione delle concentrazioni plasmatiche di marcatori infiammatori (25).

1.4.1 Grassi ed infiammazione

Studi epidemiologici hanno valutato l'impatto di una dieta ricca di grassi sui valori proteina c-reattiva. È emerso che una dieta composta da acidi grassi può modulare l'infiammazione (26) (27).

Nello studio "Nurse's health study" condotto su 730 donne e nello studio di Baer et al è emerso che le concentrazioni di PCR sono più alte in soggetti che assumono una dieta ad elevato contenuto lipidico, in particolare di grassi trans (28) (32).

Anche i dati dell' Health professionals follow-up study, che comprendeva 446 uomini, e l'NHANES, con 4900 soggetti, suggeriscono che un intake elevato di acidi grassi, in particolare saturi e trans, è associato ad un aumento delle concentrazioni della PCR ultrasensibile nel plasma (29) (30).

Pirro et al hanno, inoltre, dimostrato che il consumo di 8 settimane di una dieta con basso colesterolo/bassi grassi saturi diminuiva significativamente le concentrazioni di PCR in pazienti ipercolesterolemici (31).

Nel Nurses' health study è stata anche valutata la relazione tra gli acidi grassi poliinsaturi n-3 (PUFAs), acido α -linolenico, acido eicosapentaenoico e acido deicosaesanoico con l' infiammazione cronica.

Le donne appartenenti al quintile più alto di PUFA n-3 mostrano concentrazioni più basse di PCR rispetto alle donne appartenenti al quintile più basso (33).

Inoltre, in un campione di 3042 soggetti sani, è stato dimostrato che il consumo di 300g di pesce a settimana si associa ad una riduzione della PCR del 33% rispetto a chi non mangia pesce (34).

Esposito et al. (35) hanno riportato una riduzione significativa dei valori di PCR, IL-6, IL-7, IL-18 e dell'insulino-resistenza nei pazienti affetti da sindrome metabolica (MetS) a cui era stata somministrata una dieta mediterranea con un contenuto di carboidrati del 50-60%, a basso contenuto di grassi 15-20% e ricca in fibre di cereali (400 g/die). Al contrario, Michalsen et al. (36) non hanno registrato alcun effetto legato alla somministrazione della dieta mediterranea ricca in olio d'oliva e acidi grassi polinsaturi n-3 sui markers infiammatori in pazienti coronaropatici.

1.4.2 Carboidrati, fibre, micronutrienti ed infiammazione

La quantità e la qualità dei carboidrati della dieta (CHO) ha effetto sul rischio di malattie CV attraverso la modifica delle concentrazioni dei lipidi nel sangue ed anche attraverso un effetto sui markers infiammatori. Un alto intake di CHO causa un aumento della glicemia postprandiale, che a sua volta può determinare l'aumento delle concentrazioni nel sangue dei radicali liberi, citochine proinfiammatorie e PRC (37).

Nello studio "Women's Health Study" l'indice glicemico ed il carico glicemico sono significativamente associate con la PCR. Le donne appartenenti al quintile più alto di indice glicemico e carico glicemico riportano concentrazioni di PCR più alte rispetto alle donne del quintile più basso (38).

È stata esaminata anche la relazione tra fibre e PCR. I dati del NHANES indicano che l'intake di fibre è inversamente associata con i livelli di PCR nel sangue (39). Un altro studio dimostra che la PCR è del 63% più bassa nei soggetti appartenenti al quartile più alto di intake di fibre totali rispetto ai partecipanti del quartile più basso (40).

Anche gli effetti antinfiammatori dei micronutrienti (vitamine e minerali) sono stati esaminati. È stata dimostrata una associazione inversa tra l'assunzione di vitamina E, vitamina B6, carotenoidi e magnesio con i livelli circolanti di PCR (41).

1.4.3 Frutta, verdura, noci ed infiammazione

Esmailzadeh et al riportano che, in 486 donne, con una età compresa tra i 40 ed i 60 anni, un intake più alto di frutta e verdura è associato con un rischio più basso di sindrome metabolica e con concentrazioni più basse di PCR, oltre che con una riduzione dell' IMC, della circonferenza vita e del rapporto vita/fianchi (42).

In un altro studio sono stati esaminati 63 uomini non fumatori. Tali soggetti, nello studio, sono stati divisi in 3 gruppi: 1. soggetti che consumavano 2 porzioni al giorno di verdure ricche in carotenoidi e frutta, 2. soggetti che consumavano 5 porzioni al giorno degli stessi alimenti, 3. soggetti che ne consumavano 8 di porzioni al giorno. È emerso che coloro i quali consumavano 8 porzioni al giorno di verdure ricche in carotenoidi e frutta avevano una riduzione significativa di PCR rispetto ai soggetti che ne consumavano 2 al giorno (43). L'effetto antinfiammatorio appare essere, quindi, attribuibile agli antiossidanti presenti nella frutta e nella verdura (44).

Infine, un alto consumo di noci, che sono ricche di acidi grassi monoinsaturi, PUFA ed arginina, è stato inversamente associato con il rischio CV. L'effetto benefico è attribuibile, almeno in parte, all'effetto antinfiammatorio (45).

2. SCOPI

È oramai ben documentata la stretta relazione esistente tra l'aterosclerosi, il rischio di sviluppare malattie cardiovascolari e lo stato infiammatorio.

Ciò che ancora è poco chiaro, grazie anche alla scarsità e alla controversia dei dati presenti in letteratura, sono le relazioni tra:

- Infiammazione ed obesità viscerale
- Infiammazione e compenso glicemico ed obesità nei diabetici
- Infiammazione e nutrizione

Pertanto, al fine di chiarire queste problematiche, gli scopi della linea di ricerca che ho seguito durante il corso di Dottorato sono stati:

1. valutare la relazione tra la concentrazione di PCR plasmatica e la distribuzione del grasso corporeo indipendentemente dal grado di adiposità in soggetti sani.
2. valutare in una popolazione di soggetti diabetici di tipo 2 se esiste una relazione indipendente tra sovrappeso e glicemia aumentata e concentrazioni plasmatiche di PCR dall'altra.
3. valutare l'effetto di vari componenti della dieta sulla concentrazione di PCR plasmatica ed in particolare: - le fibre dei cereali integrali e/o l'indice glicemico, - gli acidi grassi n-3.

Per raggiungere questi obiettivi, sono stati effettuati 5 studi di cui riporterò i risultati principali nei capitoli seguenti.

Poiché la metodica utilizzata per la valutazione della PCR è comune ai 5 protocolli, essa viene riportata una sola volta, prima della descrizione degli stessi.

In ogni studio, naturalmente, oltre al dosaggio della PCR, sono stati valutati anche gli altri fattori di rischio CV.

3. METODOLOGIE

3.1 PCR e metodi di dosaggio

Storicamente, la PCR è stata sempre dosata mediante metodi immunonefelometrici ed immunoturbidimetrici, idonei a rivelare stati infiammatori ed infettivi in atto, con un intervallo dinamico compreso tra 3-200 mg/L . Poiché le concentrazioni plasmatiche di PCR identificate per la valutazione del rischio cardiovascolare sono, in realtà, molto più basse di quelle che si riscontrano negli stati di infiammazione acuta, sono stati sviluppati metodi analitici che consentissero di dosare livelli di PCR al di sotto dei limiti di rilevazione dei metodi convenzionali. Questi nuovi metodi sono stati identificati come metodi ad alta sensibilità (hs-PCR), i quali possono dosare, con accuratezza e riproducibilità, concentrazioni ben al di sotto di 0.3 mg/L, che rappresenta il limite oltre il quale la PCR sembra avere una capacità predittiva di eventi cardiovascolari. Allo stato attuale, esistono molti metodi di dosaggio automatizzati, commercialmente disponibili con una sensibilità adeguata a misurare hs-PCR nell'intervallo di concentrazione necessario per la valutazione del rischio aterosclerotico in individui apparentemente sani. Tra questi metodi, soltanto alcuni rispondono ai requisiti di prestazione analitica recentemente indicati dall'organizzazione internazionale Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in collaborazione con l'American Heart Association (AHA) per la misurazione della PCR (46), per meglio caratterizzare l'errore totale accettabile per un suo dosaggio attendibile.

Per raggiungere i limiti di quantificazione desiderati, i ricercatori ed i produttori hanno continuato ad utilizzare sempre tecniche immunochimiche ma modificate allo scopo di aumentarne la sensibilità. Sono stati adoperati, essenzialmente, tre diversi approcci metodologici consistenti nel legare anticorpi anti-PCR ad un enzima (tecnica ELISA), ad un composto fluorescente o a particelle di polistirene (lattice-potenziato) e misurare il complesso antigene-anticorpo, rispettivamente, in colorimetria, fluorimetria, nefelometria o turbidimetria (47). L'ultimo approccio è stato molto perfezionato dai produttori perché è un metodo facilmente adattabile ad analizzatori automatici nei laboratori di chimica clinica. Attualmente, con un metodo hs-PCR si può attendibilmente dosare una concentrazione minore di 0.15 mg/L anche se non tutti i metodi in commercio lo permettono (48). Per raggiungere questa sensibilità analitica, si è proceduto ad un capillare lavoro di standardizzazione dei metodi di dosaggio a cura di organismi internazionali (CDC e ADA) e con materiali di riferimento, forniti, prima dalla World Health Organization (WHO) e, più recentemente, dalla International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), con i quali i produttori hanno calibrato i loro materiali di calibrazione e reagenti (49). Lo scopo di questa standardizzazione è stato, essenzialmente, quello di permettere una comparabilità dei risultati ottenuti con vari metodi e di verificarne la precisione. Dato che, come già detto, il valore di hs-PCR di un individuo è interpretato nel contesto di classi di rischio individuate da intervalli di concentrazione stabiliti sulla base di studi prospettici, si

comprende il perché la standardizzazione dei metodi di dosaggio rappresenti un punto cruciale. Infatti, una scarsa comparabilità dei metodi condurrebbe ad una erronea classificazione del rischio individuale. Un altro passo importante in questa operazione di standardizzazione è stato quello di rendere applicabili, alla routine di laboratori con un alto grado di automazione, metodi di dosaggio della PCR che erano utilizzati solo a scopo di ricerca. Il primo metodo automatizzato ad essere stato validato clinicamente è stato un metodo immunonefelometrico latice-potenziato (50), che è stato utilizzato in numerosi studi prospettici (51), sulla base dei quali la US Food and Drug Administration lo ha approvato come metodo di riferimento per il dosaggio della PCR nella valutazione del rischio di malattia CV (52). Attualmente, esistono in commercio altrettanti metodi di dosaggio della PCR, standardizzati contro questo metodo di riferimento e, tra questi, quello adoperato in questo studio, è un metodo immunoturbidimetrico latice-potenziato ad alta sensibilità (53).

3.2 Metodo utilizzato per il dosaggio della PCR

3.2.1 Principio del metodo

E' stato utilizzato il metodo CRP (latex) HS (Roche, Basilea, Svizzera) che è un metodo immunoturbidimetrico ad alta sensibilità (HS).

Il metodo usato è un test immunoturbidimetrico, nel quale l'intensità della luce diffusa dipende in misura determinante dal diametro e dall'indice di rifrazione delle particelle che diffondono la luce.

Su questo fenomeno si basano le reazioni immunologiche amplificate da particelle. Gli anticorpi, in pratica, vengono legati a particelle di polistirene (latice). Gli anticorpi vengono fissati alle particelle di latice per assorbimento oppure mediante legame covalente. Le particelle risultanti presentano numerosissimi punti di legame per l'antigene. La loro dimensione è di alcune volte superiore alla grandezza di un complesso antigene-anticorpo isolato. Il legame di queste strutture da parte di poche molecole di antigene determina già un notevole aumento della diffusione della luce. In tal modo diventa possibile determinare con tecnica turbidimetrica anche analiti la cui scarsa concentrazione non permetterebbe, altrimenti, una sufficiente diffusione della luce.

3.2.2 Descrizione del metodo

Il metodo CRP (latex) HS è basato sul principio del test immunologico di agglutinazione potenziata da particelle di lattice. In pratica gli anticorpi anti-PCR legati a microparticelle di lattice reagiscono con l'antigene del campione formando un complesso antigene-anticorpo che, dopo agglutinazione, viene valutato turbidimetricamente.

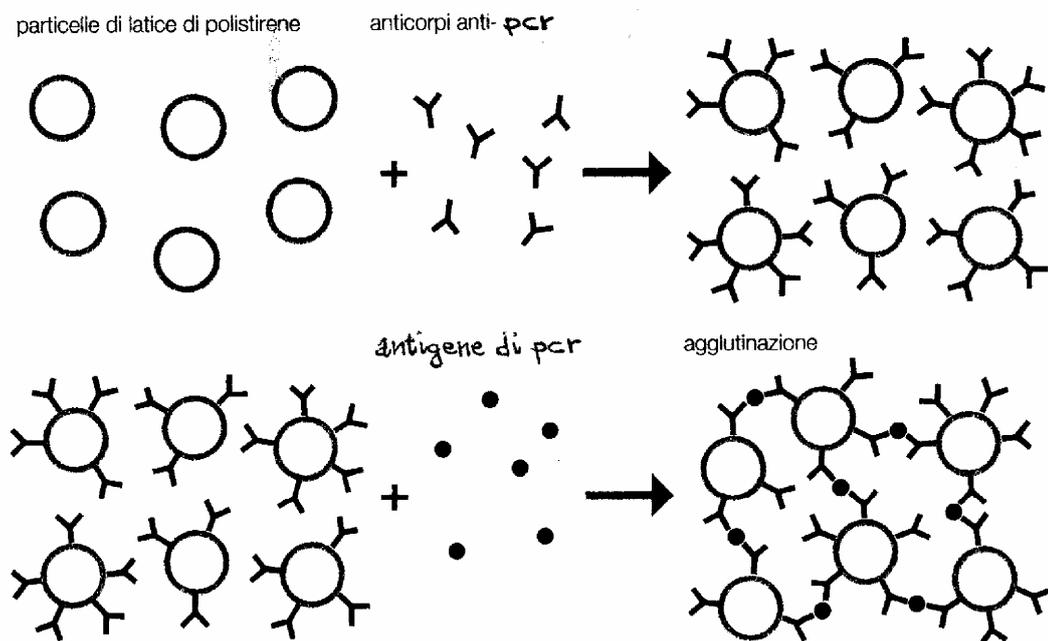


Figura 2. Reazione di agglutinazione

Con la turbidimetria viene misurata l'attenuazione dell'intensità di un raggio di luce incidente che attraversa una soluzione contenente aggregati antigene/anticorpo.

Questo metodo è stato scelto perché facilmente applicabile ad autoanalizzatori automatici. In particolare, esso è stato applicato ad un analizzatore automatico selettivo multifunzionale a struttura compatta

(Cobas Mira, Horiba ABX, Roma, Italia) (fig.3) con un software “user-oriented” che consente una facile interazione dell’operatore con lo strumento. Quest’ultimo è costituito da tre unità fondamentali: pipettatore, analizzatore, modulo di controllo e di comando. Il piano di lavoro è organizzato a rack portareagenti e portacampioni (fino a 90 campioni/30 reagenti) liberamente posizionabili dall’operatore e identificati automaticamente dallo strumento. Ciò comporta l’ottimizzazione di:

- 1) consumo giornaliero dei reattivi
- 2) sequenza di pipettamento
- 3) tempo uomo

Il volume medio di reagente per esame è di soli 150 µl con conseguente reale contenimento del costo a determinazione.

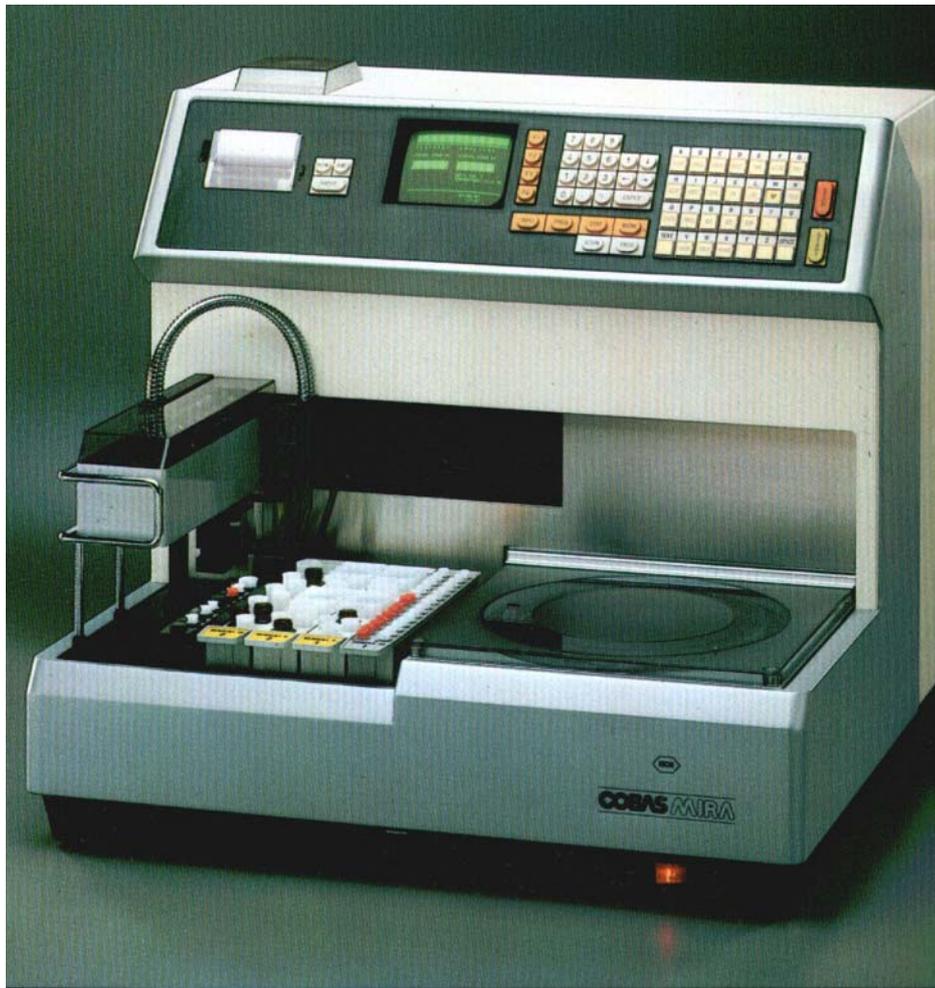


Figura 3. Cobas-Mira

Il software del Cobas-Mira procede alla elaborazione dei dati mediante un modello matematico con il quale si ottiene una formula che descrive il rapporto tra il segnale della luce diffusa e la concentrazione della proteina in esame. In particolare, per la PCR, è utilizzato uno schema di curva logit/log a 5 parametri per costruire la curva di calibrazione. In pratica, la funzione logit/log viene usata per linearizzare la curva di calibrazione: il logit dell'assorbanza del campione viene plottato contro il log della concentrazione nota degli standard e la concentrazione di PCR nei

campioni viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione (fig.4).

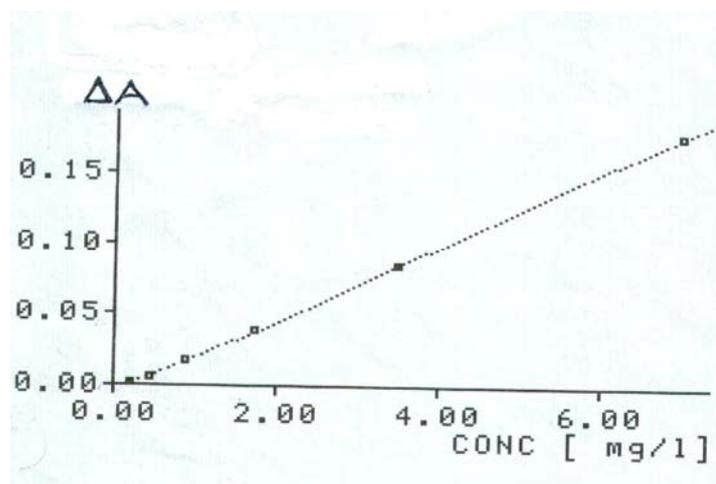


Figura 4. Curva di calibrazione

Il materiale di calibrazione utilizzato per la costruzione della curva standard a 7 punti, è stato standardizzato contro un materiale di riferimento fornito dalla International of Clinical Chemistry (IFCC) e precisamente il materiale CRM 470 (RPPHS- Reference Preparation for Proteinins in Human Serum).

3.2.3 Principio dell'esecuzione del test

Il metodo prevede una pre-diluizione degli standard e dei campioni con un tampone tris(idrossimetil)aminometano 16 mmol/L, pH 7,4. Successivamente, viene aggiunto un secondo reagente costituito da particelle di lattice rivestite di anticorpi murini monoclonati anti-PCR 0,1% in tampone glicina 50 mmol/L, pH 8,0.

Nella fig.5 sono riportati i dettagli del programma, relativo al metodo, impostato sull'autoanalizzatore Cobas-Mira.

Figura 5. Programma del Cobas-Mira

GENERAL
MEASUREMENT MODE: ABSORB
REACTION MODE : D-R-S-SR1
CALIBRATION MODE: LOGIT/LOG5
REAGENT BLANK : NO BLANK
CLEANER : NO

WAVELENGTH : 550 nm
DECIMAL POSITION: 3
UNIT : mg/l

ANALYSIS
DILUTION NAME: H2O
FACTOR: NO
TIME: NO
STD: MAIN INDIRECT
MAIN STD: 14.000 mg/l

POST DIL. FACTOR: 3.00
CONC. FACTOR: 1.50

SAMPLE CYCLE: 3
VOLUME: 30.0 μ l
DILUTION NAME: H2O
VOLUME: 15.0 μ l

REAGENT CYCLE: 1
VOLUME: 100 μ l

START R1 CYCLE: 9
VOLUME: 90.0 μ l
DILUTION NAME: H2O
VOLUME: 5.0 μ l

CALCULATION
SAMPLE LIMIT: NO

REAC. DIRECTION: INCREASE
CHECK: OFF
ANTIGEN EXCESS: NO

CONVERS. FACTOR: 1.00000
OFFSET: 0.00000

TEST RANGE LOW: OFF
HIGH: ON
NORM. RANGE LOW: NO
HIGH: NO

NUMBER OF STEPS : 1

CALC. STEP A : KINETIC
READINGS FIRST: 9 LAST: 15
REACTION LIMIT: NO

CALIBRATION
CALIB. INTERVAL: ON REQUEST

STANDARD	POS:	
1:	7.000	2: 3.500 mg/l
3:	1.750	4: 0.880 mg/l
5:	0.440	6: 0.200 mg/l
7:	0.000	8: NO mg/l

REPLICATE : DUPL
DEVIATION : NO

CORRECTION STD : NO

I dati specifici della performance del test sono stati forniti dalla documentazione Roche Diagnostic:

- precisione

La riproducibilità è stata determinata usando campioni umani e controlli, eseguiti in base ad un protocollo interno (n= 21), con i seguenti risultati:

	NELLA SERIE		TRA LE SERIE	
Campione	Media(mg/L)	CV%	Media(mg/L)	CV%
Livello di controllo 1	4,27	0,43	4,43	2,70
Livello di controllo 2	11,62	0,41	11,90	3,45
Pool di campioni umani 1	0,55	1,34	0,52	5,70
Pool di campioni umani 2	12,36	0,28	10,98	2,51

- sensibilità funzionale

Sensibilità funzionale: 0,11 mg/L.

La sensibilità funzionale rappresenta la concentrazione minima di PCR che può essere misurata in modo riproducibile con un coefficiente di variazione tra le serie inferiore al 10%.

- confronto tra metodi

Il confronto del test Tina- quant PCR HS di Roche su un analizzatore Roche/ Hitachi 917 (y) con metodo nefelometrico potenziato da particelle disponibile in commercio (x) in sieri umani ha prodotto le seguenti correlazioni (mg/L):

Regressione lineare

$$Y = 1,058x - 0,194$$

$$R = 0,996$$

$$S_{y.x} = 0,311$$

Numero dei campioni misurati: 51

Le concentrazioni dei campioni erano comprese tra 0,11 e 18,63 mg/L.

3.2.4 Controllo di qualità

Allo scopo di verificare l'imprecisione (CV %) e l'inaccuratezza (Bias %) del metodo nel nostro laboratorio, in ogni seduta analitica sono stati determinati campioni di controllo a concentrazione nota. Le concentrazioni coprivano l'intero range analitico riscontrato nella popolazione studiata. Per concentrazioni > 3 mg/L (livello 1, n=28) si è avuto un CV% totale di 2,7; un CV% nella serie di 1,5; un CV% tra le serie di 1,3 e un Bias% di 7,7. Per concentrazioni comprese tra 1 e 3 mg/L (livello 2, n=12) si è avuto un CV% totale di 5,1; un CV% nella serie di 3,4; un CV% tra le serie di 3,0 e un Bias% di 13. Infine, per concentrazioni < 1 mg/L (livello 3, n=11) si è avuto un CV% totale di 14,0; un CV% nella serie di 9,4; un CV% tra le serie di 7,8 e un Bias% di 2,0.

	M (mg/L)	CV% totale	CV% nella serie	CV% tra le serie
Liv.1(n= 28)	3,9 ± 0,1	2,7	1,5	1,3
Liv.2(n= 12)	0,97 ± 0,10	5,1	3,4	3,0
Liv.3(n= 11)	0,49 ± 0,10	4,0	9,4	7,8

Tab.1. Precisione

	V.A.(mg/L)	V.S.(mg/L)	Bias%
Liv.1(n= 28)	3,9	4,2	7,7
Liv.2(n= 12)	0,97	1,1	13
Liv.3(n= 11)	0,49	0,5	2,0

Tab.2. Accuratezza

Dove: V.S.= valore sperimentale

V.A.= valore atteso

$$\text{Bias}\% = \frac{\text{V.S.} - \text{V.A.}}{\text{V.A.}} * 100$$

3.2.5 Raccolta e conservazione dei campioni

Sono stati fatti prelievi di sangue, dopo 12 ore di digiuno, in vacutainer con anticoagulante (EDTA-Na₂). I prelievi sono stati poi centrifugati a temperatura ambiente per 15 minuti a 3000 rpm. Dopo la separazione, il plasma è stato suddiviso in aliquote che sono state congelate ad una temperatura di -80°C per pochi mesi.

Per quanto riguarda la stabilità dei campioni conservati, dalla letteratura internazionale (58), si deduce che i campioni conservati a -80°C sono stabili per oltre tre anni.

Allo scopo di non far subire uno shock termico ai campioni, al momento dell'analisi, essi sono stati portati, in successione, prima a -20°C , poi a $+5^{\circ}\text{C}$ ed infine a temperatura ambiente, agitati e centrifugati per 5 minuti, a temperatura ambiente, in centrifuga Eppendorf.

Il plasma così ottenuto è pronto per essere dosato.

3.2.6 Altre determinazioni

Le concentrazioni di colesterolo e trigliceridi sono state misurate mediante metodi enzimatici colorimetrici (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Le concentrazioni plasmatiche del glucosio e degli acidi grassi liberi sono state determinate mediante metodi enzimatici colorimetrici (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). I livelli plasmatici di insulina sono stati misurati con kits ELISA (Technogenetics, Milan, Italy).

Antropometria: il peso del corpo, l'altezza, la circonferenza vita, la circonferenza fianchi, il rapporto tra la circonferenza vita e la circonferenza fianchi (WHR), la pressione arteriosa sistolica (PAS) e la pressione arteriosa diastolica (PAD) sono state misurate secondo procedure standardizzate. L'indice di massa corporea (IMC) è stato calcolato secondo la seguente formula: peso (kg) / altezza (m²).

4. ANALISI STATISTICA

I dati sono riportati come $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$ o percentuale.

Il confronto tra le medie è stato eseguito mediante il t-test per dati non appaiati.

Il confronto tra le proporzioni è stato effettuato mediante il test del Chi-quadrato di Pearson (χ^2).

Per quanto riguarda le variabili non distribuite normalmente (trigliceridi), il confronto tra le medie è stato eseguito dopo trasformazione logaritmica.

I dati riportati in tabella rappresentano i valori originali non trasformati.

Tutti i valori di $p < 0,05$ (test a due code) sono stati considerati significativi.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte con il programma SPSS for Windows versione 12.0.

5. STUDI

5.1 L'adiposità addominale è associata con elevati livelli di Proteina C-Reattiva indipendentemente dall'IMC nei soggetti sani non obesi.

Studio n.1 (Pubblicazione in esteso n.1 accettata su Diabetes Care. 2009; 32:1734-1736).

Introduzione

Molti studi hanno mostrato che le misure dell'adiposità addominale, così come la circonferenza vita ed il rapporto tra la circonferenza vita e la circonferenza fianchi sono maggiormente associate con il rischio di diabete, malattie cardiovascolari e morte rispetto all' IMC, che è una misura dell'adiposità generale (13) (14) (15). Infatti, l'aumento del rischio cardiometabolico associato all'obesità addominale è solamente in parte spiegato dai maggiori fattori di rischio cardiovascolari. Un importante ruolo aggiuntivo può essere attribuito all'infiammazione subclinica (16) (55). La PCR ultrasensibile è un forte marker del rischio cardiovascolare anche nei soggetti con livelli normali di colesterolo, tanto che si è pensato di espandere l'utilizzo delle statine aldilà dell'iperlipidemia, in quanto esse, oltre, ad abbassare i livelli di colesterolo, riducono anche le concentrazioni plasmatiche di PCR (56).

Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare la relazione tra la concentrazione di PCR nel sangue e la distribuzione del grasso corporeo, indipendentemente dal grado di adiposità.

Soggetti

Hanno partecipato allo studio 350 soggetti con adiposità addominale ($WHR \geq 0,9$ negli uomini e $\geq 0,85$ nelle donne) e 199 soggetti senza adiposità addominale ($WHR < 0,9$ negli uomini e $< 0,85$ nelle donne). I due gruppi sono stati selezionati in modo che fossero comparabili per IMC (± 1 kg/m²), età (± 5 anni) e sesso. I criteri di esclusione sono stati: diabete, IMC > 35 o < 20 kg/m², uso di statine o farmaci antinfiammatori non steroidei, infezioni acute o croniche, e precedente malattia cardiovascolare.

Disegno sperimentale

Le analisi sono basate su un disegno di studio caso-controllo. I casi sono i soggetti con adiposità addominale, i controlli sono quelli senza adiposità addominale. A tutti i soggetti è stato prelevato, al mattino, dopo 12 ore di digiuno, sangue per la determinazione di glucosio, colesterolo totale, HDL-colesterolo, trigliceridi e PCR.

Risultati

Come atteso sulla base dei criteri di selezione dei partecipanti, il gruppo di controllo ha un'età ed un indice di massa corporea simili ai soggetti con adiposità addominale (44.9 ± 6.4 vs 44.7 ± 6.2 anni, $p = ns$; 24.8 ± 2.5 vs 24.7 ± 2.2 kg/m², $p = ns$), ma una circonferenza vita (83.3 ± 6.7 vs 96.4 ± 6.0 , $p = 0.01$) ed un rapporto tra la circonferenza vita e la circonferenza fianchi

(0.85 ± 0.05 vs 1.07 ± 0.08 , $p = 0.01$) significativamente più alti (tab. 4). Per quanto riguarda la concentrazione di PCR, i soggetti con adiposità addominale mostrano livelli significativamente più elevati rispetto a quelli senza adiposità addominale. Per esplorare ulteriormente la relazione tra la PCR e l'obesità addominale, è stata valutata anche la distribuzione di PCR nei due gruppi considerando la proporzione di soggetti con PCR > 3 mg/L, soggetti a rischio più elevato di sviluppare malattia cardiovascolare come suggerito dalla letteratura internazionale.

Tale proporzione di soggetti con PCR > 3 mg/L è significativamente più alta nel gruppo con adiposità addominale rispetto a quelli senza adiposità addominale (tab. 4). Sono stati determinati anche altri principali fattori di rischio CV. I trigliceridi, la pressione del sangue sistolica e diastolica, gli HOMA-IR e l'acido urico sono significativamente più alti nei partecipanti con adiposità addominale rispetto al gruppo di controllo. I valori di HDL-colesterolo sono, invece, significativamente più bassi nei soggetti con adiposità addominale rispetto a quelli senza adiposità addominale. Infine, la prevalenza di sindrome metabolica è 2 volte più alta nei soggetti con adiposità addominale rispetto al gruppo di controllo. Sono invece comparabili nei due gruppi la percentuale di fumatori e le concentrazioni di fibrinogeno (tab. 4). Questi risultati sottolineano che gli individui con adiposità addominale, anche a parità di IMC, presentano non solo valori più elevati di PCR, ma anche valori più elevati degli altri fattori di rischio cardiovascolare.

Tab. 4 Valori di PCR e profilo del rischio cardiovascolare nei soggetti con e senza adiposità addominale

	senza adiposità addominale	con adiposità addominale	p
n	199	350	
Età (anni)	44.9±6.4	44.7±6.2	Ns
Sesso maschile (%)	76.4	85.7	0.01
IMC (kg/m ²)	24.8±2.5	24.7±2.2	Ns
Circonf. vita (cm)	83.3±6.7	96.4±6.0	0.01
WHR	0.85±0.05	1.07±0.08	0.01
PCR (mg/L)	1.53±1.74	1.96±2.16	0.04
HDL-colesterolo (mg/dl)	49.6±12.8	45.3±12.6	0.01
Trigliceridi (mg/dl)	116±59	149±81	0.01
Acido urico (mg/dl)	4.5±1.1	4.8±1.6	0.01
PAS (mmHg)	132±15	135±16	0.02
PAD (mmHg)	84±9	87±9	0.01
HOMA-IR	1.77±0.90	1.99±1.21	0.03
Fibrinogeno (mg/dl)	302±62	295±61	Ns
Percentuale con PCR>3 mg/L	10.1	21.4	0.01
Attuali fumatori	50.8	52.0	Ns
Ex fumatori	22.6	27.1	Ns
Percentuale con MetS	10.1	25.9	0.01

Discussione

L' adiposità addominale, cioè una distribuzione del grasso corporeo prevalentemente localizzata intorno alla vita ed ai visceri addominali, è stata associata con un aumento del rischio di malattie CV, rispetto ad una distribuzione prevalentemente sottocutanea del grasso corporeo. Questa relazione è in parte spiegata dalla elevata frequenza con cui i soggetti con

adiposità addominale presentano altre condizioni come ipertensione arteriosa, iperlipidemia e diabete, che caratterizzano un elevato rischio cardiovascolare (16). Tuttavia, i comuni fattori di rischio non sono in grado di spiegare totalmente la relazione tra obesità addominale e PCR. Un ruolo lo può avere sicuramente l'infiammazione subclinica.

Questo studio si propone di valutare la relazione tra adiposità addominale ed elevati valori di PCR, indipendentemente dal grado totale di adiposità.

I risultati dello studio hanno chiaramente dimostrato come l'adiposità addominale, caratterizzata da elevati valori del rapporto tra la circonferenza vita e la circonferenza fianchi, in assenza di qualsiasi differenza di indice di massa corporea, si associ ad elevati valori di PCR.

I risultati di questo studio espandono le conoscenze esistenti dimostrando che l'adiposità addominale si associa ad elevati valori di PCR indipendentemente dalla qualità totale del grasso corporeo e suggerendo, quindi, la possibilità che questa associazione possa in parte mediare l'aumento di rischio cardiovascolare osservato nei soggetti con adiposità addominale.

Studi precedenti hanno dimostrato che i valori di PCR sono positivamente associati alla quantità di tessuto adiposo dell'organismo, ma non permettono di distinguere l'effetto della distribuzione del grasso. Una possibile spiegazione per i più elevati livelli circolanti di PCR nei soggetti con adiposità addominale è rappresentata dal fatto che elevate concentrazioni di adipochine prodotte dal tessuto adiposo viscerale

vengano immesse direttamente nel circolo portale raggiungendo elevate concentrazioni nel fegato ed espletando così una azione di stimolo sulla produzione epatica di PCR. Nei soggetti con adiposità addominale questo meccanismo sarebbe quantitativamente rilevante.

Inoltre, in accordo con quanto già dimostrato in letteratura, i valori di alcuni parametri identificati come fattori di rischio CV tra cui: il colesterolo totale, i trigliceridi, la pressione arteriosa sistolica e diastolica, sono significativamente più alti nei soggetti con adiposità addominale rispetto al gruppo di controllo. Questo conferisce solidità ai risultati e sottolinea ulteriormente il ruolo dell' adiposità addominale come fattore di rischio CV.

In conclusione, i risultati ottenuti sottolineano che una distribuzione centrale del grasso corporeo è caratterizzata da uno stato proinfiammatorio come suggerito dagli aumentati valori di PCR. Questa associazione è indipendente dal grado di adiposità totale e può contribuire a spiegare l'aumentato rischio CV riportato nei soggetti con adiposità addominale.

5.2 Relazione tra livelli di PCR circolanti, obesità e grado di compenso glicemico in soggetti con diabete di tipo 2

Studio n.2.

Introduzione

Alcuni studi riportano che soggetti con diabete mellito hanno valori più alti di PCR e la PCR è stata altresì associata ad un aumento del rischio di diabete (56-61).

Poco è conosciuto sui fattori che nel paziente diabetico possono influenzare l'aumento della PCR. In parte, la PCR è alta nei diabetici per effetto dell'obesità. Comunque, in alcuni studi, anche dopo correzione per obesità, la PCR rimane più alta nei soggetti diabetici, probabilmente per il ruolo dell'iperglicemia e dell'insulino resistenza, che caratterizzano i soggetti con diabete di tipo 2. Pochi studi sono stati effettuati per indagare sulla relazione tra la PCR ed il compenso glicemico nei diabetici (62).

Flores et al (69) esaminando una popolazione di soggetti: - diabetici (n=97); - obesi (n=108); - diabetici/obesi (n=78); e - sani (n=102), dimostrò che solo i gruppi di soggetti obesi e obesi/diabetici avevano una PCR più elevata e non il gruppo di soggetti solo diabetici. Quindi concluse che la PCR era solo associata alla misurazione dell'obesità, ovvero, IMC e circonferenza vita e non al diabete. Rodriguez (63) e King (64) hanno dimostrato una stretta associazione tra HbA1c e PCR nei soggetti diabetici.

Questi studi, però, avevano come limiti una scarsa numerosità. La PCR non era stata dosata con una metodica ad alta sensibilità ed, inoltre, non erano stati presi in esame tutti i possibili fattori confondenti.

Da ciò quindi, lo scopo di questo studio è stato quello di verificare la relazione tra la concentrazione di PCR circolante, l'obesità e il grado di compenso glicemico in soggetti con diabete di tipo 2.

Soggetti

Hanno partecipato allo studio 497 soggetti (252 uomini e 245 donne) con diabete mellito di tipo 2. Le caratteristiche generali dei partecipanti allo studio sono riportate nella tabella 5.

I criteri di esclusione sono state: - insufficienza renale, - uso di farmaci antinfiammatori, - infezioni acute o croniche e – precedenti eventi CV.

Tab. 5 Caratteristiche generali dei partecipanti allo studio

Età (anni)	58.1±7.7
Sesso maschile(%)	51
IMC (kg/m ²)	30.5±5.6
Circonferenza vita (cm)	101.1±11.9
Colesterolo totale (mg/dl)	202±46
HDL-colesterolo (mg/dl)	47.6±11.5
Trigliceridi (mg/dl)	166.4±168
HbA1c (%)	7.4±1.7
PCR (mg/L)	3.8±4.9
Proporzione di PCR > 3 mg/L	36.4
Fumatori (%)	25
Uso di statine (%)	21
Uso di metformina (%)	26
Uso di insulina (%)	53

Risultati

Sono stati studiati 497 soggetti con diabete di tipo 2; come è da attendersi, in una popolazione di pazienti con diabete tipo 2, i soggetti erano sovrappeso e/o obesi, ipertrigliceridemicici e con un grado di compenso glicemico mediocre. Le concentrazioni di PCR correlavano positivamente e significativamente con i livelli di HbA1c ($p=0.005$), con la circonferenza vita ($p=0.0001$) e con l'IMC ($p=0.0001$) (tab.6).

Tab. 6 Correlazione tra la PCR e le altre variabili

		PCR	HbA1c	Età	Circ. vita	IMC	Col. tot.	Trigl	HDL-col.	insulina
PCR	r	1	0.135	0.044	0.316	0.388	0.072	0.009	-0.07	0.002
	p	-	0.005	0.328	0.0001	0.0001	0.112	0.849	0.095	0.971

Dividendo la popolazione studiata in soggetti obesi e non obesi (definiti come soggetti con IMC rispettivamente ≥ 30 e < 30 kg/m²), si notava come i soggetti obesi fossero per lo più di sesso femminile ed avessero, come ci si poteva attendere, valori più alti di circonferenza vita. La percentuale di PCR e la percentuale di soggetti con PCR ≥ 3 mg/L erano significativamente più alti nei diabetici obesi vs i non obesi ($p < 0.001$) (tab. 7). L'età, i livelli di HbA1c, l'insulina, il colesterolo totale, i trigliceridi, le HDL-colesterolo, la percentuale di fumatori, la percentuale di soggetti che usano terapia con statina, metformina e insulina non erano significativamente diverse nei due gruppi (tab. 7).

Tab. 7 Parametri dei soggetti obesi e non obesi

	Soggetti obesi (IMC \geq 30 kg/m ²)	Soggetti non obesi (IMC < 30 kg/m ²)	P
Numerosità	223	274	
Sesso maschile (%)	37.2	61.7	0.0001
Età (anni)	57.9 \pm 7.9	58.2 \pm 7.6	Ns
Circonferenza vita (cm)	109.1 \pm 10.4	94.5 \pm 8.7	0.001
HbA1c	7.6 \pm 1.7	7.3 \pm 1.6	Ns
Insulina (mg/dl)	13.4 \pm 15	16.8 \pm 14	Ns
Colesterolo totale (mg/dl)	207.5 \pm 49.4	197.6 \pm 42.1	Ns
Trigliceridi (mg/dl)	158.5 \pm 121.4	176.3 \pm 211.9	Ns
HDL-colesterolo (mg/dl)	47.2 \pm 11	47.9 \pm 11	Ns
PCR (mg/L)	5.07 \pm 5.9	2.8 \pm 3.8	0.0001
PCR \geq 3 mg/L (%)	51.1	24.5	0.0001
Fumatori (%)	46.4	53.6	Ns
Terapia con statina (%)	41.7	58.3	Ns
Terapia con metformina (%)	58.1	41.9	Ns
Terapia con insulina (%)	51	49	Ns

Nella tabella 8 sono invece riportati i valori ottenuti dividendo la popolazione esaminata in base ai valori della circonferenza vita: alta \geq 102 cm per i maschi e \geq 88 cm per le femmine, e bassa < 102 cm per i maschi e < 88 per le femmine. I soggetti con obesità addominale erano per lo più donne, avevano una età media più alta ed un valore di IMC più alto. I valori di PCR e la proporzione di soggetti con PCR \geq 3 mg/L erano significativamente maggiori nel gruppo con obesità addominale (p < 0.0001). Non erano significativamente diversi, invece, i livelli di HbA1c, l'insulinemia, il colesterolo totale, i trigliceridi, l' HDL-colesterolo, la

percentuale di fumatori e le percentuali delle terapie con statina, metformina e insulina.

Tab. 8 Parametri dei soggetti con alta o con bassa circonferenza vita

	Soggetti con circonferenza vita alta > 102 cm nei maschi > 88 cm nelle femmine	Soggetti con circonferenza vita bassa ≤ 102 cm nei maschi ≤ 88 cm nelle femmine	P
Numerosità	175	317	
Sesso maschile (%)	32.3	82.2	0.0001
Età (anni)	58.8±7.3	57.0±8.1	0.019
IMC (kg/m ²)	32.9±5.4	26.1±2.7	0.0001
HbA1c	7.6±1.7	7.2±1.5	Ns
Insulina (mg/dl)	32.9±5.4	26.1±2.7	Ns
Colesterolo totale (mg/dl)	203.5±42.9	199.3±50.5	Ns
Trigliceridi (mg/dl)	162.5±110	175.4±240.6	Ns
HDL-colesterolo (mg/dl)	47.8±11	46.9±12	Ns
PCR (mg/L)	4.4±5.4	2.8±3.8	0.0001
Percentuale PCR ≥3 mg/L	44.8	21.7	0.0001
Percentuale fumatori	39.8	44.8	Ns
Percentuale terapia con statina	22.8	18.4	Ns
Percentuale terapia con metformina	58.9	41.4	Ns
Percentuale terapia con insulina	32.2	67.8	Ns

Dividendo la popolazione studiata in soggetti con HbA1c < 7 e ≥ 7, si poteva notare come i soggetti con scompenso glicemico avessero una circonferenza vita e valori di PCR significativamente più alti. Come era da

attendarsi, anche la proporzione di soggetti con PCR ≥ 3 mg/L era significativamente più alta a parità di valori confondenti misurati (tab. 9).

Tab. 9 Parametri dei soggetti con HbA1c < 7 e ≥ 7

	Soggetti con HbA1c < 7	Soggetti con HbA1c ≥ 7	P
Numerosità	190	241	
Sesso maschile (%)	46.5	53.5	Ns
Età (anni)	58.5 \pm 7.7	58.0 \pm 7.7	Ns
IMC (kg/m ²)	29.9 \pm 5.3	30.9 \pm 5.5	Ns
Circonferenza vita (cm)	99.6 \pm 12	102.4 \pm 11	0.001
HbA1c	5.9 \pm 0.7	8.5 \pm 1.3	Ns
Insulina (mg/dl)	10.9 \pm 8.9	20.4 \pm 8.1	Ns
Colesterolo totale (mg/dl)	198.8 \pm 53	204.7 \pm 40	Ns
Trigliceridi (mg/dl)	157.0 \pm 211	171.7 \pm 113	Ns
HDL-colesterolo (mg/dl)	48.4 \pm 12.7	47.1 \pm 10.7	Ns
PCR (mg/L)	2.8 \pm 3.1	4.4 \pm 5.2	0.0001
PCR ≥ 3 mg/L (%)	30.5	43.6	0.007
Fumatori (%)	48.3	51.7	Ns
Terapia con statina (%)	37.9	62.1	Ns
Terapia con metformina (%)	37.3	62.7	Ns
Terapia con insulina (%)	43.8	56.2	Ns

Per valutare se le relazioni dell'IMC, della circonferenza vita e della PCR fossero indipendenti l'una dall'altra e dalle altre variabili analizzate, è stata effettuata una analisi multivariata. L'analisi è stata fatta utilizzando come variabile dipendente la PCR ed utilizzando due modelli, uno che includeva l'IMC e l'altro la circonferenza vita per la forte col linearità tra le sue variabili. Questa analisi confermava un effetto significativo dell'IMC, della

circonferenza vita e del compenso del diabete (emoglobina glicata ≥ 7) sui valori di PCR indipendentemente dalle altre variabili analizzate (tab. 10a e tab. 10b).

Regressione lineare multipla

Tab. 10a

	B	Errore standard	P
Terapie per il diabete	0.0001	0.009	Ns
Insulinemia	-0.002	0.001	Ns
Statine	-0.042	0.026	Ns
Fumo	0.003	0.015	Ns
Circonferenza vita	0.003	0.001	0.0001
Sesso	0.026	0.015	Ns
HbA1c ≥ 7	0.035	0.015	0.02

Tab. 10b

	B	Errore standard	P
Terapie per il diabete	0.003	0.009	Ns
Insulinemia	-0.001	0.001	Ns
Statine	-0.039	0.026	Ns
Fumo	0.007	0.015	Ns
IMC	0.006	0.001	0.0001
Sesso	0.005	0.016	Ns
HbA1c ≥ 7	0.037	0.015	0.012

Discussione

Nel nostro lavoro abbiamo dimostrato che l'indice di massa corporea, la circonferenza vita e l'iperglicemia contribuiscono all'aumento della PCR nei soggetti diabetici indipendentemente l'una dall'altra e dagli altri fattori confondenti analizzati. Questo è uno dei pochi studi che valuta il contributo di questi 3 fattori insieme sui livelli di PCR, correggendo per un gran numero di possibili confondenti compresa la terapia del diabete, la terapia con statina, che come ben sappiamo possono incrementare i valori della PCR. Un precedente studio (64) conferma la relazione tra iperglicemia e PCR, ma la PCR non era stata dosata con metodica ultrasensibile. La relazione tra la PCR e l'emoglobina glicosilata si aveva solo nei soggetti molto scompensati, non veniva valutato l'effetto della circonferenza vita e della terapia per il diabete. L'adiposità è un determinante della produzione epatica della PCR, in quanto c'è evidenza che l'IL-6, fattore che stimola la produzione della PCR dagli epatociti, sia secreta in maniera proporzionale alla quantità di massa grassa, in particolare quella della regione addominale. Un altro determinante della aumentata produzione di PCR nei diabetici potrebbe essere l'iperglicemia, in quanto lo stress ossidativi sull'endotelio promuove l'infiammazione ed è incrementato dall'iperglicemia. Il nostro studio ci suggerisce che l'infiammazione non solo è implicata nello sviluppo del diabete, ma si può incrementare a seconda dei livelli di iperglicemia, una volta che il diabete è comparso. Il disegno cross-sectional dello studio non ci permette di determinare se i

nostri risultati siano dovuti ad una relazione causa-effetto o se le relazioni osservate siano mediate da altre condizioni associate al diabete come l'insulino-resistenza o l'aterosclerosi subclinica. Studi prospettici sono necessari per valutare il significato causale di queste relazioni.

In conclusione, questo studio dimostra che in pazienti con diabete di tipo 2 l'adiposità addominale e totale ed il compenso glicemico sono significativamente associati ad un aumento della PCR. Questi risultati potrebbero avere importanti implicazioni per la fenotipizzazione dei soggetti diabetici a maggior rischio cardiovascolare.

5.3 Valutazione degli effetti a medio termine della dieta ricca in cereali integrali sui principali fattori di rischio cardiovascolare in individui sani.

Studio n.3.

Introduzione

Numerosi studi epidemiologici hanno osservato che la dieta ricca in cereali integrali ha un effetto protettivo sia nei confronti delle malattie cardiovascolari che del diabete mellito di tipo 2.

L'effetto protettivo dei cereali integrali o di alcuni dei suoi componenti biologicamente attivi quali fibre, vitamine ad azione antiossidante, folati, oligominerali (magnesio), relativamente al rischio cardiovascolare e del diabete tipo 2 sono stati indagati in numerosi studi osservazionali che hanno dimostrato una relazione inversa tra consumo di fibre, Vit. E, folati e sviluppo di queste malattie.

Gli studi prospettici indicano che un elevato consumo di fibre riduce significativamente il rischio di eventi coronarici fatali indipendentemente da altre variabili della dieta e che un incremento di fibre di 6 e 10 g/giorno riduce gli eventi coronarici fatali rispettivamente del 25% e del 55% (66) (70).

Gli individui che consumano cereali integrali rispetto a quelli che li consumano nella forma raffinata presentano un più basso rischio di eventi coronarici (68), tuttavia l'effetto protettivo cardiovascolare osservato non è

spiegato dalle sole fibre (69) (70). I cereali integrali, ad esempio il frumento, sono composti per l' 80% da endosperma (la principale componente della farina raffinata, ricca in amido e proteine ma povera in micronutrienti), per il 15% da crusca (la principale sorgente di fibre, micronutrienti, antiossidanti e fitomolecole) e per il 5% da germe (la parte embrionale del chicco), non è quindi chiaro il contributo di ciascuna di queste componenti sulla salute dell' uomo. Recentemente Jensen (71) ha valutato l'effetto dell'intake di cereali integrali e dell'aggiunta di crusca e di germe, le due componenti dei cereali integrali, sull'incidenza di malattia coronaria in una popolazione di 42850 maschi sani di età compresa tra i 40 e i 75 anni. I risultati di questa ricerca hanno dimostrato che i soggetti nel più alto quintile di consumo di cereali integrali rispetto a quelli nel quintile più basso, avevano un rischio di eventi coronarici che era del 18% più basso e che l'aggiunta di crusca lo riduceva addirittura del 30%; mentre, l'aggiunta di germe non aveva alcun beneficio. Questo studio suggerisce, quindi, che la crusca protegge dal rischio cardiovascolare e che l'effetto è correlato alla sua ricchezza in molecole bioattive, incluse quelle antiossidanti e alcuni minerali (magnesio). D'altra parte, gli individui che hanno una dieta più ricca in vitamine E, C e carotenoidi hanno anche una più bassa mortalità per eventi coronarici (72).

Per cui lo scopo di questo studio è stato quello di valutare in individui sani:

- 1- l'effetto a medio termine di una dieta ricca in fibre derivanti dai cereali integrali sui principali parametri metabolici,

2- i possibili meccanismi attraverso cui questo tipo di dieta influenza i principali fattori di rischio CV.

Soggetti

Hanno partecipato allo studio 15 soggetti di ambo i sessi (3 femmine e 12 maschi), con età compresa tra i 35 ed i 60 anni e con un IMC ≥ 25 e < 30 kg/m² (tab. 11). Sono stati esclusi dallo studio gli individui affetti da patologie gastroenteriche, da diabete mellito e dislipidemia familiare.

Tab.11 Caratteristiche generali dei partecipanti allo studio

Età (anni)	54±8
IMC (kg/m ²)	27.4±3.0
Trigliceridi (mg/dl)	105±34
Colesterolo totale (mg/dl)	205±40
Colesterolo HDL (mg/dl)	51±17

Disegno sperimentale

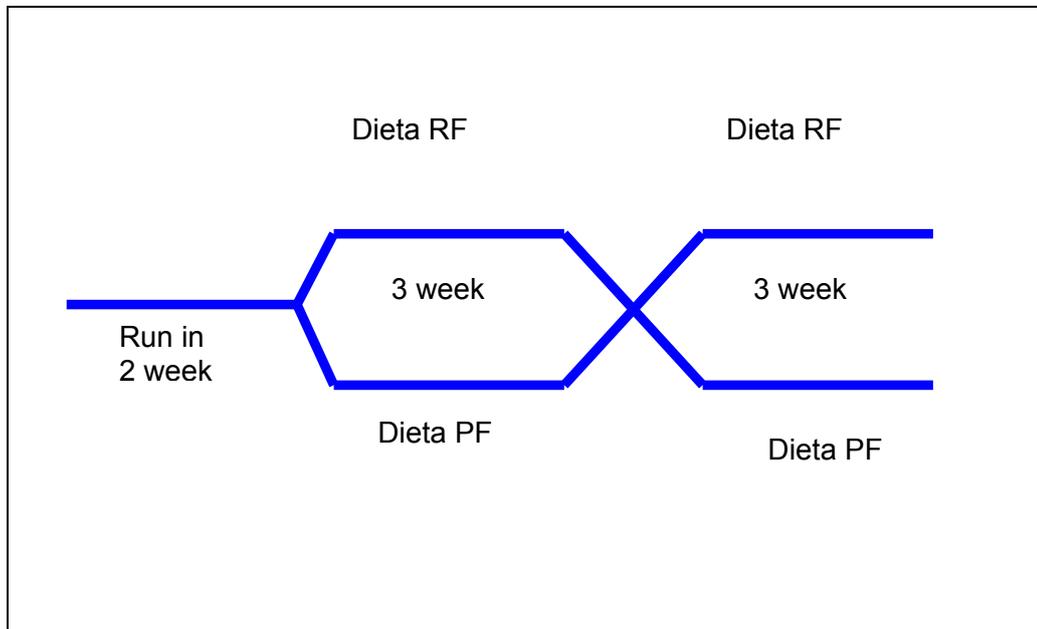
Lo studio e' stato effettuato secondo un disegno di tipo cross-over.

I partecipanti allo studio dopo 2 settimane di run-in, in cui è stata valutata la dieta abituale mediante il 7 day food record, sono stati assegnati in modo random a due diete isoenergetiche della durata di 3 settimane ciascuna : una ricca in fibre (dieta RF) e l'altra di controllo ridotta in fibre (dieta PF), simili per composizione in altri nutrienti (fig.6).

La dieta ricca in fibre contiene circa 10g di fibre in più rispetto a quella di controllo, derivanti quasi totalmente dai cereali integrali. La composizione delle diete seguite durante il run-in e i 2 periodi sperimentali sono riportati nella tabella 12.

Per ciascun trattamento dietetico sono stati preparati schemi dietetici giornalieri isoenergetici.

Fig. 6 Disegno sperimentale dello studio



Tab. 12 Composizione delle diete consumate durante lo studio

	Run-in	Pasto RF	Pasto PF
Energie (kcal)	2029±443	2248±344	2154±381
Proteine (g)	80±17	92±15	86±15
CHO totali (g)	277±68	283±29	282±40
CHO solubili (g)	67±18	77±15	74±19
Grassi (g)	81±19	79±19	76±20
SAFA (g)	27±7.3	25.9±7.1	25.1±7.5
MUFA (g)	32.6±9.3	32±4	31±8
Colesterolo totale (mg/di)	268±52	192±73	174±72
Fibre totali (g/di)	20±6	32±4	20±4
Fibre da cereali (g/di)	9.5±3.2	23.1±2.3	9.8±1.7

L'adesione al trattamento dietetico è stato valutato mediante il diario alimentare (7 day food record) somministrato durante la prima e l'ultima settimana di ciascun trattamento dietetico.

Alla fine di ciascun periodo di trattamento, i partecipanti hanno consumato, dopo 12 ore di digiuno, un pasto test (test meal) rappresentativo delle due diete. I test meal differivano solo per la quantità di fibre totali (test meal RF 22.35g vs test meal PF 14.45g) e di fibre da cereali (test meal RF 12.65g vs 4.75g). Si è proceduto così alla misurazione dei principali parametri metabolici ed ormonali a digiuno e durante le 4 ore successive al pasto test.

Risultati

In accordo con il disegno dello studio, l'introito di fibre durante la dieta a base di prodotti integrali paragonato a quello della dieta a base di prodotti raffinati è stato significativamente maggiore, con una differenza in fibre di circa 13g al giorno ($p < 0.001$). Il peso corporeo dei partecipanti si è mantenuto stabile dall'inizio alla fine del periodo dello studio (77 ± 13 kg), come pure la pressione arteriosa sistolica (120 ± 18 mmHg) e diastolica (75 ± 9 mmHg). Non sono state riscontrate a digiuno differenze significative dei valori di hs-PCR tra i due trattamenti, ma le concentrazioni plasmatiche di hs-PCR riscontrate dopo il pasto ricco in fibre (1.8 ± 2.3 mg/L) erano inferiori rispetto a quelle ottenute dopo la dieta povera in fibre (2.9 ± 4.1 mg/L), anche se non raggiungevano la significatività ($p=0.38$). Anche il glucosio, l'insulina, il c-peptide, gli FFA e l'HOMA-IR a digiuno non erano differenti dopo le due diete (tab.13).

Inoltre, comparati al periodo di run-in, entrambe le diete sperimentali migliorano il colesterolo totale e le LDL-colesterolo (la dieta RF del 14% e 19%; la dieta PF del 10% e 15%, rispettivamente). Ancora, dopo 3 settimane di dieta le concentrazioni del colesterolo totale e delle LDL-colesterolo diminuiscono nei soggetti normolipidemicici del 4.3% e del 5%, rispettivamente. I trigliceridi e l' HDL-colesterolo non subivano variazioni (tab. 14).

Tab. 13 Parametri clinici e metabolici dei partecipanti allo studio dopo il run-in e le due diete

	Run-in	Dieta RF	Dieta PF	P
Peso (kg)	77.7±13.4	77.6±12.6	77.5±12.7	Ns
PAS (mmHg)	120.4±17.6	117.9±20.5	119.3±18.0	Ns
PAD (mmHg)	75.2±8.9	74.6±9.8	74.7±9.6	Ns
Glucosio (mmol/L)	5.21±0.49	5.02±0.97	5.42±0.52	Ns
Insulina (pmol/L)	-	65.58±25.44	63.48±16.68	Ns
C-peptide (nmol/L)	-	0.27±0.11	0.27±0.08	Ns
HOMA-IR	-	2.51±1.32	2.58±0.88	Ns
FFA (g/L)	-	0.11±0.03	0.13±0.05	Ns
PCR-hs (mg/L)	-	1.8±2.3	2.9±4.1	Ns

Tab. 14 Concentrazioni dei lipidi a digiuno alla fine del run-in e delle due diete nei partecipanti allo studio

	Run-in	Dieta RF	Dieta PF	P
Colesterolo totale (mg/dl)	5.27±1.04	4.53±0.68	4.73±0.70	0.03
Trigliceridi (mg/dl)	1.21±0.38	1.08±0.37	1.12±0.35	Ns
LDL-colesterolo (mg/dl)	3.53±0.92	2.94±0.59	3.09±0.65	0.04
HDL-colesterolo (mg/dl)	-	1.09±0.31	1.13±0.35	Ns

Discussione

Lo studio dimostra che una dieta ricca in fibre riduce la PCR anche se in maniera non significativa. Gli unici parametri che si riducono significativamente sono il colesterolo totale e l' LDL-colesterolo.

Questo studio è uno dei pochi che ha valutato gli effetti del consumo di pasti ricchi in fibre integrali sui parametri metabolici a digiuno e nel periodo postprandiale in soggetti sani.

Un dato interessante è che una dieta ricca in fibre migliora il colesterolo. I dati disponibili in letteratura sono contrastanti in relazione all'impatto del grano non raffinato sul colesterolo plasmatico (73) (74). Tali incongruenze potrebbero essere dovute alle caratteristiche ed al numero dei soggetti studiati, ai valori basali di colesterolo, alle diete abituali, alla quantità di fibre consumate ed anche al tipo di grano utilizzato.

Il glucosio e l'insulina non subiscono variazioni significative dopo le due diete sperimentali. Questa scoperta è in contrasto con i risultati ottenuti da altri studi su individui in sovrappeso, i quali mostrano un miglioramento della sensibilità all'insulina dopo una dieta con cereali integrali (75) (76). Queste differenze potrebbero dipendere dalla differenza dei livelli di insulina nel sangue dei partecipanti, dal tipo di cereale integrale utilizzato nella dieta, dal peso del corpo dei partecipanti agli studi ed, infine, dalla durata dello studio.

Lo scarso numero dei partecipanti, probabilmente, non ci permette di osservare differenze significative dei valori di PCR, che, comunque, si

riduce dopo la dieta ricca in fibre, come dimostrato già in altri lavori (39)
(40).

5.4 Effetti di prodotti da forno arricchiti in acidi grassi n-3, folati, betaglucani e tocoferoli in soggetti con dislipidemia.

Studio n. 4. (In via di pubblicazione)

Introduzione

È ormai noto che differenti componenti della dieta possono avere effetti positivi sulla riduzione del rischio cardiovascolare agendo attraverso meccanismi diversi. Gli acidi grassi n-3 a lunga (DHA-EPA) ed a corta catena (ALA), anche in quantità moderata, riducono gli eventi cardiovascolari agendo, probabilmente, tramite i loro possibili effetti antinfiammatori. Le fibre vegetali agiscono tramite molteplici meccanismi (riduzione delle LDL-colesterolo, della pressione arteriosa, dell'insulinoreistenza, della glicemia). I tocoferoli agiscono, invece, tramite la loro attività antiossidante ed i folati tramite gli effetti sui livelli di omocisteina (77-83).

Non sempre la dieta abituale riesce a fornire un apporto adeguato di tutti i costituenti su riportati. Pertanto, il poter avere a disposizione alimenti fortificati in questi diversi principi attivi, in modo da poter raggiungere sicuramente apporti dimostratisi efficaci, potrebbe essere di grande aiuto nella prevenzione cardiovascolare, specie in fase primaria ed in soggetti normali o con lievi alterazioni metaboliche.

Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare se un periodo di dieta (4 settimane) con l'inserimento quotidiano di alimenti naturali contenenti β -glucani (3.6g/dì), folati (1600 μ g/dì), n-3 a lunga catena (800mg/dì), n-3 a corta catena (400mg/dì), tocoferoli (120mg/dì) sia capace di modulare positivamente diversi fattori di rischio cardiovascolare e di infiammazione come la PCR in soggetti con lievi alterazioni del metabolismo lipidico nei confronti di una dieta uguale, ma senza la presenza dei principi attivi su menzionati.

Soggetti

Hanno partecipato allo studio 16 soggetti, di cui 9 uomini e 7 donne, di età compresa tra 20-65 anni (tab. 15). I partecipanti allo studio avevano una lieve dislipidemia ed erano normotolleranti al glucosio. Sono stati esclusi dallo studio i soggetti con diabete, precedenti eventi cardiovascolari, trattamento farmacologico capace di influenzare il metabolismo lipidico e le altre variabili esaminate in questo studio, come insufficienza renale (creatininemia > 1.7mg/dl), anemia.

Tab. 15 Caratteristiche dei partecipanti allo studio

Sesso (M/F)	9/7
Età (anni)	48 \pm 3
IMC (Kg/m ²)	26 \pm 0.7
Colesterolo totale (mg/dl)	218 \pm 7
Trigliceridi totali (mg/dl)	168 \pm 19
HDL-colesterolo (mg/dl)	41 \pm 3

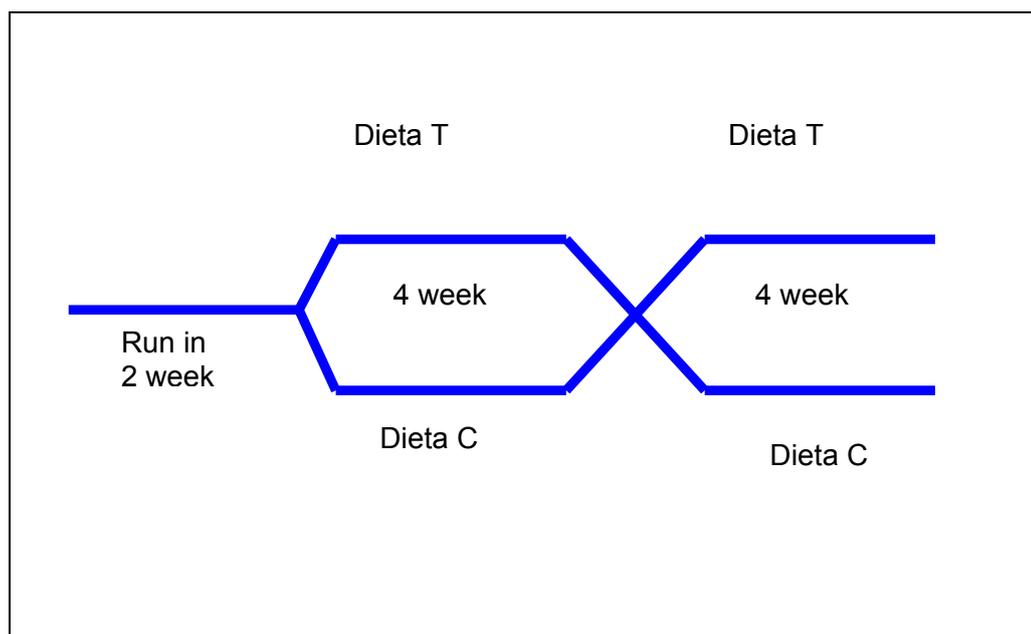
Disegno sperimentale

Lo studio è stato effettuato secondo un disegno di tipo cross-over, randomizzato, in doppio cieco. Durante un periodo di osservazione di 2 settimane (run-in), in cui i soggetti hanno seguito la loro dieta abituale, era prevista la compilazione di un diario alimentare della durata di 7 giorni.

Attraverso il calcolo dei diari è stato possibile valutare le abitudini alimentari e in particolare l'introito calorico, elemento indispensabile per stabilire la quota energetica da attribuire ad ogni partecipante, affinché il peso corporeo fosse mantenuto stabile per tutta la durata dello studio.

Dopo il run-in, i soggetti sono stati assegnati, in modo casuale, ad uno dei due periodi di intervento: dieta test (dieta t) contenente gli alimenti funzionali arricchiti dei principi attivi da testare o dieta di controllo (dieta c) contenente gli stessi prodotti ma non arricchiti in principi attivi che si presentavano del tutto identici agli alimenti di controllo. Alla fine del primo periodo, della durata di quattro settimane, ciascun soggetto è passato, per altre quattro settimane, all'altro tipo di dieta (fig. 7). Il peso corporeo è stato misurato settimanalmente e l'adesione alla dieta è stata valutata mediante il calcolo dei diari alimentari che i soggetti hanno compilato alla fine di ciascun periodo di dieta.

Fig. 7 Disegno sperimentale dello studio



Diete: Le diete consigliate erano isoenergetiche per far sì che il peso corporeo non variasse durante lo studio ed avevano la stessa composizione percentuale di nutrienti, eccetto per il contenuto di principi attivi aggiunti in uno dei due periodi: acidi grassi n-3, betaglucani, folati e tocoferoli. In particolare la composizione della dieta consigliata era in linea con le raccomandazioni per la prevenzione delle malattie cardiovascolari: proteine 16%, lipidi 35% di cui saturi <10%, carboidrati 49% di cui solubili 15%, colesterolo <300 mg/giorno. In uno dei due periodi, nell'ambito della dieta abituale dei partecipanti allo studio, sono stati inseriti i prodotti arricchiti dei principi attivi da testare, in particolare sono state inserite due porzioni di pane (160g), 1 brioche (50g) e 1 merenda (50g) al giorno, in modo da raggiungere un apporto giornaliero di n-3 a lunga catena di 800 mg, di n-3 a corta catena di 400 mg, di betaglucani di 3.6g, di folati di 1600µg, di

tocoferoli di 120mg in aggiunta alla quota di tali principi nutritivi presente nella dieta abituale(tab. 16). Nell'altro periodo, sempre nell'ambito della dieta abituale, sono stati inseriti gli stessi prodotti utilizzati nella dieta test non arricchiti dei principi attivi da testare (dieta controllo). Pertanto, le due diete differivano solo per la presenza di questi principi attivi (tab.17).

Tab. 16 Composizione in principi attivi degli alimenti funzionali da testare nello studio

Principi attivi	Brioche Colazione (50g)	Pane Pranzo e Cena (160g)	Merenda (50g)	Totale
Omega-3 (DHA-EPA)	200 mg	400 mg	200 mg	800 mg
Omega-3 (ALA)	100 mg	200 mg	100 mg	400 mg
Betaglucani	0.9 g	1.8 g	0.9 g	3.6 g
Folati	400 µg	800 µg	400 µg	1600 µg
Tocoferoli	30 mg	60 mg	30 mg	120 mg

Tab. 17 Composizione media delle diete consigliate e di quelle seguite dai partecipanti allo studio

Nutrienti	DIETA TEST		DIETA CONTROLLO	
	Dieta Consigliata	Dieta Seguita [°] M±ES	Dieta Consigliata	Dieta Seguita [°] M±ES
Energia (kcal)	1986	2003±62	1986	1934±80
Proteine (g)	79	76±2	79	73±3
Lipidi (g)	78	77±2	78	75±2
SFA (g)	23	23±1	23	22±1
MUFA (g)	33	33±1	33	31±2
PUFA (g)	9	8±0,4*	7	7±0,5
PUFA n-3 (g)	1,3	2 ±0,01*	~0,5	0,5±0,01
Colesterolo (mg)	205	220±14	205	224±12
Carboidrati (g)	258	269±11	258	258±13
solubili (g)	80	78±3	80	82±7
Fibra (g)	30	28±0,5*	27	24±1
fibra insolubile(g)	10	9±0,4	10	9±1
fibra solubile (g)	8	7±0,2*	5	4±0,3
Folati (µg)	1967	1679±52*	367	158±26
Tocoferoli (mg)	128	121±2*	8	8±1
° Valutazione mediante diario alimentare di 7 giorni				
*p<0.05 verso dieta di controllo				

Pasto test: Il pasto standard, utilizzato alla fine dei due periodi, aveva lo stesso apporto calorico e la stessa composizione: 1029 Kcal, Proteine 12 %, Carboidrati 28 %, Grassi 60 %, Colesterolo 621 mg. Differiva, secondo il trattamento dietetico in corso, soltanto per il contenuto in acidi grassi della

serie n-3 (1.2 g), betaglucani (2 g), folati (1074 µg) e tocoferoli (74 µg) forniti dagli alimenti da testare.

Esso era costituito, alla fine della dieta test, da una brioche con principi attivi (50g), un sandwich preparato con pane contenente principi attivi (110g) e una frittata preparata con 2 uova, pecorino romano (18g) e burro (50g); alla fine della dieta di controllo il pasto era uguale, ma preparato con i prodotti senza i principi attivi.

Risultati

I partecipanti allo studio hanno avuto una ottima adesione ad entrambi i trattamenti. La composizione delle diete seguite, valutata con il 7 days food record, è risultata sovrapponibile a quella consigliata. Come atteso, la dieta test seguita dal nostro campione era diversa rispetto alla dieta controllo solo per quanto riguarda i principi attivi presenti negli alimenti testati; le differenze, valutate mediante test t, sono risultate statisticamente significative ($p < 0.05$) per quanto riguarda appunto gli apporti di: PUFA totali, PUFA n-3, fibra totale, fibra solubile, folati e tocoferoli (tab. 17).

Come atteso il peso corporeo dei partecipanti si è mantenuto stabile dall'inizio alla fine del periodo di studio (dieta Test : 72.8 ± 2.8 kg all'inizio e 72.7 ± 2.7 kg alla fine; dieta Controllo: 72.8 ± 2.7 kg all'inizio e 72.7 ± 2.7 kg alla fine). La pressione arteriosa sistolica e diastolica non variava alla fine dei 2 trattamenti dietetici (sistolica: 113 ± 10 mmHg vs. 111 ± 10 mmHg, diastolica: 73 ± 5 mmHg vs. 75 ± 6 mmHg).

La tabella 18 mostra i livelli plasmatici di colesterolo e di trigliceridi alla fine del run-in e dei due periodi di intervento. Si può osservare che i livelli di trigliceridi si riducono significativamente alla fine della dieta test sia nei confronti del basale ($p < 0.05$) sia nei confronti della dieta di controllo ($p < 0.05$), con una riduzione percentuale nei confronti di quest'ultima dell'11%. Non ci sono differenze significative, invece, per il colesterolo plasmatico. Nella tabella sono riportati anche gli altri parametri metabolici, determinati a digiuno, alla fine del run-in e dei due trattamenti. Glucosio, insulina, C-peptide, FFA e PCR non mostrano differenze. La proteina C reattiva, determinata anche durante la fase post-prandiale, non ha mostrato differenze significative dopo i due trattamenti dietetici (dati non mostrati).

Tab. 18 Parametri metabolici e PCR a digiuno, alla fine del run-in e dopo i due periodi di trattamento

	Run-in	Dieta T	Dieta C	P
Colesterolo totale (mg/dl)	218±7.3	204±6.4	208±5.3	Ns
Trigliceridi totali (mg/dl)	168±20	138±16	154±14	0.04
HDL-colesterolo(mg/dl)	41±3.4	39±3.1	41±3.2	Ns
Glucosio (mg/dl)	106±3.7	102±2.7	100±3.4	Ns
Insulina ($\mu\text{m}/\text{mU}$)	16±1.0	15±0.8	15±0.9	Ns
C-peptide (mg/dl)	0.7±4.0	0.7±4.1	0.7±3.6	Ns
FFA(mg/dl)	0.4±3.2	0.4±4.6	0.4±4.5	Ns
PCR (mg/L)	2.8±1.0	2.8±1.1	2.5±1.1	Ns

Discussione

Nonostante sia dimostrato in letteratura un effetto dei vari principi attivi da noi testati su parametri dell'inflammazione (89) (90), nel nostro studio non abbiamo osservato sostanziali differenze a digiuno e nel periodo postprandiale riguardo i valori di PCR dopo i due diversi approcci dietetici. Va comunque sottolineato che i partecipanti allo studio avevano tutti valori di PCR bassi. Un effetto benefico più importante sulla PCR di questi alimenti arricchiti in principi attivi potrebbe verosimilmente evidenziarsi in soggetti con livelli più elevati di PCR spesso presenti in soggetti diabetici e/o con sindrome metabolica.

I risultati di questo studio dimostrano che l'inserimento in una dieta equilibrata di alimenti arricchiti con dosi moderate di acidi grassi n-3 a corta e a lunga catena, β -glucani, folati e tocoferoli è in grado di ridurre i livelli plasmatici dei trigliceridi.

Esso si esplica sia a digiuno con una riduzione dell'11% sia nella fase postprandiale con una riduzione del 6%. L'effetto sui trigliceridi è quasi sicuramente da attribuirsi agli acidi grassi n-3, la cui azione ipotrigliceridemizzante è stata ampiamente dimostrata, anche se in genere con dosi più elevate di 2-3g al giorno (77) (84). A differenza degli studi precedenti, questo studio dimostra che si può ottenere una significativa riduzione dei trigliceridi anche con dosi più basse di n-3, tali da poter essere incorporate in alimenti funzionali senza modificarne le caratteristiche organolettiche, e che tale riduzione si è ottenuta utilizzando

non solo acidi grassi a lunga catena, caratteristici dei grassi derivanti dal pesce, ma anche acidi grassi a media catena di origine vegetale. Nel nostro studio non si sono avute variazioni del colesterolo ed in particolare del colesterolo LDL. Dai dati della letteratura si sa che gli acidi grassi n-3 determinano, insieme alla riduzione dei trigliceridi plasmatici, anche un aumento, certamente non desiderato, del colesterolo LDL di circa il 10% (85). Il fatto che ciò non si verifichi nel nostro studio può essere attribuito alle basse dosi utilizzate di acidi grassi n-3 o anche al possibile effetto del β -glucano che, per la sua azione ipocolesterolemizzante, potrebbe aver controbilanciato l'effetto negativo degli acidi grassi n-3 sul colesterolo LDL (86). La dieta con alimenti funzionali induceva, inoltre, alla fine del pasto una riduzione del senso di fame con conseguente aumento di quello di sazietà da mettere verosimilmente in relazione con l'arricchimento in β -glucani.

Per quanto riguarda il metabolismo glicidico, nel nostro studio non si sono avuti effetti sulla glicemia postprandiale, nonostante la presenza dei β -glucani. Si è avuta, invece, una riduzione nei livelli di insulina in particolare nella prima ora dopo il pasto. La riduzione della insulinemia, a parità di glicemia, suggerisce un miglioramento dell'azione insulinica.

In sintesi, il profilo dei fattori di rischio cardiovascolare risulta complessivamente migliorato dall'intervento con gli alimenti funzionali da noi testati con un'ottima compliance da parte dei pazienti e in assenza di effetti collaterali. Inoltre, i risultati da noi ottenuti con l'utilizzo di prodotti

arricchiti con questi principi attivi rispecchiano solo una parte dei loro potenziali effetti utili sulla salute in generale e sul profilo cardiovascolare in particolare, dal momento che numerosi parametri potenzialmente modificabili non sono stati misurati (aggregazione piastrinica, contrattilità vascolare, antiaritmia ecc.). Pertanto si può ipotizzare che nei paesi in cui il rischio cardiovascolare a livello di popolazione è significativamente aumentato l'uso di questi prodotti da forno arricchiti in principi attivi potrebbe contribuire a ridurre la PCR ed a migliorare il profilo di rischio cardiovascolare.

5.5 Valutazione degli effetti a medio termine di una dieta arricchita di prodotti a base di cereali integrali e/o con basso indice glicidico sulla sensibilità insulinica e sui parametri della sindrome metabolica.

Studio n. 5.

Introduzione

L'associazione tra la composizione del grano intero e la riduzione del rischio di diabete 2 e di altre malattie croniche è ormai ben dimostrata. Tuttavia, i meccanismi attraverso i quali questi prodotti agiscono non sono ancora completamente definiti (miglioramento della sensibilità all'insulina, lo stress ossidativo, il basso grado di infiammazione). Alcuni studi hanno valutato gli effetti dei prodotti di grano singolarmente o una combinazione di alcuni di questi sui parametri su menzionati. Tuttavia, non si è ancora ben capito se una dieta che contiene prodotti a base di frumento integrale abbia effetti benefici sulla risposta glicemica, insulinemia e su tutti i fattori che determinano malattie cardiovascolari. Si pensa, in particolare, che una dieta contenente prodotti a base di cereali integrali e/o a basso indice glicemico influenzi tutti i fattori su menzionati, soprattutto in soggetti con sindrome metabolica. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto a lungo termine di una dieta contenente cereali "health", ossia integrali e/o con un basso indice glicemico vs una dieta di controllo (cereali raffinati e con un alto indice glicemico), sul metabolismo del

glucosio e sui fattori dell'infiammazione e di rischio CV in soggetti con sindrome metabolica.

Soggetti

Il presente studio è tutt'ora in corso. Fino ad ora, hanno partecipato allo studio 41 soggetti (20 maschi e 21 femmine) affetti da sindrome metabolica secondo i criteri NCEP-ATPIII che prevede la presenza di 3 o più delle seguenti condizioni:

1. circonferenza vita > 102 cm per gli uomini e > 88 cm per le donne
2. trigliceridemia a digiuno ≥ 1.7 mmol/L
3. colesterolo HDL a digiuno < 1.0 mmol/L per gli uomini e < 1.3 mmol/L per le donne
4. glicemia a digiuno compresa tra 5.6 e 6.9 mmol/L
5. pressione arteriosa $\geq 130/85$ mmHg o $< 130/85$ mmHg, se in trattamento con farmaci antipertensivi.

Per ora, soltanto in 35 individui sono stati dosati i lipidi, mentre in 28 è stata dosata la PCR. I soggetti inclusi nello studio hanno una età compresa tra i 40 ed i 70 anni, un IMC tra 26-40kg/m², ipertensione stabile per opera di farmaci ed assenza di eventi CV passati. I criteri di esclusione, invece, sono stati: presenza di diabete, uso di farmaci che possano influenzare il glucosio e l'insulina plasmatici, uso di farmaci antinfiammatori, insufficienza renale o epatica ed, infine, presenza di anemia.

Nella tabella 19 sono riportate le caratteristiche generali dei partecipanti allo studio.

Tab. 19 Caratteristiche generali dei partecipanti allo studio

Età (anni)	58 ± 9
IMC (kg/m ²)	32.2 ± 5.8
Circonferenza vita (cm)	108 ± 14
PAS (mmHg)	134 ± 21
PAD (mmHg)	85 ± 12
Glucosio (mg/dl)	100 ± 16
Colesterolo (mg/dl)	216 ± 46
Trigliceridi (mg/dl)	153 ± 67
HDL-colesterolo (mg/dl)	43 ± 11

Disegno sperimentale

Lo studio è stato condotto secondo un disegno a gruppi paralleli, randomizzato, che ha previsto un periodo iniziale di osservazione della durata 4 settimane (run-in) durante il quale i pazienti hanno continuato a seguire la loro dieta abituale e le loro abitudini di vita. La dieta è stata registrata mediante la compilazione di un diario alimentare della durata di 7 giorni (7 day food record). Attraverso il calcolo dei diari è stato possibile valutare le abitudini alimentari e in particolare l'introito calorico, elemento indispensabile per stabilire la quota energetica da attribuire ad ogni partecipante, affinché il peso corporeo fosse mantenuto stabile per tutta la

durata dello studio. alla fine del periodo di run-in, i soggetti sono stati randomizzati ad uno dei due regimi alimentari, “Dieta Health” che prevede alimenti a base di cereali integrali e a basso indice glicemico, e “Dieta Control” contenente alimenti a base di cereali raffinati e ad alto indice glicemico; ciascuno della durata di 12 settimane. La randomizzazione è stata effettuata con stratificazione per età (± 5 anni) ed IMC (25-35 kg/m²). I partecipanti sono stati visitati da un medico e da una dietista al tempo zero, alla fine del periodo di run-in, e dopo 4, 8, 12 settimane dall’inizio dello studio. Ad ogni visita venivano rilevati il peso del corpo, la circonferenza vita, la pressione arteriosa e prelevato un campione di sangue per la misurazione a digiuno delle concentrazioni plasmatiche di glucosio, colesterolo totale ed HDL e trigliceridi. La PCR, invece, veniva misurata solo al tempo 0 del run-in ed ai tempi 0, 120 e 180 dopo le 12 settimane delle diete. Le due diete differivano esclusivamente per il tipo di cereali, integrali a basso indice glicemico o raffinati ad alto indice glicemico. La quantità di cereali rappresentava il 60-80% del consumo quotidiano di carboidrati totali, era calcolato sulla base della dieta seguita durante il periodo di run-in, e valutato mediante il 7 day food record. Il restante 20-40% dei carboidrati totali era costituito da frutta e verdura in base all’abituale dieta quotidiana di ciascun partecipante.

Le diete consigliate erano isoenergetiche per far sì che il peso del corpo non variasse durante lo studio ed avevano la stessa composizione

percentuale di nutrienti ma differivano per la quantità dei cereali (tab. 20) (tab.21).

Tab. 20 Composizione media delle diete consigliate ai partecipanti allo studio

Nutrienti	Dieta Health	Dieta Control
Energia (kcal)	1998	1986
Proteine totali (%)	20.8	17.7
CHO totale (%)	52.3	53
Lipidi totali (%)	26.9	29.3
Saturi (%)	6.5	7.3
Colesterolo totale (mg/dl)	149.5	197.8
Fibre totali (g/di)	45.4	23.7
Fibre da cereali (g/di)	32.2	13.2
Carico glicemico	114	207
I.G. medio	42	75

Tab. 21 Cereali utilizzati nelle due diete

Dieta Health	Dieta Control
Bastoncini di crusca Fiocchi di frumento integrale Pane integrale a pasta acida (80+10%) o segale (10%)	Riso soffiato Pane bianco
Pasta integrale Gnocchi integrali	Riso brillato Purea di patate
Biscotto di avena	Grissini
Orzo perlato Mais in scatola	Pizza Patate Polenta

Come si vede, le differenze principali si osservano nel quantitativo di fibra, in particolare di quella derivante dai cereali (32.2g al giorno nella dieta health vs 13.2g al giorno nella dieta control), nell' IG (42.3% nella dieta health vs 74.8% nella dieta control) e nel carico glicemico (11463.4 nella dieta health vs 20788.2 nella dieta control).

Test meal: il test meal era di due tipi:

- *Pasto test di controllo* , corrispondente alla composizione della dieta control;
- *Pasto test Health*, corrispondente alla composizione della dieta health.

Il pasto test somministrato alla fine del periodo di run-in era uguale per tutti i partecipanti (pasto test di controllo) mentre quello somministrato alla fine del periodo di trattamento aveva la stessa composizione della dieta seguita nel periodo sperimentale (tab.22).

Tab. 22 Composizione dei test meal

Nutrienti	Test meal (Health) (%ET)	Test meal (Control) (%ET)
Energia (Kcal)	916	915
Proteine (g)	44 (19)	38 (17)
Lipidi (g)	28 (28)	30 (30)
SAFA (g)	8 (8)	10 (10)
MUFA (g)	12 (12)	14 (14)
PUFA (g)	2 (2)	3 (3)
Colesterolo totale (mg)	72	94
Carboidrati (g)	121 (50)	130 (54)
Solubili (g)	28 (12)	50 (21)
Fibra (g)	12	12

Risultati

Lo studio è ancora in fase di effettuazione. Fin ora sono stati esaminati 41 soggetti con sindrome metabolica, ma come già detto prima non si hanno ancora tutti i risultati dei dosaggi fatti. L' IMC misurato a tutti i soggetti a fine run-in e dopo le 12 settimane non ha avuto variazioni significative, così come la circonferenza vita a fine run-in ed alla fine delle due diete.

Non si è riscontrata nessuna differenza significativa nei due gruppi nemmeno nel glucosio a digiuno, nei trigliceridi, nel colesterolo totale, nelle HDL-colesterolo e nella PCR dopo il run-in e dopo le 12 settimane di dieta. Solo l' area incrementale delle HDL-colesterolo è diversa alla fine del trattamento nei due gruppi ($p=0.031$).

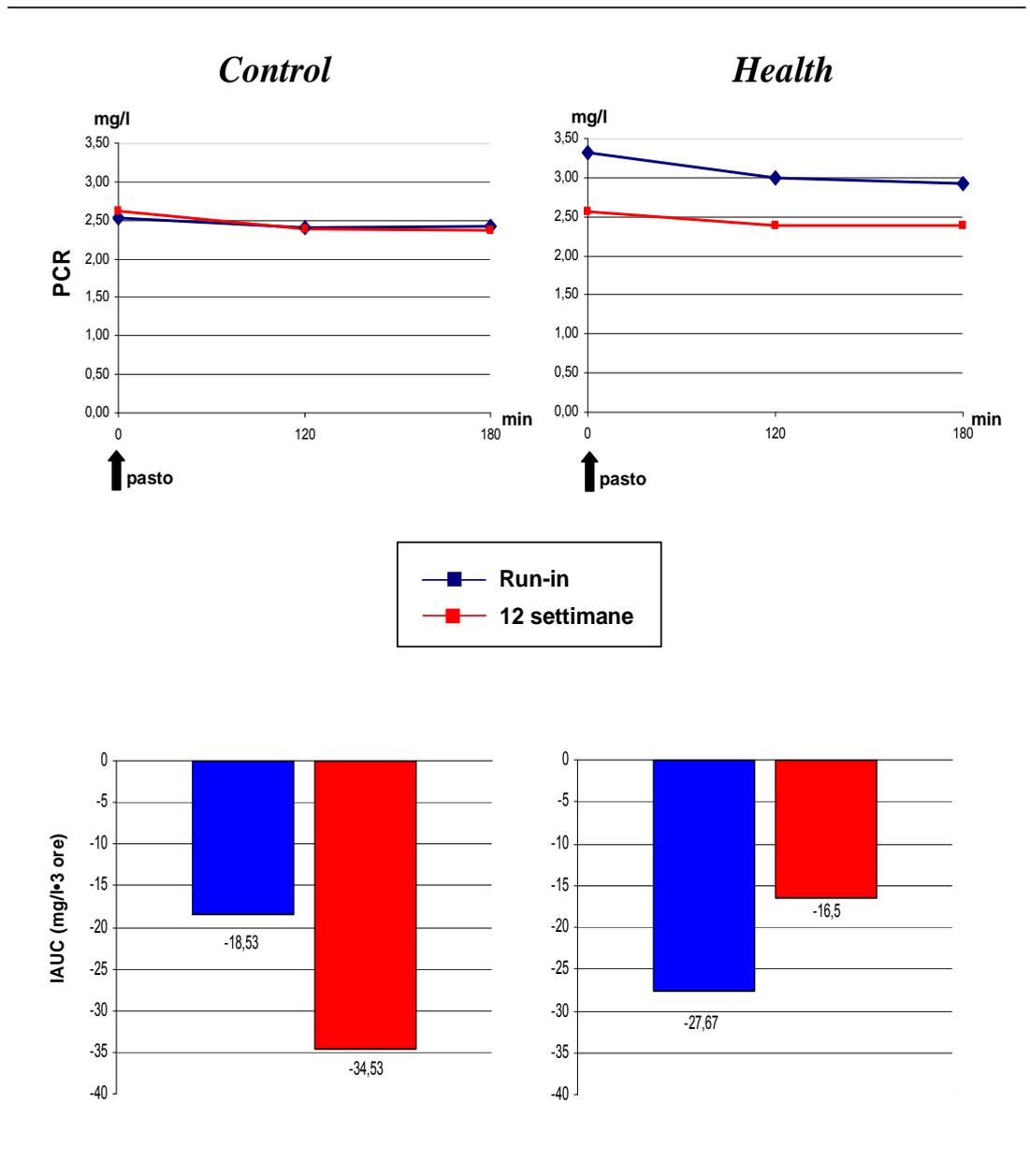
Nessuna significatività si è osservata nemmeno considerando solo i soggetti appartenenti al gruppo control. Mentre nei soggetti che hanno seguito la

dieta health si raggiunge la significatività nella differenza tra IMC a fine run-in e quello alla fine della dieta health ($p=0.04$). Ai limiti della significatività invece è la differenza delle aree incrementali delle HDL-colesterolo a fine run-in e alla fine della dieta health ($p=0.056$) (tab. 24). Nella figura 8 sono riportati, anche, i valori di PCR dopo il periodo di run-in e alla fine delle 2 diete, control ed health, con le rispettive aree incrementali, ai tempi 0, 120 e 180. I soggetti che hanno seguito la dieta control non hanno variazioni delle concentrazioni di PCR al run-in e dopo la dieta, la quale rimane stabile. Il gruppo dei soggetti che hanno, invece, seguito la dieta health, mostrano concentrazioni di PCR più basse rispetto al run-in, anche se non raggiungono la significatività statistica. C'è da dire che, comunque, i soggetti che hanno seguito la dieta health partivano da una concentrazione di PCR più elevata al run-in, rispetto ai soggetti che hanno seguito la dieta control.

Tab. 24 Caratteristiche principali dei partecipanti allo studio al run-in e dopo 12 settimane di intervento

	Dieta Control (n=20)			Dieta Health (n=21)		
	Run-In	12 Sett	P	Run-In	12 Sett	P
Sesso (M/F)	9/11			11/10		
Età (anni)	60±7	-	-	57±10	-	-
IMC (kg/m ²)	31±5.3	30.8±5.5	Ns	33±6.2	32.7±6.2	0.04
CV (cm)	105.3±12.1	104.8±12.5	Ns	110.6±15.6	110.1±15	Ns
Glicemia (mg/dl)	107.4±8.6	105.7±11.9	Ns	102.1±11.1	104.5±13.6	Ns
PCR (mg/L)	2.5±1.6	2.6±1.7	Ns	3.3±3.2	2.6±1.5	Ns
Trigliceridi (mg/dl)	139.2±41.3	136.9±49.0	Ns	165.6±170	149.9±67.2	Ns
Colesterolo Totale (mg/dl)	202.5±36.6	208.0±29.9	Ns	197.6±53	201.9±57.7	Ns
HDL-colesterolo (mg/dl)	37.8±8.4	37.5±7.2	Ns	39.6±12.2	37.7±10.4	Ns

Fig. 8 Valori di PCR prima e dopo dieta e aree incrementali



Discussione

Nel nostro studio, abbiamo dimostrato che dopo una dieta di 12 settimane ricca in cereali health (integrali e/o a basso indice glicemico) si riduce significativamente l'indice di massa corporea ($p=0.04$). La perdita di peso del gruppo health potrebbe essere spiegata, probabilmente, da un maggiore effetto saziante dei cereali integrali. Le aree incrementali delle HDL-colesterolo aumentano dopo la dieta health, ma la differenza è nei limiti della significatività statistica ($p=0.056$). Le altre variabili analizzate, incluse la PCR, non sono differenti probabilmente a causa della scarsa numerosità dei soggetti fin ora esaminati.

Sono pochi gli studi che hanno esaminato gli effetti di una dieta basata su cereali health sui fattori del rischio CV. Uno studio in particolare ha considerato soggetti con sindrome metabolica (25 maschi e 25 femmine) ai quali sono state assegnate due diete ipocaloriche (500kcal/dì), una con cereali raffinati e un'altra con cereali integrali per 12 settimane. Da questo studio emerge che il peso del corpo, la circonferenza vita e la percentuale di grasso del corpo diminuiscono significativamente dopo entrambe le due diete. La PCR diminuisce del 38% nel gruppo che ha seguito la dieta con cereali integrali, indipendentemente dalla perdita di peso. Il gruppo che, invece, ha seguito la dieta con cereali raffinati non subiva variazioni dei livelli della PCR. Anche l' HDL-colesterolo e l' LDL-colesterolo diminuiscono significativamente nei due gruppi. Da ciò si deduce che entrambe le diete hanno un effetto benefico sui fattori di rischio

cardiovascolari, soprattutto la dieta con cereali integrali (91). Lo studio effettuato invece da Qi et al, dimostra che in 902 donne diabetiche che hanno seguito una dieta ricca di fibre e cereali integrali, la PCR diminuiva significativamente. Questi risultati hanno suggerito che i cereali integrali ed un basso indice glicemico possono ridurre l'infiammazione sistemica nelle donne con diabete di tipo 2 (92).

I nostri risultati, probabilmente, saranno confermati alla fine dello studio quando la numerosità si sarà incrementata.

6. CONCLUSIONI

Gli studi da noi effettuati hanno dimostrato che il grasso corporeo, ed in particolare il grasso addominale, è il maggiore determinante della proteina c-reattiva plasmatica sia nei soggetti sani e non obesi che nei soggetti con diabete mellito di tipo 2. In questi ultimi vi è però un fattore aggiuntivo che contribuisce insieme all'obesità a spiegare l'aumento dei livelli di PCR: l'iperglicemia. I soggetti diabetici obesi, con una maggiore distribuzione dell'adipe a livello addominale e non ben compensati, possono avere un ulteriore aumento del rischio cardiovascolare dovuto proprio all'aumento della PCR.

La PCR rappresenta un marker di elevato rischio cardiovascolare che identifica soggetti che potrebbero trarre giovamento da un intervento farmacologico ipocolesterolemizzante aggressivo con statine anche se i valori di colesterolo plasmatico non sono aumentati.

Il nostro studio ha dimostrato che, utilizzando l'IMC, la circonferenza vita e l'emoglobina glicosilata, è possibile identificare, con elevata probabilità, individui con una PCR elevata e pertanto ad elevato rischio cardiovascolare e suscettibili di intervento con terapia farmacologia ipercolesterolemizzante.

Tuttavia, il dosaggio di PCR con metodo ultrasensibile non viene rutinariamente eseguito nei laboratori; pertanto, sarebbe utile utilizzare markers di rischio più facilmente eseguibili in grado di identificare i soggetti che hanno PCR elevati.

È possibile ridurre la PCR con interventi dietetici come l'incremento di fibre della dieta e con l'utilizzo di cereali a basso indice glicemico.

Nel nostro studio abbiamo valutato l'effetto sulla PCR e sui principali fattori di rischio cardiovascolari con numerosi approcci dietetici, sia con una dieta ricca di fibre derivanti da cereali integrali, sia con una dieta arricchita in alimenti naturali contenenti: β -glucani, folati, acidi grassi n-3 e tocoferoli, sia con una dieta ricca di cereali integrali a basso indice glicemico, ma non abbiamo ottenuto riduzioni significative della PCR.

Il maggior limite dei nostri studi è stato la scarsa numerosità dei soggetti esaminati, ma anche la brevità del periodo di trattamento.

Gli altri studi, a differenza nostra, hanno trovato una riduzione della PCR dopo dieta a basso indice glicemico o con fibre da cereali integrali (39) (40) (89-91). Ciò può essere spiegato, in parte, dal fatto che questi soggetti hanno perso peso e di conseguenza si è ridotta anche la PCR.

Tuttavia, occorre precisare che fino ad ora la maggior parte degli studi che ha evidenziato una associazione tra componenti della dieta e PCR è rappresentata da studi di osservazione; mentre, nel corso dei lavori ai quali ho partecipato, si trattava di studi di intervento. È noto che non sempre le relazioni tra dieta e rischio metabolico e cardiovascolare evidenziate in studi di osservazione vengono poi confermate in studi di intervento. È questo il caso, per esempio, delle vitamine, antiossidanti, i cui benefici nella prevenzione cardiovascolare sono stati definitivamente confutati dopo lo studio HPS.

Sarebbe pertanto opportuno, ai fini di una definitiva chiarificazione sulla possibilità di modificare lo stato infiammatorio subclinico mediante un intervento dietetico, eseguire uno studio di intervento di dimensioni e durata adeguata in individui con PCR elevata utilizzando contemporaneamente tutti i fattori nutrizionali che sono potenzialmente associati all'infiammazione: grassi n-3, fibre vegetali, antiossidanti (non solo vitamine), basso consumo di grassi saturi (93).

7. BIBLIOGRAFIA

1. Ridker PM. Cardiology Patient Page. C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke. *Circulation*. 2003;108:e81-e85.
2. Farmer JA, Torre-Amione G. Atherosclerosis and inflammation (review). *Curr Atheroscler Rep*. 2002;4:92-98.
3. Pearson TA, Mensah GA, Hong Y, Smith SC Jr, for the Centers of Disease Control and Prevention and the American Heart association Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. CDC/AHA workshop on markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: application to clinical and public health practice: overview. *Circulation*. 2004;110:e543-544.
4. Ridker PM, for the JUPITER Study Group. Rosuvastatin in the primary prevention of cardiovascular disease among patients with low levels of low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitive C-reactive protein: Rationale and design of the JUPITER trial (review). *Circulation*. 2003;108:2292-2297.
5. Ross R. Atherosclerosis:An inflammatory disease (review). *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
6. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein.

- The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*. 1999;100:230-235.
8. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in Atherothrombosis. *Clin Chem* 2009; 55(2): 229-238.
 9. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention (review). *Circulation*. 2003;107:363-369.
 10. Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes (review). *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(4 Suppl S):37S-42S.
 11. Ridker PM, Bassuk SS, Toth PP. C-reactive protein and risk of cardiovascular disease: Evidence and clinical application (review). *Curr Atheroscl Rep*. 2003;5:341-349.
 12. Calabro P, Willerson JT, Yeh ETH. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*. 2003;108:1930-1932.
 13. Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory action on human endothelial cells. *Circulation*. 2004;109:2016-2022.
 14. Lapice E, Maione S, Patti L, Cipriano P, Rivellese A.A, Riccardi G, Vaccaro O. Abdominal adiposity is associated with elevated C-Reactive Protein independent of BMI in healthy nonobese people. *Diabetes Care*. 2009; 32: 1734-1736.

15. Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M, Schulze MB, Overvad K, Van der Schouw YT, Spencer E, Moon KG, Tjonland A, Halkjaer J, Jensen MK, Stegger J, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Chajes V, Linseisen J, Kaaks R, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Bamia C, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, May AM, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhover FJ, Hallmans G, Weinehall L, Manjer J, Hedblad B, Lund E, Agudo A, Arriola L, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quiros JR, Key T, Bingham S, Khaw KT, Boffetta P, Jenab M, Ferrari P, Riboli E. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N. Engl J Med.* 2008; 359:2105-2120.
16. Freiberg MS, Pencina MJ, D'Agostino RB, Lanier K, Wilson PW, Vasan RS. BMI vs. Waist circumference for identifying vascular risk. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16:463-469.
17. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2005;96:939-949.
18. Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G. C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25:1416-1420.
19. Festa A, D'Agostino R Jr, Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tracy RP, Haffner SM. The relation of body fat mass and distribution to

- markers of chronic inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25:1407-1415.
20. Rexrode KM, Pradhan A, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. *Ann Epidemiol* 2003; 13:674-682.
21. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasani RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keaney JF Jr, Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S, Murabito JM, O'Donnell CJ, Benjamin EJ, Fox CS. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2007; 116:1234-1241.
22. Saito M, Ishimitsu T, Minami J, Ono H, Ohru M, Matsuoka H. Relations of plasma high-sensitive C-Reactive Protein to traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis.* 2003; 167:73-79.
23. Yudkin YS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is the interleukin-6 the link? *Atherosclerosis.* 2000; 148:209-214.
24. Rivellesse et al. Diet and cardiovascular disease: beyond cholesterol. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005; 15(6):395-398.
25. Sharman MJ, Volek JS. Weight loss leads to reductions in inflammatory biomarkers after a very-low-carbohydrate diet and a low-fat diet in overweight men. *Clin Sci (Lond).* 2004; 107(4):365-369.

26. Jian Shen and Jose M Ordovas. Impact of genetic and environmental factors on hsCRP concentrations and response to therapeutic agents. *Clin Chem.* 2009; 55(2):256-264.
27. Phinney SD. Fatty acids, inflammation, and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82:1151-1152. erano più alte del 73%
28. Lopez-Garcia E, Shulze MB, Fung TT, Meigs JB, Rifai N, Manson JE, Hu FB. Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004, 80:1029-1035.
29. Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, Willett WC, Hu FB. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73:61-67.
30. King DE, Egan BM, Geesey ME. Relation of dietary fat and fiber to elevation of C-Reactive Protein. *Am J Cardiol.* 2003; 92:1335-1339.
31. Pirro M, Schillaci G, accaio e G, Gemelli F, accaio io MR; Siepi D, et al. Attenuation of inflammation with short-term dietary intervention is associated with a reduction of arterial stiffness in subjects with hypercholesterolaemia. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2004; 11:497-502.
32. Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79:969-73.

33. Lopez-Garcia E, Shulze MB, Manson JE, Meigs JB, Albert CM, Rifai N, et al. consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J Nutr.* 2004; 134:1806-11.
34. Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Chrysohoou C, Skoumas Y, Stefanadis C. Fish consumption among healthy adults is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease: ATTICA study. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46:120-4.
35. Esposito K, Accaio a R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, et al. Effect of a accaio i eann-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic accaio e: a randomized trial. *JAMA.* 2004; 292:1440-6.
36. Michaelsen A, Lehmann N, Pithan C. Mediterranean diet has no effect on markers of inflammation and metabolic risk in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Nutr.* 2006; 60(4):478-85.
37. Esposito K, Nappo F, accaio a R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* 2002; 106:2067-72.
38. Levitan EB, Cook NR, Stampfer MJ, Ridker PM, Rexrode KM, Buring JE, et al. Dietary glycemic index, dietary glycemic load, blood lipids, and C-Reactive Protein. *Metabolism.* 2008; 57:437-43.

39. Ajani UA, Ford ES, Mokdad AH. Dietary fiber and C-Reactive Protein: findings from National Health and Nutrition Examination Survey data. *J Nutr.* 2004; 134:1181-5.
40. Ma Y, Griffith JA, Chasan-Taber L, Olendzki BC, Jackson E, Stanek EJ 3rd, et al. Association between dietary fiber and serum C-Reactive Protein. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83:760-6.
41. Basu A, Devaraj S, Jialal I. Dietary factors that promote or retard inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:995-1001.
42. Esmailzadeh A, Kimiagar M, Mehrabi Y, Azadbakht L, Hu FB, Willett WC. Fruit and vegetable intakes, C-Reactive Protein, and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84:1489-97.
43. Watzl B, Kulling SE, Moseneder J, Barth SW, Bub A. A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-Reactive Protein in healthy, non-smoking men. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82:1052-8.
44. Maron DJ. Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. *Curr Atheroscler Rep.* 2004; 6:73-8.
45. Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic accaio e. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48:677-85.
46. Myers GL, Rifai N, Tracy RP, Robers WL, Wayne Alexander R, Biasucci LM, Catravas JD, Cole TG, Cooper GR, Khan BV, Kimberly MM, Stein EA, Taubert KA, Russell Warnick G, Waymack PP.

- CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. Application to Clinical and Public Health Practice. Report From the Laboratory Science Discussion Group. *Circulation*. 2004;110:e545-e549.
47. Roberts WL, Moulton L, Law TC, Farrow G, Cooper-Anderson M, Savory J and Rifai N. Evaluation of nine automated High-sensitive C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clin Chem*. 2001;47:418-425.
48. Roberts WL, Sedrick R, Moulton L, Spencer A, Rifai N. Evaluation of four automated high sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. *Clin Chem*. 2000;46:461-468.
49. Johnson A, Sampson E, Blirup-Jensen S, Scvendsen P. Recommendations for the selection and use of protocols for assignment of values to reference materials. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1996;34:279-285.
50. Ledue TB, Weiner DL, Sipe JD, Poulin SE, Collins MF, Rifai N. Analytical evaluation of particle-enhanced immunonephelometric assays for C-reactive protein, serum amyloid A and mannosebinding protein in human serum. *Ann Clin Biochem*. 1998;35:745-753.
51. Rifai N, Tracy RP, Ridker PM. Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. *Clin Chem*. 1999;45:2136-2141.

52. Rifai N, Ridker PM. High-sensitive C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem*. 2001;47:403-411.
53. Eda S, Kaufmann J, Molwitz M, Vorberg E. A new method of measuring C-reactive protein, with a low limit of detection, suitable for risk assessment of coronary heart disease. *Scan J Clin Lab Invest Suppl*. 1999;230:32-35.
54. Use of Anticoagulants in Diagnostic Laboratory Investigations. WHO Publication WHO/DIL/LAB 99.1/Rev. 2. Gen. 2002.
55. Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, Rifai N, Cannuscio CC, Stampfer MJ, Rimm EB. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med*. 2004; 351:2599-2610.
56. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ. JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008; 359:2195-2207.
57. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin-6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001; 286:327-334.

58. Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, Cushman M, Kuller LH, Resnick HE, Tracy RP. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the cardiovascular accaioh study. *Diabetes*. 2001; 50:2384-2389.
59. Ford ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care*. 1999; 22:1971-77.
60. Grau AJ, Bugge F, Becher H, Werle E, Hacke W. The association of leukocyte count, fibrinogen and C-reactive protein with vascular risk factors and ischemic vascular diseases. *Thromb Res*. 1996; 82:245-255.
61. Goldberg RB. Cardiovascular disease in diabetic patients. *Med Clin North Am*. 2000; 84:81-93.
62. Wu T, Dorn JP, Donahue RP, Sempos CT, Trevisan M. Associations of serum C-reactive protein with fasting insulin, glucose, and glycosylated haemoglobin. *Am J Epidemiol*. 2002; 155:67-71.
63. Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. Increased levels of C-reactive protein in noncontrolled type II diabetic subjects. *J Diabetes Complications*. 1999; 13(4):211-5.
64. Dana E King, Arch G Mainous III, Thomas A Buchanan, William S Pearson. C-Reactive Protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26:1535-1539.
65. Flores-Alfaro E, Parra-Rojas I, Salgado-Bernabè AB, Chavez-Maldonado JP, Salazar-Martinez E. Cardiovascular risk evaluated by C-

- reactive protein levels in diabetic and obese Mexican subjects. *Circ J*. 2008; 72(7):1170-4.
- 66.Khaw KT, Barrett-Connor E. Dietary fiber and reduced ischemic heart disease mortality rates in men and women: a 12-year prospective study. *Am J Epidemiol*. 1987; 126(6):1093-102.
- 67.Rimm EB, Ascherio A, Giovannucci E, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *JAMA*. 1996; 275(6):447-51.
- 68.Truswell AS et al. Cereal grains and coronary heart disease. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56(1):1-14.
- 69.Jacobs DR Jr, Meyer KA, Kushi LH, Folsom AR. Whole-grain intake may reduce the risk of ischemic heart disease death in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutr*. 1998; 68(2): 248-57.
- 70.Jacobs DR Jr, Meyer KA, Kushi LH, Folsom AR. Is whole grain intake associated with reduced total and cause-specific death rates in older women? The Iowa Women's Health Study. *Am J Public Health*. 1999; 89(3):322-9.
- 71.Jensen MK, Koh-Banerjee P, Hu FB, Franz M, Sampson L, Gronbeer M, Rimm EB. Intake of whole grains, bran, and germ and the risk of coronary heart disease in men. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(6):1492-9.

- 72.Knekt P, Reunanen A, Jarvines R, Seppanen R, Heliovaara M, Aromaa A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am J Epidemiol.* 1994; 139(12):1180-9.
- 73.Munoz JM, Sandstead HH, Jacob RA; Logan Jr GM, Reck SJ, Klevay LM, et al. Effects of some cereal brans and textured vegetable protein on plasma lipids. *Am J Clin Nutr.* 1979; 32:580-92.
- 74.Jenkins DJ, Kendall CW, Augustin LS, Martini MC, Axelsen M, Faulkner D, et al. Effect of wheat bran on glycemic control and risk factor for cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002; 25:1522-8.
- 75.Pereira MA, Jacobs Jr DR, Pins JJ, Raatz SK, Gross MD, Slavin JL, et al. Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75:848-55.
- 76.Weickert MO, Mohlig M, Schoft C, Arafat AM, Otto B, Viehoff H, et al. Cereal fiber improves whole-body insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes Care.* 2006; 29:775-80.
- 77.Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, Meier G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med.* 2002; 112(4):298-304.
- 78.De Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P, Delaye J. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet.* 1992; 343:1454-9.

79. Rivellese AA, Riccardi G, Giacco A et al. Reduction of risk factors for atherosclerosis in diabetic patient treated with a high-fiber diet. *Prev Med.* 1983; 12:28-132.
80. Appel LJ, M.D.H. et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *NEJM.* 1997; 336; 16:1117-1124.
81. Rivellese AA, Riccardi G, Giacco A, Pacioni D, Genovese S, Mattioli PL, Mancini M. Effect of dietary fibre on glucose control and serum lipoproteins in diabetic patients. *Lancet.* 1980; 2(8192):447-50.
82. Rizkalla SW, Taghrid L, Laromiguere M, et al. Improved glucose control, whole body glucose utilization, and lipid profile on a low-glycemic index diet in type 2 diabetic men: a randomised controlled trial. *Diabetes Care.* 2004; 27:1866-1872.
83. Rivellese AA, Giacco R. Nutrizione e malattie cardiovascolari. *Grandangolo in Diabetologia.* 2005; 6:30-42.
84. Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D et al. Early protection against sudden death n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the gruppo italiano per lo studio della sopravvivenza nell'infarto miocardico (GISSI)-prevenzione. *Circulation.* 2002; 105(16):1897-903.
85. Sirtori CR, Crepaldi G, Manzato E, Mancini M, Rivellese A, Paoletti R, Pazzucconi F, Pamparone F, Stragliotto E. One-year treatment with ethyl esters of n-3 fatty acids in patients with hypertriglyceridemia and glucose intolerance reduced triglyceridemia, total cholesterol and

- increased HDL-c without glyceimic alterations. *Atherosclerosis*. 1998; 137(2):419-27.
86. Capaldo B, Tutino L, Patti L, accaioo O, Rivellese AA, Riccardi G. Lipoprotein composition in individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*. 1983; 6(6):575-8.
87. Wood PJ, Braaten JT, Scott FW, Riedel KD, Wolynetz MS, Collins MW. Effect of dose and modification of viscous properties of oat gum on plasma glucose and insulin following an oral glucose load. *Br J Nutr*. 1994; 72(5):731-43.
88. Holm J, Koellreutter B, Wursch P. Influence of sterilization, drying and oat bran enrichment of pasta on glucose and insulin responses in healthy subjects and on the rate and extent of in vitro starci digestion. *Eur J Clin Nutr*. 1992; 46(6):629-40.
89. Browning LM, Krebs JD, Moore CS, Mishra GD, O'Connell MA, Jebb SA. The impact of long chain n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on inflammation, insulin sensitivity and CVD risk in a group of overweight women with an inflammatory phenotype. *Diabetes Obes Metab*. 2007; 9(1):70-80.
90. Solini A, Santini E, Ferrannini E. Effect of short-term folic acid supplementation on insulin sensitivity and inflammatory markers in overweight subjects. *Int J Obes*. 2006; 30(8):1197-202.
91. Katcher HI, Legro RS, Kunselman AR, Gillies PJ, Demers LM, Bagshaw DM, Kris-Etherrton PM. The effects of a whole grain-enriched

- hypocaloric diet on cardiovascular disease risk factors in men and women with metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87(1):79-90.
92. Qi L, Van Dam RM, Liu S, Franz M, Mantzoros C, Hu FB. Whole-grain, bran, and cereal fiber intakes and markers of systemic inflammation in diabetic women. *Diabetes Care.* 2006; 29(2):207-11.
93. Meagher EA. Treatment of atherosclerosis in the new millennium: is there a role for vitamin E? *Prev Cardiol.* 2003; 6(2):85-90.

8. APPENDICE: Pubblicazioni

a. Elenco delle pubblicazioni scientifiche

1. *Abdominal adiposity is associated with elevated C-reactive protein independent of BMI in healthy nonobese people.*

Lapice E., **Maione S.**, Patti L., Cipriano P., Rivellese A., Riccardi G., Vaccaro O.

Diabetes Care 32 : 1734-1736, 2009.

2. *Effects of baked products enriched with n-3 fatty acids, folates, β -glucans and tocopherol in patients with mild-mixed hyperlipidemia.*

De Natale C., Minerva V., Patti L., Mazzarella R., Ciano O., **Maione S.**, Luongo D., Naviglio D., Marotta G., Turco S., Ciati R., Melegari C., Rivellese A., Riccardi G.

In corso di pubblicazione.

b. Elenco degli ABSTRACTS presentati a Congressi

1. *Relazione tra livelli circolanti di proteina C reattiva, indice di massa corporea ed adiposità addominale.*

E. Lapice, **S. Maione**, L. Patti, P. Cipriano, G. Riccardi, A.A. Rivellese, O. Vaccaro.

22° Congresso Nazionale SID, Torino, 26-29 maggio 2008. Il Diabete, abs. n. C067, suppl. n.1, marzo 2008.

2. *Effetti di prodotti da forno arricchiti in acidi grassi n-3, folati, betaglucani e tocoferoli in soggetti con dislipidemia.*

V. Minerva, C. De Natale, L. Patti, R. Mazzarella, O. Ciano, **S. Maione**, G. Marotta, S. Turco, R. Ciati, C. Melegari, G. Riccardi, A.A. Rivellese.

22° Congresso Nazionale SID, Torino, 26-29 maggio 2008. Il Diabete, abs. N. P230, suppl. n. 1, marzo 2008.

3. *Relazione tra livelli circolanti di proteina C reattiva, indice di massa corporea ed adiposità addominale.*

S. Maione, E. Lapice, L. Patti, P. Cipriano, A.A. Rivellese, G. Riccardi, O. Vaccaro. Riunione Annuale Congiunta “Antiche

problematiche e nuove terapie nel diabete”, SID – AMD, Caserta, 23 giugno 2008.

4. *Risposta incretinica al pasto misto in soggetti obesi con diabete tipo 2 sottoposti a differenti interventi di chirurgia bariatrica.*

R. Lupoli, G. Nosso, G. Saldalamacchia, L. Angrisani, P.P. Cutolo, M. Cotugno, L. Di Marino, **S. Maione**, G. Riccardi, B. Capaldo

Attività Diabetologica e Metabolica in Italia, Riunione Congiunta SID – AMD Sezione Campania, Avellino, 5 maggio 2009.

5. *Risposta del GLP-1 al carico orale di glucosio nell'ipoglicemia reattiva.*

M. Cotugno, G. Nosso, R. Lupoli, G. Saldalamacchia, L. Di Marino, **S. Maione**, G. Riccardi, B. Capaldo

Attività Diabetologica e Metabolica in Italia, Riunione Congiunta SID – AMD Sezione Campania, Avellino, 5 maggio 2009.

c. Presentazione di POSTERs a Congressi

1. *Abdominal adiposity is associated with increase plasma concentration of C reactive protein independent of body weight.*

E. Lapice, **S. Maione**, L. Patti, P. Cipriano, A.A. Rivellese, G. Riccardi, O. Vaccaro. 44th EASD Annual Meeting, Roma 7-11 September 2008.