



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in “Medicina Clinica e Scienze del comportamento”

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S)

Settore Scientifico Disciplinare MED/09 – Medicina Interna

**NUOVE STRATEGIE PER IL MANAGEMENT CLINICO,
DIAGNOSTICO E TERAPEUTICO DELLE MALATTIE
CARDIO-METABOLICHE**

IL DOTTORE
Dr. ANGELO MARIA PATTI

IL COORDINATORE
PROF. ANTONINO PINTO

IL TUTOR
PROF. GIUSEPPE MONTALTO

**CICLO XXX
ANNO ACCADEMICO 2015 - 2017**

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 SINDROME METABOLICA.....	pag. 1
1.1.1 Obesità.....	pag. 1
1.1.2 Diabete.....	pag. 7
1.1.3 Dislipidemia.....	pag. 13
1.1.4 Steatosi epatica.....	pag. 18
2. MARCATORI DIAGNOSTICI DEL RISCHIO CARDIO METABOLICO	pag. 21
2.1 MARCATORI BIOMOLECOLARI.....	pag. 21
2.1.1 Citochine infiammatorie.....	pag. 21
2.1.2 Sottoclassi delle lipoproteine plasmatiche.....	pag. 25
2.2 MARCATORI STRUMENTALI.....	pag. 27
2.2.1 Ispessimento medio intimale carotideo (cIMT).....	pag. 27
2.2.2 Disfunzione endoteliale.....	pag. 29
2.2.3 Valutazione ecografica del grasso viscerale.....	pag. 31
3. STRATEGIE TERAPEUTICHE	pag. 35
3.1 APPROCCI FARMACOLOGICI INNOVATIVI.....	pag. 35
3.1.1 Le incretine.....	pag. 35
3.1.1.1 Exenatide.....	pag. 44
3.2 APPROCCI NUTRACEUTICI.....	pag. 53
3.2.1 Olio ad alto contenuto di <i>Oleocantale</i>	pag. 53
3.2.2 Pasta arricchita in <i>Opuntia Ficus-Indica</i>	pag. 65
3.3 APPROCCIO CHIRURGICO.....	pag. 71
4. SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA	pag. 74
5. STUDI CLINICI	pag. 75
5.1 EFFETTI DI EXENATIDE LAR IN PAZIENTI CON DIABETE MELLITO TIPO 2.....	pag. 75

5.1.1 MATERIALI E METODI.....	pag. 75
5.1.2 RISULTATI.....	pag. 79
5.1.3 DISCUSSIONE.....	pag. 80
5.2 EFFETTI DI OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA AD ELEVATA CONCENTRAZIONE DI <i>OLEOCANTALE</i> IN PAZIENTI CON SINDROME METABOLICA.....	pag. 84
5.2.1 MATERIALI E METODI.....	pag. 84
5.2.2 RISULTATI.....	pag. 84
5.2.3 DISCUSSIONE.....	pag. 90
5.3 EFFETTI DI PASTA ARRICCHITA CON ESTRATTO DI <i>OPUNTIA FICUS INDICA</i> IN PAZIENTI CON SINDROME METABOLICA.....	pag. 95
5.3.1 MATERIALI E METODI.....	pag. 95
5.3.2 RISULTATI.....	pag. 101
5.3.3 DISCUSSIONE.....	pag. 102
5.4 EFFETTI DELLA CHIRURGIA BARIATRICA IN PAZIENTI OBESI CON NAFLD.....	pag. 104
5.4.1 MATERIALI E METODI.....	pag. 104
5.4.2 RISULTATI.....	pag. 106
5.4.3 DISCUSSIONE.....	pag. 109
6 CONCLUSIONE.....	pag. 111
7. ABBREVIAZIONI.....	pag. 112
8. BIBLIOGRAFIA.....	pag. 116

1. INTRODUZIONE

1.1 SINDROME METABOLICA

La *Sindrome Metabolica* (MetS), detta anche sindrome X, sindrome da insulinoresistenza, sindrome di Reaven¹, è una costellazione di fattori di rischio (resistenza all'insulina, iperinsulinemia, tolleranza al glucosio, *Diabete Mellito di Tipo 2* (DMT2), obesità viscerale, dislipidemia aterogena e / o alta pressione sanguigna) fra loro correlati che concorrono ad aumentare la possibilità di sviluppare patologie a carico dell'apparato circolatorio²⁻⁴: (1) l'obesità e la mancanza di attività fisica contribuiscono allo sviluppo della resistenza all'insulina, associata ad aumenti della concentrazione dei trigliceridi e delle particelle lipoproteine a bassa densità e diminuzioni della lipoproteina ad alta densità di colesterolo (*High Density Lipoprotein Cholesterol*, HDL-C), favorendo la formazione di placche aterosclerotiche, comportando l'insorgenza di malattie cerebro-cardiovascolari⁵; (2) la resistenza all'insulina contribuisce a livelli più elevati di insulina e glucosio sierico, precursori dello sviluppo del DMT2⁶; (3) iperinsulinemia provoca eccessiva ritenzione renale del sodio e aumento della pressione sanguigna⁷; (4) l'alterazione dell'espressione cellulare intrinseca dei fattori endoteliali provoca un aumento della pressione sanguigna associata alla disfunzione endoteliale e alla ridotta produzione di *Ossido Nitrico* (NO)⁸. Oltre alla predisposizione genetica, ci sono importanti fattori ambientali che possono influenzare la patogenesi di MetS; uno stile di vita malsano (troppo cibo e poca attività fisica) può influire negativamente su tutte le caratteristiche della MetS⁹.

1.1.1 Obesità

L'obesità, secondo la definizione dell'*Organizzazione Mondiale della Sanità* (OMS), è una condizione caratterizzata da eccessivo peso corporeo per accumulo di tessuto adiposo in misura tale da influire negativamente sullo stato di salute. Questo eccesso

di peso corporeo si ripercuote negativamente su tutto l'organismo costituendo di per sé un serio fattore di rischio per le principali malattie croniche: malattie cardiovascolari (in particolare infarto e ictus)¹⁰, ipertensione, DMT2, MetS, alcune forme di tumori¹¹.

L'obesità è causata nella maggior parte dei casi da stili di vita scorretti: da una parte, un'alimentazione ipercalorica e dall'altra un ridotto dispendio energetico a causa della sedentarietà.

Secondo dati dell'OMS l'obesità rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica a livello mondiale perché la sua prevalenza a livello globale è raddoppiata dal 1980 ad oggi¹²; nel 2008 si contavano oltre 1,4 miliardi di adulti in sovrappeso (il 35% della popolazione mondiale); di questi oltre 200 milioni di uomini e oltre 300 milioni di donne erano obesi (l'11% della popolazione mondiale)¹³. L'obesità sta assumendo le proporzioni di una vera e propria epidemia¹⁴.

Negli ultimi anni è stato evidenziato il ruolo del tessuto adiposo come organo con funzioni immuno-metaboliche-endocrine; ciò potrebbe giustificare l'azione diretta dell'obesità nel determinare la sindrome metabolica. L'obesità rappresenterebbe, secondo la teoria dello "stato infiammatorio" uno stato cronico di infiammazione, nel quale le molecole prodotte dai macrofagi infiltrati negli adipociti altererebbero l'attività fisiologica delle β -cellule pancreatiche modificando la secrezione insulinica¹⁵. Inoltre, è stato evidenziato che il tessuto adiposo viscerale è in grado di determinare delle interferenze con l'attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone, di produrre adipochine (quali la leptina, resistina, visfatina e adiponectina)^{16,17}, di produrre molecole protrombotiche come il *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1) e di secernere citochine proinfiammatorie come il *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) e le *Interleuchine 1 e 6* (IL-1 e IL-6)¹⁸. In tutti i mammiferi, il tessuto adiposo si differenzia in *tessuto adiposo bianco* (WAT, *White Adipose Tissue*) e in *tessuto adiposo bruno* (BAT, *Brown Adipose Tissue*). Il WAT ingloba trigliceridi e funge da riserva energetica per l'organismo, il BAT, invece,

possiede la capacità di produrre calore per mantenere l'omeostasi termica in seguito a stress termogenici¹⁹. Una caratteristica distintiva del tessuto adiposo è la notevole plasticità che gli consente di adeguarsi alle diverse esigenze energetiche dell'organismo: i grandi adipociti del tessuto adiposo bianco sarebbero in grado, come risposta a stimoli ormonali e/o ambientali, di convertirsi in elementi cellulari più piccoli che “bruciano” le riserve di grasso attivando opportuni meccanismi termogenici (mitocondriogenesi e lipolisi), proprio come accade negli adipociti del tessuto adiposo bruno²⁰. Fino a qualche tempo fa si pensava che gli adipociti fossero solamente depositari di *acidi grassi liberi* (FFA, *Free Fatty Acid*). Ad oggi, invece, si sa che essi rilasciano ormoni, i quali vanno a modulare la massa di grasso corporeo. L'attitudine endocrina del tessuto adiposo si manifesta con la produzione di due principali *target* metabolici: la leptina e l'adiponectina. La leptina ha un ruolo fondamentale nella regolazione del bilancio energetico attraverso due meccanismi: introito di cibo e consumo energetico; essa viene secreta dal tessuto adiposo in sinergia con l'aumento dei valori ematici di insulina e “comunica” a livello ipotalamico riducendo l'appetito e inducendo sazietà²¹. Inoltre, si è visto che esiste una correlazione lineare tra i livelli circolanti di leptina e la massa adipocitaria totale: l'espressione della leptina è direttamente proporzionale alla quantità di tessuto adiposo presente²². Tuttavia, gli alti livelli di leptina nei soggetti obesi non inducono senso di sazietà, determinando così una situazione definita leptina-resistenza. L'altro importante *signaling* metabolico prodotto dal tessuto adiposo è l'adiponectina, espressa abbondantemente nell'adipocita, ma al contrario di altre adipochine, i suoi livelli plasmatici sono ridotti nell'adiposità addominale. I livelli plasmatici di questa sostanza risultano diminuiti anche nei soggetti di sesso maschile e nei soggetti di sesso femminile in menopausa, nei pazienti diabetici, nei soggetti con ipertriglicedemia, nei soggetti con ipertensione arteriosa, e nei soggetti con cardiopatia ischemica. Si è osservato che quest'ormone migliora la sensibilità insulinica nel tessuto adiposo, nel muscolo e nel fegato; inoltre, favorisce

l'ossidazione dei lipidi, migliora la vasodilatazione endotelio-dipendente; riduce l'espressione delle proteine di adesione; contrasta gli effetti negativi sulla funzione endoteliale delle LDL ossidate; inibisce la differenziazione dei monociti e la formazione di cellule schiumose; ha anche azione antitrombotica riducendo l'aggregazione piastrinica e la formazione di trombi. Quindi l'adiponectina possiede importanti proprietà antiinfiammatorie e antiaterogene. I soggetti che posseggono elevati livelli plasmatici di adiponectina perciò hanno un rischio significativamente ridotto di eventi cardiovascolari²³⁻²⁵. L'obesità può essere considerata sia come un'ipertrofia dovuta a un aumento del numero di adipociti, che costituiscono il tessuto adiposo, sia un'iperplasia dello stesso ed è quindi dovuta a un abnorme aumento del contenuto cellulare di adipociti (lipidi).

Per definire l'*eccesso di peso* si può far riferimento al *Body Mass Index* (BMI), che rappresenta il rapporto tra il peso (espresso in kg) e l'altezza al quadrato (espressa in metri). Il BMI è il parametro di misura più diffuso ed utilizzato per gli studi clinici ed epidemiologici ed è stato convalidato dall'OMS. Esiste una classificazione del grado di obesità che, in base al valore del BMI, prevede la suddivisione degli individui obesi in tre classi.

È possibile procedere ad una stratificazione del rischio relativo di comorbidità valutando il rischio come lieve, moderato, elevato o molto elevato in rapporto al passaggio dal semplice sovrappeso alle tre classi dell'obesità, riservando la massima classe di rischio alla sottopopolazione dei super-obesi (*classe III*)²⁶.

L'indicazione al trattamento chirurgico della grande obesità si pone quando ripetuti tentativi dietetico-farmacologici non hanno un successo e l'obesità, nonché la presenza di patologie ad essa correlate, aumentano i fattori di rischio per la salute del paziente. L'obeso "chirurgico" è il paziente con un BMI > 40 Kg/m² o > 35 Kg/m² se all'obesità sono associate altre complicanze mediche (diabete o ipertensione)²⁶. La chirurgia bariatrica per via laparoscopica si pone in questo contesto come una vera e

propria terapia e può essere considerata come l'unica chirurgia capace di diventare terapia per una malattia medica (**Figura 1**).



* in presenza di almeno una patologia associata

Figura 1. Classificazione dell'Indice di Massa Corporea (Kg/m²).

È, infatti, ormai chiaro che la perdita di peso ottenuta dopo la chirurgia bariatrica, ed in particolar modo dopo bypass gastro-intestinale, è in grado di curare il diabete, l'ipertensione arteriosa e la dislipidemia che sono le patologie mediche più frequentemente associate all'obesità^{27,28}.

Esistono altri indici, come il *rapporto vita-fianchi* (WHR, *Waist to Hip Ratio*), che misurano aspetti differenti della composizione corporea e della distribuzione del grasso corporeo. Diversi studi hanno dimostrato che il WHR è un predittore di anomalie metaboliche più utile degli indici di sovrappeso e quindi il BMI, poiché è confermato che non solo è importante considerare quanta massa grassa si abbia, ma anche dove essa sia distribuita. Infatti, se la massa grassa è localizzata a livello dei fianchi si può considerare meno pericolosa per la salute rispetto all'accumulo della stessa a livello addominale e si tende a considerare l'individuo meno esposto al rischio di malattie cardiovascolari e di diabete. La spiegazione di questo fenomeno

semberebbe risiedere nel fatto che gli adipociti del tessuto adiposo addominale scindono rapidamente i lipidi immagazzinati e riversano nel circolo ematico gli acidi grassi prodotti, fatto che può causare un aumento pericoloso dei livelli di trigliceridi e di glucosio nel sangue. Nel corso degli anni moltissimi ricercatori hanno confermato e ampliato questi risultati e hanno dimostrato anche che, quando alti valori ematici di acidi grassi arrivano alle cellule muscolari, queste ultime hanno difficoltà a prelevare glucosio dal circolo e ciò porta all'aumento dei livelli ematici di glucosio e un aumentato rischio di manifestare poi il DMT2 (**Figura 2**). Inoltre, gli acidi grassi provenienti dagli adipociti siti in addome hanno accesso diretto al fegato, attraverso la vena porta, dove interferiscono con il normale processo di metabolizzazione dell'insulina e di conseguenza aumentano i livelli ematici di insulina rendendo i miociti scheletrici, gli adipociti e gli epatociti meno sensibili all'ormone, condizione che incrementa ulteriormente i livelli di glucosio ematico²⁸.

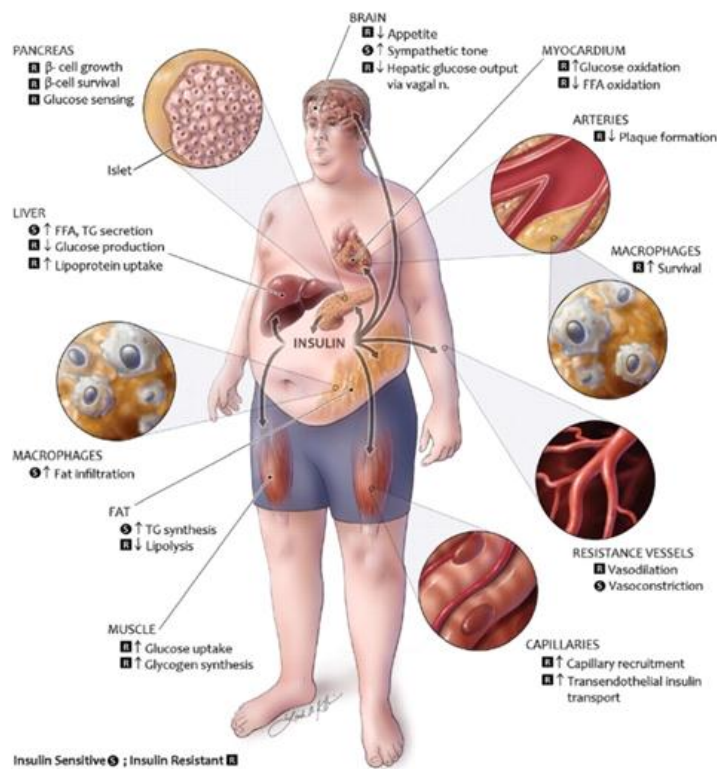


Figura 2. Signaling dell'insulina tessuto specifica e della sindrome metabolica²⁹.

1.1.2 Diabete

Il *Diabete Mellito* (DM) è un gruppo di diversi disordini metabolici di varia eziologia (fattori genetici, ambientali, familiari e comportamentali) che determina un'alterazione del metabolismo glucidico, lipidico e proteico, la cui caratteristica principale è l'aumento della concentrazione ematica di glucosio (iperglicemia). L'iperglicemia è il risultato del difetto di secrezione o di attività dell'insulina, o, più frequentemente, dalla combinazione dei due meccanismi³⁰.

In accordo con l'*American Diabetes Association* (ADA) il principale segno è l'iperglicemia random ≥ 200 mg/dl o ≥ 126 mg/dl a digiuno, causata da un difetto secretivo di insulina o da una condizione definita "insulino-resistenza", che determina una mancata risposta all'azione ipoglicemizzante dell'insulina secreta in circolo; tale iperglicemia è generalmente accompagnata da alcuni sintomi quali: poliuria, polifagia, polidipsia e calo ponderale³⁰.

Il DM può manifestare delle complicanze che possono essere sia acute che croniche. Tra le acute riconosciamo la chetoacidosi, che colpisce tipicamente il *Diabete Mellito di Tipo 1* (DMT1), e la sindrome iperglicemica iperosmolare non chetosica; mentre le croniche possono essere distinte in macroangiopatia (aterosclerosi precoce) e microangiopatia (retinopatia, nefropatia, neuropatia), inoltre la macroangiopatia e la neuropatia sono responsabili della comparsa del piede diabetico. Queste complicanze croniche sono causa di disabilità ed elevata morbilità e mortalità³⁰.

L'attuale classificazione del DM si fonda su criteri eziopatogenetici, a differenza delle precedenti classificazioni, basate sull'età di insorgenza o sul trattamento terapeutico, che sono state completamente abbandonate. Si distinguono:

- Diabete mellito di tipo 1
- Diabete mellito di tipo 2

Gli altri tipi di diabete sono:

- Il *Diabete Autoimmune Latente dell'Adulto* (LADA) noto per la sua insorgenza in età adulta e per la presenza di marcatori immunitari tipici del DMT1.

La patogenesi non è ancora chiara, ma si ipotizzano diversi insulti che possono colpire la β -cellula pancreatica in soggetti che sono geneticamente predisposti, conducendo a un più lento e graduale declino della loro funzione rispetto a ciò che si osserva nel DMT1³⁰.

- Il MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young, diabete di tipo adulto a esordio giovanile*) è una forma monogenica di diabete a trasmissione autosomica dominante. Si conoscono 6 difetti genetici, che attraverso meccanismi differenti, determinano un deficit della funzione della β -cellula. Questo tipo di diabete, generalmente, insorge prima dei 25 anni di età e non sono presenti markers di autoimmunità. La trasmissione ereditaria dominante, presente in almeno 3 generazioni, è utile alla determinazione di questo particolare tipo di diabete. Il controllo glicometabolico viene mantenuto senza insulina per circa due anni dalla diagnosi³⁰.

- Il *Diabete Mellito Gestazionale* (DMG) è un diabete diagnosticato per la prima volta durante la gravidanza. Colpisce circa il 4% delle donne gravide, poiché durante la gravidanza, fisiologicamente, si instaura uno stato di insulino-resistenza che aumenta la richiesta di insulina. La maggior parte delle donne colpite ritorna a uno stato di normale tolleranza glucidica dopo la gravidanza, tuttavia tali donne presentano un aumentato rischio di sviluppare il DM nel corso della loro vita.

Il DMT1 è causato da una distruzione delle β -cellule pancreatiche che conduce a un deficit assoluto di insulina con necessità di terapia insulinica sostitutiva per prevenire l'insorgenza di chetoacidosi. Distinguiamo due forme di diabete di tipo 1:

- sottoclasse 1A, a eziologia autoimmune e
- sottoclasse 1B, a eziologia idiopatica.

La sottoclasse 1A è caratterizzata dalla distruzione delle β -cellule pancreatiche ad opera delle cellule effettrici immunitarie che reagiscono contro antigeni endogeni delle β -cellule e nel siero dei pazienti si riscontra la presenza di autoanticorpi. La patogenesi deriva da una combinazione di suscettibilità genetica (presenza di HLA

correlati, nella maggior parte dei casi, ma sono coinvolti anche geni non HLA) e fattori ambientali (infezioni da parotite, rosolia, coxsackie B o citomegalovirus). Il tipo 1B non presenta evidenza di autoimmunità (10%) o correlazioni HLA, è caratterizzato da una perdita delle β -cellule e insulinopenia permanente e tendenza a sviluppare chetoacidosi. Il DMT1 rappresenta circa il 5-10% dei casi ed è il sottotipo maggiormente diagnosticato nei pazienti al di sotto dei vent'anni³⁰.

Probabilmente il DMT2 riconosce complesse intercause nonostante la specifica eziologia non sia nota; difatti non vi sono né segni di distruzione autoimmune delle β -cellule, né di altre cause note di DM e non è associato a particolari alterazioni HLA³⁰. Nonostante quest'incognita, i fattori genetici nel DMT2 hanno un'influenza più importante rispetto al DMT1; tanto è vero che la concordanza tra gemelli omozigotici oscilla dal 70 al 90%. Inoltre, analizzando il fenotipo familiare, si è notato che soggetti con un genitore diabetico hanno un rischio di sviluppare la malattia durante la vita del 38%, mentre se ne sono affetti entrambi i genitori il rischio aumenta del 60%. Benché sia chiaro questo condizionamento genetico, raramente sono identificabili singoli geni responsabili di tali alterazioni, nella maggior parte dei casi la malattia è poligenica e fortemente influenzata da fattori ambientali (obesità, sedentarietà e elevato apporto calorico)³¹. Il deficit funzionale della β -cellula ha un ruolo chiave nella patogenesi del DMT2. Difatti nei pazienti diabetici l'insulinemia a digiuno è notevolmente bassa in proporzione ai livelli glicemici, ma in valore assoluto può essere aumentata; questo si realizza perché la risposta dell'insulina all'introito orale di glucosio è ridotta; invece, quando il glucosio è infuso per via endovenosa manca la risposta insulinica precoce (fase cefalica) e viene conservata quella tardiva così come la risposta ad altri stimoli, quali aminoacidi, glucagone, sulfaniluree e i β -agonisti³². Una recente ipotesi sulla patogenesi dell'insulino-resistenza si concentra su un difetto della via di segnale della *Fosfatidilinositolo-3-Chinasi* (PI3-K) che è in grado di determinare sia una ridotta traslocazione del GLUT4 sulla membrana plasmatica sia altre alterazioni; tuttavia non tutte le vie di

trasduzione del segnale dell'insulina sono resistenti agli effetti dell'insulina, basti pensare a quelle vie trasduzionali che controllano il differenziamento e la crescita cellulare, quindi l'iperinsulinismo potrebbe incrementare l'azione insulinica attraverso queste vie. Un'altra ipotesi sulla patogenesi del DMT2 pone l'attenzione su degli aspetti comuni dell'obesità, ovvero elevati livelli di acidi grassi liberi e un accumulo di trigliceridi intracellulari, sia a livello muscolare che a livello epatico, determinando lipotossicità e questo meccanismo contribuirebbe al deterioramento della β cellula³³. Diversi studi condotti su modelli animali hanno evidenziato come l'incremento di trigliceridi nelle β cellule pancreatiche si manifesta prima dell'instaurarsi dello stato iperglicemico, probabilmente per una competizione metabolica tra i substrati, trigliceridi e glucosio; tale competizione potrebbe spiegare la resistenza all'insulina, ciò è dimostrato dal fatto che l'accumulo dei lipidi nei muscoli precede di molti anni l'insorgenza del diabete. A tal proposito, risulta interessante l'identificazione di un polimorfismo, geneticamente determinato, del coattivatore del recettore γ , il quale viene attivato dalla proliferazione dei perossisomi (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*, PPAR- γ), siglato PGC-1; è stato dimostrato che soggetti in sovrappeso e con storia familiare di DMT2 hanno una diminuita espressione di PGC-1 anche quando la tolleranza ai glucidi è ancora normale³⁴; quindi l'identificazione di questo polimorfismo potrebbe portare luce circa l'incerta patogenesi del DMT2. Il PGC-1 è un coattivatore trascrizionale fondamentale per la sintesi di enzimi mitocondriali, utili per la β -ossidazione degli acidi grassi; dunque un'alterazione dell'attività del PGC-1 si traduce in una scorretta ossidazione degli acidi grassi intracellulari, per cui i trigliceridi tenderanno ad accumularsi nelle cellule. Questo meccanismo ci consente di spiegare sia l'insulino-resistenza del tessuto muscolare, ma anche la stretta correlazione tra DMT2 e l'aumento ponderale fino all'obesità³⁴.

Vi è, quindi, un nesso tra i fattori esogeni e l'insorgenza del DMT2; difatti un aumento ponderale determina un'incrementata sintesi di trigliceridi ed è chiaro che,

qualora fosse presente un difetto di ossidazione degli acidi grassi, il loro accumulo intracellulare sarebbe fondamentale nell'insorgenza tanto della insulino-resistenza quanto di una ridotta funzionalità delle β -cellule pancreatiche. Di contro, sia la riduzione del peso corporeo che l'esercizio fisico, inibirebbero queste reazioni tardando l'insorgenza del DMT2, proprio perché l'attività fisica stimola l'espressione genica nei mitocondri e la loro capacità ossidativa, probabilmente anche attraverso un aumento dei livelli di PGC-1³⁵. Inoltre, è stato anche visto che l'invecchiamento induce un declino fisiologico delle funzioni mitocondriali e diminuisce la velocità di sintesi di *Adenosina Trifosfato* (ATP) nei muscoli, quindi anche l'invecchiamento contribuisce a slatentizzare il difetto genetico alla base della patogenesi del DMT2. Ciononostante, vi sono ancora diversi punti da chiarire relativi all'assenza di una costante e perfetta consequenzialità tra incremento ponderale e suscettibilità al DMT2³⁵.

Il DMT2 è una delle più grandi emergenze sanitarie globali del 21° secolo. La prevalenza aumenta sempre più, in accordo con i cambiamenti culturali e sociali. Secondo la *Fondazione Internazionale del Diabete (International Diabetes Foundation, IDF)* si stima che nel mondo 415 milioni di adulti tra i 20 e i 79 anni, compresi i 193 milioni non diagnosticati, abbiano il diabete; statisticamente risulta affetta 1 persona su 11. Inoltre si stima che 318 milioni di adulti abbiano *l'Impaired Glucose Tolerance (IGT)* e che quindi siano a rischio di manifestare il DM. Entro la fine del 2017, il diabete avrà causato 5 milioni di morti e la spesa sanitaria aumenterà di circa 673 miliardi di dollari. Se questo incremento non viene arrestato, nel 2040 ci saranno 642 milioni di persone con il DM³⁶.

Il DMT2 rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini che vanno da una predominante insulino-resistenza con deficit insulinico relativo a un difetto predominante della secrezione di insulina con insulino-resistenza. Questa forma può non manifestarsi per anni, in quanto l'iperglicemia è frequentemente asintomatica: la diagnosi viene effettuata per riscontro occasionale e spesso quando le complicanze

sono già in atto³². L'evoluzione naturale della malattia conduce a manifestazioni macrovascolari e microvascolari, che determinano danno d'organo e disabilità e conseguentemente morbilità e mortalità³⁷. La β -cellula è in grado di adeguarsi alle variazioni dell'attività dell'insulina, dunque quando si riduce l'attività dell'insulina, essa viene compensata da un'aumentata secrezione di insulina della β -cellula stessa. La risposta della β -cellula riesce a mantenere l'omeostasi glucidica nelle fasi precoci della malattia. Nelle fasi avanzate di insulino-resistenza la β -cellula non è più in grado di soddisfare la richiesta via via crescente di insulina e si sviluppa il diabete³². L'insufficienza della β -cellula è una caratteristica del DMT2, il cui declino funzionale comincia circa 10 anni prima della diagnosi di diabete, ovvero quando la funzione β -cellulare è ridotta intorno al 30%. In questa fase la secrezione insulinica non riesce a compensare la resistenza a tale ormone e la malattia metabolica diventa manifesta con sintomi e segni clinici. In sintesi, la patogenesi del DMT2 scaturisce da due fattori determinanti: da un lato la resistenza insulinica e dall'altro il declino nel tempo della funzionalità delle β -cellule pancreatiche che vengono continuamente iperstimolate³². L'insulino-resistenza è quella condizione in cui gli effetti biologici dell'insulina (rimuovere il glucosio circolante da parte del muscolo scheletrico, oppure sopprimere la gluconeogenesi epatica) non sono al pari di quanto atteso. Questo è ciò che accade anche nel DMT2, ma tale resistenza è relativa, poichè gli aumentati livelli di insulinemia normalizzano la glicemia; tuttavia la ridotta sensibilità e la ridotta risposta massimale inducono una riduzione generale dell'utilizzo massimo di glucosio dal 30 al 60% in meno rispetto ai soggetti sani. In sintesi, la resistenza all'azione dell'insulina altera l'utilizzo del glucosio da parte dei tessuti normalmente insulino-sensibili e aumenta la gluconeogenesi epatica; entrambi gli effetti determinano un innalzamento dei valori glicemici ematici (iperglicemia), tipici del diabete³⁰. Un peggioramento dell'insulino-resistenza e il progressivo declino funzionale della β -cellula pancreatica rappresentano, dunque, i principali elementi della progressione del DMT2. Rilevanti studi clinici come l'UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes*

Study)³⁸ e lo studio ADOPT (*A Diabetes Outcome Progression Trial*)³⁸ hanno evidenziato come il progressivo peggioramento del compenso glicemico, fosse strettamente correlato alla perdita funzionale della β -cellula pancreatica; questo fenomeno era presente indipendentemente dall'approccio terapeutico con cui erano stati trattati i pazienti. Inoltre questi studi clinici hanno dimostrato che la velocità di progressione del declino della β -cellula è diversa tra i vari farmaci studiati, ma, pur variando la velocità, risulta un processo inevitabile negli anni³⁸.

La sua cronicità e l'aumento notevole dell'incidenza, sempre più in giovane età, rende indispensabile la ricerca di una scelta terapeutica che abbia lo scopo di stabilizzare le fasi di scompenso al fine di prevenire l'insorgenza di complicanze. Trials clinici hanno fornito un contributo fondamentale nel panorama mondiale del diabete evidenziando come lo sviluppo di complicanze vascolari si associ chiaramente agli stati di iperglicemia³⁹⁻⁴² e come l'utilizzo di farmaci innovativi possa ridurre il rischio di eventi cardio-metabolici per i vari effetti pleiotropici che svolgono. Alla luce di questa osservazione risulta evidente come il compito del medico sia proprio quello di mantenere un controllo della patologia attraverso il raggiungimento di target glicemici il più vicino possibile ai livelli di euglicemia. Inoltre, dovendo agire in un'ottica di prevenzione è di estrema importanza il monitoraggio dei parametri che correlano con un alto rischio di sviluppare le complicanze tipiche del DMT2. Altrettanto utile è il riconoscimento precoce dei soggetti a rischio di sviluppare il DMT2 per poter intervenire con strategie terapeutiche utili nelle fasi iniziali della malattia e quindi mirate verso i difetti iniziali.

1.1.3 Dislipidemia

Con dislipidemia si intende una condizione clinica caratterizzata da anomalie del metabolismo lipidico e lipoproteico; ciò comporta una variazione delle concentrazioni

plasmatiche di lipidi e lipoproteine. I lipidi più importanti nell'organismo umano sono:

- Acidi grassi;
- Trigliceridi;
- Colesterolo;
- Lecitine.

Le dislipidemie possono essere classificate in primitive (su base genetica) e secondarie (o acquisite).

Le forme primitive sono dovute ad alterazioni metaboliche di tipo ereditario, le quali possono essere di tipo monogenico o poligenico, coinvolgenti cioè uno o più geni attivi nel metabolismo delle lipoproteine; si sono osservate comunque influenze di tipo ambientale dovute al tipo di alimentazione dei soggetti.

Le forme secondarie sono dipendenti dalla presenza di un'altra malattia, la quale causa un'alterazione del metabolismo lipidico, o dall'utilizzo di farmaci o altre sostanze esogene che possono interferire sulle medesime vie metaboliche.

La prima classificazione delle dislipidemie fu proposta da Fredrickson nel 1967 (**Tabella 1**) e successivamente fatta propria dall'OMS. Essa distingue sei profili lipoproteici plasmatici (fenotipi) caratterizzati in base all'aumento selettivo di alcune classi lipoproteiche⁴³.

Fredrickson Classification of the Hyperlipidemias

Phenotype	Lipoprotein(s) elevated	Serum cholesterol concentration	Serum triglyceride concentration	Relative frequency, %
I	Chylomicrons	Normal to ↑	↑↑↑↑	<1
IIa	LDL	↑↑	Normal	10
IIb	LDL and VLDL	↑↑	↑↑	40
III	IDL	↑↑	↑↑↑	<1
IV	VLDL	Normal to ↑	↑↑	45
V	VLDL and chylomicrons	↑ to ↑↑	↑↑↑↑	5

Tabella 1. Classificazione delle dislipidemie di Fredrickson⁴³.

Le malattie cardiovascolari sono la principale causa di morte nei paesi industrializzati. In Italia, secondo i dati raccolti tra il 1998 e il 2002 dal Progetto Cuore⁴⁴, che misura i fattori di rischio *cardiovascolare* (CV) in campioni di popolazione adulta (uomini e donne di età compresa fra 35 e 74 anni), il 21% degli uomini e il 23% delle donne è ipercolesterolemico (colesterolemia totale uguale o superiore a 240 mg/dl, o sotto trattamento specifico), mentre il 37% degli uomini e il 34% delle donne è in una condizione definita borderline (colesterolemia compresa fra 200 e 239 mg/dl). Nella popolazione anziana (uomini e donne di età compresa fra 65 e 74 anni), il 24% degli uomini e il 39% delle donne sono ipercolesterolemici; il 36% degli uomini e il 38% delle donne è borderline. Oltre agli anziani, le donne in menopausa (età media 62 anni) costituiscono una classe particolarmente a rischio di ipercolesterolemia: in Italia, il 36% delle donne in menopausa ha il valore della colesterolemia totale uguale o superiore a 240 mg/dl, oppure è sotto trattamento farmacologico specifico, mentre il 38% è in una condizione borderline. Per quanto riguarda il trattamento farmacologico, nel nostro paese, solo il 13% dei soggetti ipercolesterolemici di sesso maschile è trattato in modo adeguato (sotto trattamento e con colesterolemia totale inferiore a 240 mg/dl), mentre il restante 81% dichiara di non essere sottoposto ad alcun trattamento farmacologico. Gran parte della popolazione di Paesi con diversi livelli di reddito ignora l'esistenza delle cure per l'ipercolesterolemia oppure non viene trattata in caso di diagnosi positiva.

Ormai è stato confermato da numerosi studi clinici che vi è una relazione tra la quantità di lipidi nel siero e il rischio di malattie cardiovascolari: in particolare si è visto che l'elevato livello di colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (*low density lipoprotein*, LDL) rappresenta uno dei principali fattori di rischio. Vi sono quindi alcuni fattori di rischio che devono essere trattati per effettuare una prevenzione efficace: fumo, ipertensione, diabete, obesità e dislipidemia, che comprende trigliceridi elevati, bassi livelli di HDL-C ed alti livelli di LDL-C⁴⁵. Tra questi, uno dei più diffusi è l'ipercolesterolemia, la quale è uno stato di alterazione patologica in

cui si ha un eccesso di colesterolo sierico, sia totale che legato alle proteine plasmatiche. Questa condizione di alterazione, se non adeguatamente trattata, determina un rischio per la salute, poiché porta ad una maggiore probabilità di sviluppare l'aterosclerosi, una patologia che consiste nella formazione di placche di colesterolo, le quali si depositano sulla parete delle arterie, andando a causarne l'occlusione, con conseguenti ripercussioni sulla circolazione sanguigna periferica, e può dare origine a trombi e di conseguenza causare infarti ed ictus. Oltre ad una ipercolesterolemia esogena, dovuta ad una inadeguata alimentazione, esiste anche un'ipercolesterolemia familiare, un disordine genetico ad ereditarietà dominante, in cui si hanno alterazioni funzionali o strutturali del recettore per le LDL; ciò causa un inadeguato "uptake" (assorbimento) di colesterolo nelle cellule di conseguenza i livelli ematici di colesterolo sono superiori alla norma, anche 3 o 4 volte superiori.

La dislipidemia aterogena è una condizione clinica caratterizzata da un'anomala concentrazione di lipidi nel sangue. Le LDL nell'uomo sono una classe di lipoproteine plasmatiche estremamente eterogenea. Per quanto riguarda le loro dimensioni (size), sono stati identificati due differenti fenotipi, chiamati "pattern A" (LDL grandi e leggere), e "pattern B" (LDL piccole e dense)⁴⁶. La dimensione delle LDL è direttamente proporzionale ai livelli plasmatici di HDL-colesterolo ed inversamente proporzionale ai livelli plasmatici di trigliceridi. La presenza contemporanea di LDL piccole e dense, di ridotti livelli di HDL-colesterolo e aumentati livelli di trigliceridi è stata definita come la "triade lipidica" o "fenotipo lipoproteico aterogeno" (atherogenic lipoprotein phenotype)⁴⁷.

Negli ultimi anni si è molto dibattuto sull'efficacia delle dimensioni delle LDL come fattore predittivo di eventi cardiovascolari, e recentemente una predominanza di LDL piccole e dense è stata accettata come un emergente fattore di rischio cardiovascolare da parte del *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III)*⁴⁸.

Questa predominanza di LDL piccole e dense (*pattern B*) è stata osservata nel 30% circa degli uomini adulti, nel 5-10% dei giovani uomini e delle donne con età < 20, e nel circa 15-25% delle donne in post menopausa⁴⁹⁻⁵². La concentrazione e le dimensioni delle LDL sono geneticamente influenzate, con un'ereditabilità che varia dal 35-45%, con un modello autosomico dominante o co-dominante e vari effetti additivi e poligenici. Vi è anche un'influenza di tipo non genetico e ambientale sull'espressione di questo fenotipo: alcuni esempi sono l'uso di contraccettivi orali (che portano ad un aumento delle LDL piccole e dense)⁴⁹ o l'alimentazione (una dieta ricca di carboidrati può portare al *pattern B* in quei soggetti predisposti geneticamente). Inoltre, la predominanza delle LDL piccole e dense si trova comunemente in associazione a disturbi familiari del metabolismo delle lipoproteine, come l'iperlipidemia familiare combinata, l'iper-beta-lipoproteinemia e l'ipo-alfa-lipoproteinemia, associati ad un maggior rischio di malattia coronarica prematura⁴⁶. Durante i numerosi studi sull'associazione tra LDL e rischio cardiovascolare, si è cercato di capire a cosa fosse dovuto questo aumento di eventi cardiovascolari e a tal proposito sono state avanzate numerose ipotesi sul perché le LDL piccole e dense fossero aterogene. Si è visto che le LDL piccole e dense sono più facilmente assimilate dal tessuto arterioso rispetto alle LDL larghe e leggere⁵⁰, suggerendo un maggiore trasporto trans-endoteliale delle particelle di minore dimensione. Inoltre, si è osservato un ridotto "*uptake*" di questo tipo di LDL. Le proprietà alterate dello strato lipidico superficiale associato ad un ridotto contenuto di colesterolo libero e maggiore contenuto di acidi grassi polinsaturi potrebbe anche contribuire a una maggiore suscettibilità ossidativa delle LDL piccole e dense.

Numerosissimi studi mostrano un'associazione significativa tra concentrazione di LDL piccole e dense e l'aumento del rischio di malattia coronarica (*Coronary Heart Disease, CHD*)⁴⁵. E' stata osservata che l'infarto acuto del miocardico e il fenotipo delle lipoproteine aterogene condividono una serie di alterazioni metaboliche, tra cui modificazioni dei lipidi plasmatici e lipoproteine (un aumento di trigliceridi e una

riduzione nelle concentrazioni di LDL e HDL⁵¹) nonché un relativo assorbimento di glucosio mediato dalla resistenza all'insulina. Queste alterazioni lipidiche hanno una grande rilevanza clinica, poiché devono essere prese in considerazione quando si tratta di prendere decisioni riguardo la terapia da applicare.

1.1.4 Steatosi Epatica

La steatosi epatica non alcolica (*Non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) rappresenta una delle principali comorbidity sviluppate dai pazienti affetti da Mets⁵². I dati osservazionali dimostrano, infatti, che la NAFLD presenta la sua maggiore prevalenza nei pazienti obesi (BMI > 30 kg/m²) e che l'insulino-resistenza, il Diabete Mellito di tipo 2 e l'iperlipidemia sono strettamente correlati alla patogenesi di essa⁵³. La prevalenza di NAFLD nella popolazione generale è del 20-40%, strettamente connessa alla prevalenza dell'obesità⁵⁴.

La NAFLD viene definita come uno spettro di lesioni istologiche che vanno dalla semplice steatosi ad un modello più complesso caratterizzato da lesioni epatocitarie ed infiammazione (**Figura 3**). La NAFLD è comunemente classificata in NAFLD (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) e NASH (*Non-Alcoholic Steatohepatitis*). In realtà, oggi sappiamo che questa classificazione dicotomica non è sufficiente e con molta probabilità esistono delle classi istopatologiche intermedie^{55,56}. La NAFLD interessa un ampio gruppo di pazienti ed è caratterizzata dallo sviluppo di steatosi semplice, ovvero dall'accumulo dei trigliceridi in eccesso in almeno il 5% degli epatociti e si identifica come condizione istologica benigna. La NASH è caratterizzata da due principali entità istopatologiche: l'infiammazione lobulare e la degenerazione balloniforme degli epatociti⁵⁶.

Circa la metà dei pazienti affetti da NASH sviluppa fibrosi ed ha un elevato rischio di sviluppare cirrosi epatica metabolica e carcinoma epato-cellulare⁵⁴. I pazienti affetti da NAFLD hanno, inoltre, un notevole rischio di mortalità cardio-vascolare⁵³.

L'insulino-resistenza, che, come abbiamo visto precedentemente, gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo della MetS, sembrerebbe la protagonista nella patogenesi (**Figura 3**) della NAFLD⁵⁷. Se è vero che l'insulino-resistenza è alla base dello sviluppo di NAFLD, a sua volta l'accumulo di lipidi a livello epatico favorisce insulino-resistenza, creando un vero e proprio circolo vizioso. In particolare, gli studi suggeriscono che alcuni intermedi lipidici, come i *Dicilgliceroli* (DAG), vanno ad attivare la *Proteina Chinasi Cε* (PKCε), che inibisce ulteriormente il recettore dell'insulina a livello epatico e la sua segnalazione a valle⁵⁸.

L'aumento dei livelli lipidici all'interno degli epatociti nei pazienti con NAFLD risulta da uno squilibrio tra l'*uptake* degli acidi grassi, la sintesi dei trigliceridi *de novo* ed il loro *release* tramite le *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL)⁵².

Abbiamo già visto che, in presenza di insulino-resistenza, vi è un'alterazione del metabolismo lipidico. Viene meno l'azione anti-lipolitica dell'insulina a livello dei tessuti periferici, soprattutto muscolo ed adipe, e viene promossa la lipolisi con liberazione nel plasma di FFA che attraverso la vena porta raggiungono il fegato⁵⁷. Ad accumularsi a livello epatico non sono solo gli FFA rilasciati dai tessuti periferici, ma anche gli acidi grassi provenienti dalla dieta. I chilomicroni che diffondono nel *post-prandium* forniscono una certa quantità di acidi grassi, ma, poichè l'attività di *fat storage* da parte del tessuto adiposo del paziente obeso e/o insulino-resistente è inefficiente, gli FFA si accumulano come grassi ectopici principalmente a livello epatico. Inoltre, parte del carico lipidico epatico deriva dalla *De Novo Lipogenesis* (DNL)⁵⁹.

Il danno a livello epatico sembrerebbe dunque derivare dall'accumulo di FFA, ma parlare solo di lipotossicità non è sufficiente. L'obesità e l'insulino-resistenza, componenti centrali della MetS, sono associate ad una riduzione delle adipochine anti-infiammatorie (adiponectina) e ad un aumentato rilascio di adipochine e citochine pro-infiammatorie (Interleuchine, TNFα, CRP) che promuovono l'attivazione di una serie di *pathways* infiammatori a livello epatico. Di fatto, la

progressione da NAFLD a NASH si ha quando i meccanismi adattativi non riescono più a proteggere gli epatociti dalla lipotossicità causando infiammazione, stress ossidativo e apoptosi^{57,60}.

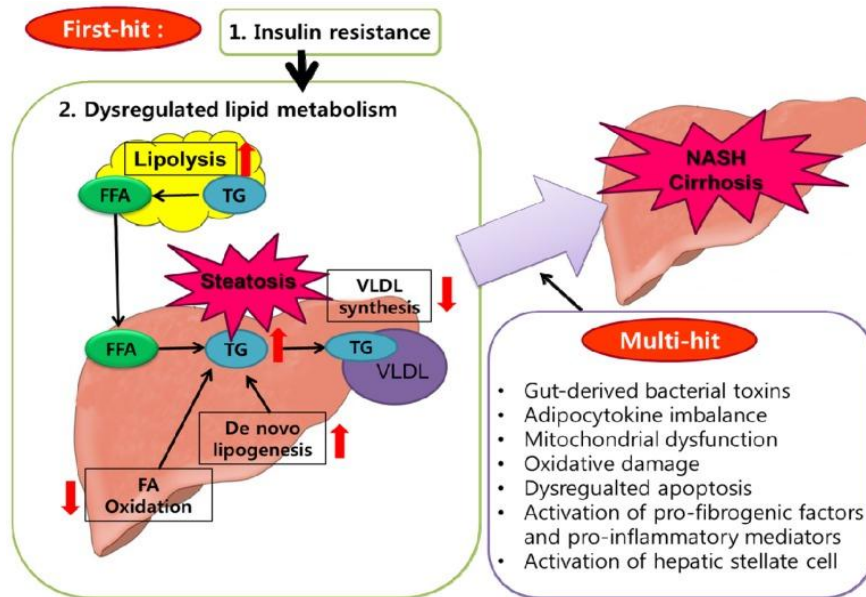


Figura 3. Patogenesi della NAFLD multi-step. Il primo step, rappresentato dall'insulino-resistenza, induce disregolazione lipidica, lo sviluppo di steatosi semplice e rende gli epatociti suscettibili ai vari fattori che nel complesso conducono a NASH e cirrosi, fra cui le tossine batteriche derivate dalla barriera intestinale, lo squilibrio delle adipochine, la disfunzione mitocondriale, lo stress ossidativo, l'apoptosi degli epatociti, l'attivazione di fattori pro-fibrotici e pro-infiammatori, l'attivazione delle cellule epatiche stellate⁶¹.

Ad oggi la diagnosi di NAFLD si avvale della biopsia epatica e della valutazione istopatologica, ma ulteriori studi dovranno essere svolti per trovare criteri diagnostici di più semplice utilizzo clinico. La biopsia epatica, infatti, non può essere considerata una procedura di *screening* per tutti i pazienti. Sia perchè si tratta di una procedura invasiva e potenzialmente dannosa, sia perchè esistono dei limiti interni alla stessa procedura della biopsia⁶². Tra i metodi di indagine non invasiva più utilizzati che agevolano la diagnosi di steatosi epatica e fibrosi ricordiamo l'indagine ultrasonografica associata al FibroScan. Quest'ultimo ci permette di valutare il livello epatico di *stiffness*⁶³.

2. MARCATORI DIAGNOSTICI DEL RISCHIO CARDIOMETABOLICO

2.1 MARCATORI BIOMOLECOLARI

2.1.1 Citochine infiammatorie

Le più recenti scoperte relative all'obesità evidenziano la costante associazione tra questa patologia, l'insulino-resistenza e il diabete di tipo II⁶⁴. L'obesità altera la funzione endocrina e metabolica del tessuto adiposo portando ad una maggiore espressione di citochine ad azione pro-infiammatoria, quali ad esempio IL-6 e TNF- α , e a minor produzione di molecole anti-infiammatorie, come l'adiponectina⁶⁵. Tali modifiche vanno a determinare quella che viene chiamata “*infiammazione cronica di basso grado*”, che caratterizza l'obesità e che è coinvolta nello sviluppo delle manifestazioni cliniche comuni a questa condizione quali aterosclerosi, ipertensione, insulino-resistenza e dislipidemia⁶⁶. Essa può dunque spiegare, almeno in parte, la patogenesi della sindrome metabolica e delle sue complicanze. Alla base di tale meccanismo vi sono molteplici fattori, come ad esempio lo stato di ipossia che si verrebbe a sviluppare nel tessuto adiposo del soggetto obeso. All'aumentare delle dimensioni dei depositi adiposi, l'ossigenazione e la vascolarizzazione cellulare adipocitaria e tissutale diventerebbero insufficienti⁶⁷ creando uno stato di ipossia cellulare che determinerebbe una condizione di stress per il reticolo endoplasmatico, contribuendo all'alterata produzione di adipochine⁶⁸. In particolare, si è dimostrato che in condizioni di ridotta concentrazione di ossigeno l'espressione degli mRNA di adiponectina e delle PPAR risulta inibita⁶⁹. Diversi gruppi hanno dimostrato che un eccesso di nutrienti porta all'attivazione di chinasi coinvolte nel signaling dell'infiammazione come la *c-Jun N-terminal kinase 1* (JNK), e la *Nuclear factor κ chain transcription in B cells*, NF- κ B kinase β (*Kappa β Kinase*, IKK) ed altre ancora, contribuendo allo sviluppo dell'insulino-resistenza attraverso un incremento della fosforilazione della serina del *Recettore Insulinico (Insulin Receptor Substrate-1, IRS-1)*, impedendo conseguentemente il normale pathway dell'insulina⁷⁰.

Queste chinasi infiammatorie in particolare *Protein Kinase RNA-activated* (PKR), JNK e IKK possono indurre una risposta infiammatoria anche senza agire direttamente sulle molecole del signaling insulinico, ma attivando fattori di trascrizione come AP-1, NF- κ B e IRF che determinano un aumento dell'espressione genica di mediatori dell'infiammazione. La chinasi PKR può inoltre andare a regolare negativamente il fattore *eukaryotic translation Initiation Factor 2 α* (eIF2 α) inibendo la traduzione generale all'interno della cellula e influenzando negativamente la funzione del reticolo endoplasmatico (**Figura 4**)⁷¹.

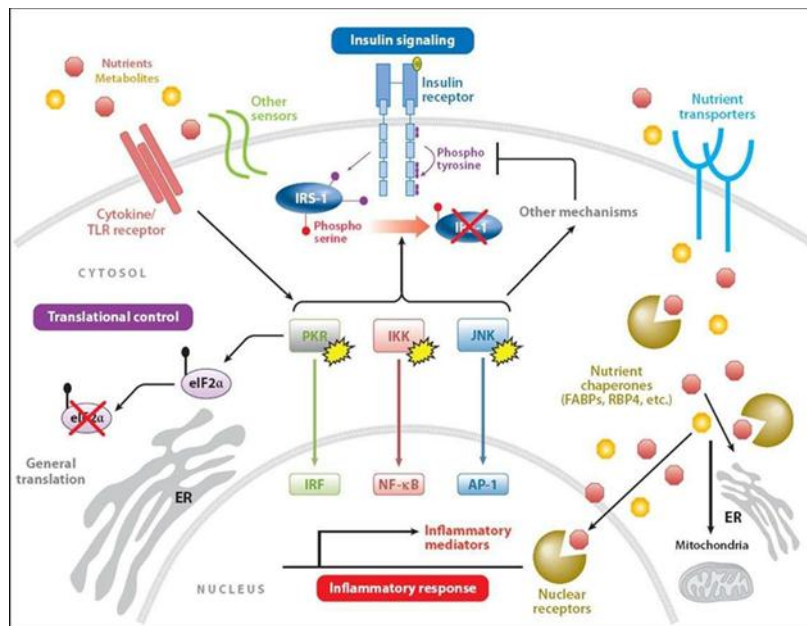


Figura 4. Effetti dell'infiammazione nella funzione metabolica⁷².

Quando il *Reticolo Endoplasmatico* (RE) è stressato a causa dell'accumulo di proteine “*unfolded*”, si assiste all'attivazione dell'*Unfolded Protein Response* (UPR), che a sua volta attiva una cascata di segnali che porta allo stress cellulare con conseguente produzione di ROS e innesco di una risposta infiammatoria. L'UPR è guidata principalmente da tre proteine transmembrana: PERK, IRE-1 e ATF-6 che risiedono nel RE e che attivano 3 diverse cascate di segnali. I tre signalings della

UPR si intersecano con i pathways dell'infiammazione tra cui quello dell'NF- κ B-IKK e del JNK-AP1, portando ad un aumento dell'espressione di geni coinvolti nei meccanismi infiammatori, come quelli che codificano per le citochine IL-1, IL-6, il TNF- α e la *Protein Chemoattractant Monociti 1* (MCP-1) (**Figura 5**)⁷²⁻⁷⁷.

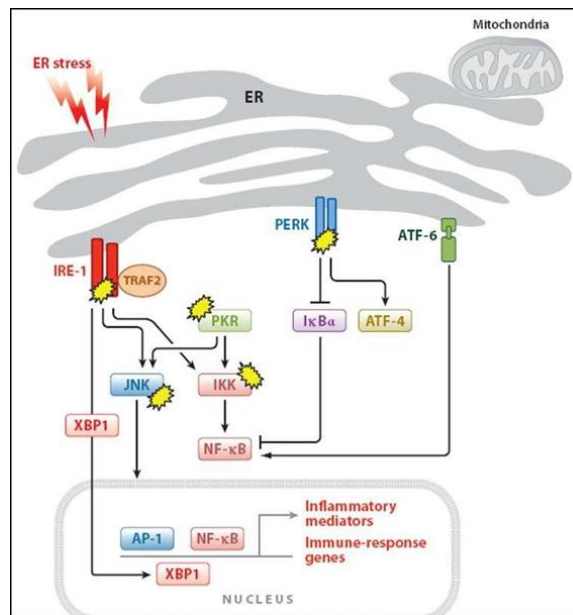


Figura 5. Pathways attivati in seguito a stress del Reticolo Endoplasmatico che portano ad una risposta infiammatoria⁷⁴.

Senza il corretto funzionamento e l'azione endocrina del tessuto adiposo, determinato dall'eccesso di nutrienti e dallo stress degli organuli citoplasmatici, si assiste all'aumento dell'infiammazione e all'inibizione dell'azione dell'insulina che portano ad una disfunzione metabolica sistemica.

I depositi adiposi viscerali, rispetto a quelli sottocutanei, sono i maggiori determinanti dei livelli circolanti di IL-6 di origine adiposa⁷⁸ e, drenando direttamente nel circolo portale citochine pro-infiammatorie, possono modulare direttamente l'attività del fegato nella sintesi di proteine della fase acuta, come la *Proteina C-Reattiva* (PCR) o il PAI-1⁷⁹. Il tessuto adiposo viscerale sembra dunque svolgere un ruolo

predominante rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo nel determinare lo stato di infiammazione sistemica che caratterizza l'obesità. Il tessuto adiposo è inoltre fonte importante di TNF- α , mediatore precoce della risposta di fase acuta, prodotto principalmente da macrofagi e adipociti⁸⁰. Esso aumenta in condizioni di obesità^{81,82} e partecipa all'infiammazione sistemica stimolando la produzione di chemochine, IL-6, PCR, inducendo l'espressione di molecole di adesione leucocitaria⁸³, diminuendo direttamente la sensibilità insulinica, aumentando la lipolisi negli adipociti ed ostacolando l'adipogenesi tramite la regolazione del PPAR γ ⁸⁴⁻⁸⁸.

Altro importante meccanismo che contribuisce allo stato di infiammazione cronica nell'obesità sembra essere legato all'infiltrazione di cellule infiammatorie nel tessuto adiposo, principalmente macrofagi e linfociti. Tali cellule verrebbero richiamate in sede dal circolo periferico, tramite la produzione e immissione in circolo da parte degli adipociti di chemochine quali ad esempio la MCP-1 e il *Vascular Cell Adhesion Protein* (VCAM). Il legame molecolare tra infiltrazione macrofagica e insorgenza prima della insulino-resistenza e poi del diabete, sembra essere legato al fatto che i macrofagi sono responsabili della produzione di molecole in grado di interferire con il recettore insulinico. In particolare il TNF- α prodotto dai macrofagi interferirebbe con la fosforilazione del substrato 1 del recettore insulinico. Questa interferenza sarebbe responsabile della insulino-resistenza, condizione che determinerebbe a sua volta la necessità di una ipersecrezione compensatoria di insulina da parte delle isole di Langerhans che, ad un certo punto, raggiungerebbero il limite dell'esaurimento funzionale con conseguente insorgenza del diabete del tipo II. E' stato dimostrato, inoltre, che l'infiltrazione macrofagica è correlata positivamente al BMI e alla dimensione degli adipociti. Questo fenomeno risulta reversibile in seguito alla perdita di peso⁸⁹. I macrofagi vengono suddivisi in tipo M1, secernenti fattori pro-infiammatori come TNF- α e IL-6, e tipo M2 attivati per via alternativa. Attraverso la produzione di fattori quali IL-10 ed *Tissue Necrosis Factor- β* (TNF- β), i macrofagi M2 inibiscono i processi infiammatori M1-indotti. Inoltre, i macrofagi M2 sono

coinvolti in processi non immunologici come il rimodellamento tissutale e il metabolismo lipidico, con un ruolo importante nell'omeostasi e nei processi riparativi dei tessuti^{90,91}. Uno “switch” dal fenotipo M2 riparativo al fenotipo infiammatorio M1 è stato evidenziato da Lumeng et al. in topi con obesità dieta-indotta⁹². In particolare, Cinti et al. hanno evidenziato una caratteristica organizzazione dei macrofagi M1, che sembrano disporsi a formare sincizi contenenti fino a quindici cellule, le cosiddette “*crown-like structures*”, in relazione a siti di sofferenza e morte adipocitaria. Queste strutture sembrano avere il ruolo di fagocitare detriti cellulari, in particolare gocce lipidiche. Al loro interno si può osservare la formazione di cellule giganti multinucleate, segno dello sviluppo di un'inflammatione cronica^{93,94}.

2.1.2 Sottoclassi delle lipoproteine plasmatiche

Si è osservato che lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi non dipendono solo dall'accumulo in grandi quantità di lipoproteine circolanti, ma dipendono dalle proprietà specifiche che esse hanno. Infatti, le lipoproteine circolanti non sono tutte uguali, ma variano in dimensioni, in densità, in composizione lipidica e apolipoproteica e possono essere suddivise in diverse classi in base ai parametri fisici e chimici⁹⁵.

Le lipoproteine LDL sono quelle che principalmente costituiscono il deposito lipidico della placca aterosclerotica.

Le lipoproteine HDL non sono invece aterogene ed il loro livello sierico è inversamente proporzionale al rischio aterosclerotico e cardiovascolare⁹⁶⁻⁹⁷.

A sua volta, le LDL, in base alle dimensioni, densità e caratteristiche metaboliche, vengono classificate in almeno quattro diverse sottoclassi (large LDL-I, medium LDL-II, small LDL-III e very small LDL-IV). In realtà, oggi sono già note più di sette sottoclassi. Le differenze sono dovute a variazioni nel contenuto dei lipidi di superficie e a cambiamenti conformazionali di apoB-100. Anche le HDL possono

essere classificate in sottoclassi e ad oggi quelle conosciute sono circa 10, ma ulteriori studi sono necessari per meglio capire il loro ruolo^{3,4,95,97,98}.

Attualmente come accennato in precedenza, vengono distinti, in base al profilo plasmatico di LDL, due principali fenotipi (**Figura 6**). Il fenotipo A è caratterizzato dalla predominanza di LDL grandi e leggere o *large buoyant* LDL (lbLDL); il fenotipo B è caratterizzato dalla prevalenza sierica di LDL piccole e dense o *small-dense* LDL (sdLDL).

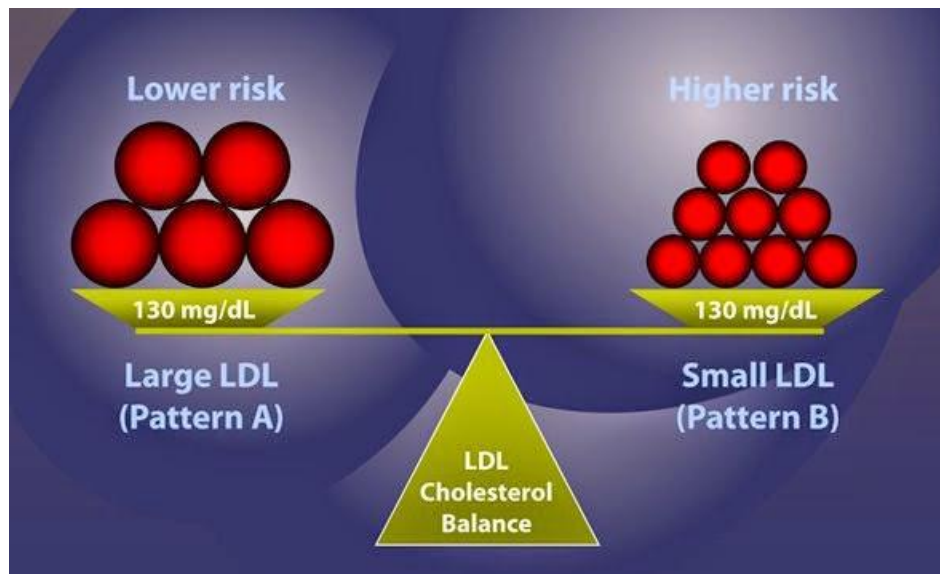


Figura 6. Fenotipo delle LDL⁹⁹.

Il fenotipo B è maggiormente correlato ai disturbi metabolici, all'obesità, al DM2, all'aterosclerosi e alla malattia coronarica. Le small-dense LDL sembrerebbero dunque le più aterogene. Di fatti, a differenza delle altre LDL, le sdLDL vengono internalizzate a livello della parete arteriosa molto più facilmente grazie alla loro dimensione ridotta. Permangono in circolo per tempi prolungati, poichè presentano minore affinità per il recettore LDL; hanno una lunga emivita plasmatica ed una maggiore suscettibilità alla glicazione non enzimatica e all'ossidazione. La presenza

di LDL ossidate scatena una cascata di eventi che porta alla formazione di cellule schiumose e all'evoluzione della placca ateromasica. In particolare, le LDL ossidate stimolano la produzione, da parte dei macrofagi presenti a livello intimale, di citochine proinfiammatorie che aumentano la produzione da parte delle cellule endoteliali di molecole di adesione per i monociti circolanti (*cellular adhesion molecules* o CAM: VCAM, ICAM ed E-selectina): l'effetto finale è un aumento della migrazione dal lume vasale all'interno della parete arteriosa di monociti/macrofagi, con un progressivo arricchimento di cellule infiammatorie da parte della placca ateromasica. Tutto ciò spiega il legame tra small-dense LDL e aterogenesi^{95,96,97,98}.

Il NCEPIII ha attualmente identificato le sdLDL come principale fattore di rischio dislipidemico. I livelli sierici di sdLDL sono aumentati nei pazienti con MetS ed hanno un ruolo predittivo per i futuri eventi cardio-cerebro-vascolari^{95,98}.

2.2 MARCATORI STRUMENTALI

2.2.1 Ispessimento Medio Intimale Carotideo (cIMT)

Sfruttando la metodica non invasiva e a basso impatto economico dell'eco-color-doppler è possibile valutare a livello carotideo la presenza non soltanto di placche ateromasiche, che possono o meno alterare il flusso sanguigno, ma anche la presenza di un aumento del cIMT.

Anatomicamente la parete vasale è composta da tre strati:

- strato esterno: avventizia;
- strato medio: media o strato muscolare;
- strato interno: intima o strato endoteliale.

Una classica immagine ultrasonografica della parete arteriosa a livello del complesso intima-media, risulta caratterizzata dalla presenza di una coppia di linee iperecogene parallele che delimitano uno spazio anecogeno. Le due linee iperecogene rappresentano lo strato esterno, l'avventizia, e lo strato interno, cioè il complesso intima-media. La sottile linea ipo-anecogena tra questi due strati, è rappresentato

dallo strato medio, ossia dalla lamina elastica esterna (**Figura 7**)¹⁰⁰. A causa di alcuni problemi di ordine tecnico, le linee guida della società di diagnostica vascolare (SIDV-GIUV) consigliano di:

- misurare il cIMT sulla parete posteriore della carotide comune ad 1 cm dalla biforcazione, in un segmento di carotide di circa 1 cm, prendendo la misura sulla parete posteriore in almeno 2-3 proiezioni e segnalando il valore medio o massimo;
- utilizzare immagini zoomate e di utilizzare software dedicati;
- di fare misurazioni ripetute o di far eseguire la misurazione da operatori indipendenti;
- di segnalare la misura dell'IMT separatamente nelle due carotidi comuni;
- di segnalare sul referto se il valore riportato è il valore medio o massimo¹⁰¹.

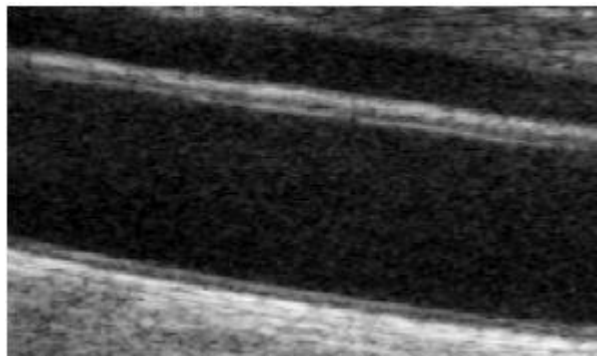


Figura 7. *Ispessimento Medio Intimale Carotideo (cIMT) normale*¹⁰⁰.

Alla luce di numerosi studi effettuati, come il *Cardiovascular Health study*¹⁰², lo *studio Rotterdam*¹⁰³ e l'*Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)*¹⁰⁴, le società europee di cardiologia e dell'ipertensione (ESC-ESH), hanno inserito nelle linee guida la valutazione dello spessore medio-intimale come marker di danno d'organo sub-clinico¹⁰⁵. Il valore soglia di questo spessore è stato identificato <0,9 mm, limite oltre il quale si definisce patologico; invece, la presenza di placche può essere

definita da un cIMT ≥ 1.5 mm o da un ispessimento focale di 0.5 mm o del 50% rispetto ai valori adiacenti di cIMT.

Alcune meta-analisi^{106,107}, hanno raccolto tutti gli studi prospettici che indagavano l'associazione tra valori del cIMT basale e rischio di eventi cardiovascolari ed hanno riportato che, per una differenza assoluta del cIMT di 0.1 mm, il rischio futuro di infarto miocardico ed ictus cerebrale aumentava rispettivamente del 10-15%, e del 13-18% all'anno.

2.2.3 Disfunzione Endoteliale

L'endotelio vasale non è solamente un insieme di cellule che formano una barriera tra sangue e tessuti circostanti, ma rappresenta un vero e proprio organo avente la funzione di modulare il tono vasale (**Figura 8**) e la quantità di flusso ematico in risposta a stimoli umorali, nervosi e meccanici. Fisiologicamente l'endotelio partecipa ai meccanismi di angiogenesi e di mitogenesi; contribuisce, inoltre, alla fluidità ematica, alla regolazione dell'infiammazione e dell'attivazione piastrinica. Tutti questi processi sono possibili grazie al rilascio di sostanze vasodilatatrici, quali l'NO, la prostaciclina e il peptide natriuretico di tipo C, sostanze vasocostrittrici, quali l'*Endotelina-1* (ET-1), l'angiotensina-II, il trombossano-A2 e le *specie reattive dell'ossigeno* (ROS), molecole di adesione, quali VCAM-1, ICAM-1 ed E-selectina, modulatori dell'emostasi, quali l'attivatore del plasminogeno ed il suo inibitore, il fattore tissutale, il fattore di Von Willebrand ed il fibrinogeno¹⁰⁸.

Quando sono presenti fattori di rischio cardiovascolare, tra cui anche il DM, il ruolo protettivo dell'endotelio si altera, andando a determinare una condizione che prende il nome di “*disfunzione endoteliale*”, descritta per la prima volta nell'uomo nel 1990 in soggetti ipertesi¹¹⁰ e caratterizzata dalla compromissione di quell'equilibrio che è in grado di fornire l'endotelio. In questa condizione viene ad alterarsi la risposta vasomotoria ai principali stimoli vasodilatatori endotelio-dipendenti, spostando l'equilibrio verso un'attività pro-infiammatoria e pro-coagulante dell'endotelio.

Inoltre è stato dimostrato che la disfunzione endoteliale può precedere le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi coronarica¹¹¹.

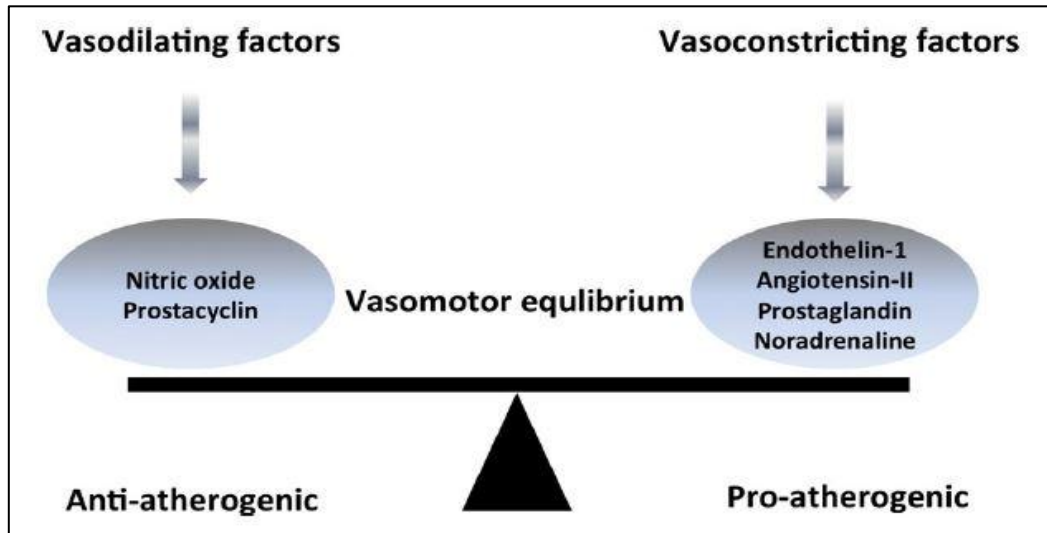


Figura 8. Lo squilibrio tra i fattori vasoregolatori induce la disfunzione endoteliale nel diabete¹⁰⁹.

La funzione endoteliale può essere valutata sia a livello coronarico, sia a livello dell'avambraccio, utilizzando l'infusione di sostanze con azione vasodilatante e vasocostringente (rispettivamente Acetilcolina e L-N-monometilarginina) a dosi tali da non determinare effetti sistemici. La funzione endoteliale può essere valutata anche attraverso la risposta dell'arteria brachiale a bruschi aumenti del flusso ematico. Per ovviare a metodiche invasive come la pletismografia "strain gauge" nel distretto periferico, nel 1992, si cominciò a valutare la reattività vascolare dell'arteria brachiale per mezzo dell'ultrasonografia, misurando la capacità di questo vaso di dilatarsi in seguito ad un aumento dello *shear stress* (*Flow-Mediated Dilation, FMD*)^{112,113}. Il mediatore principale di questa tecnica è il NO, per cui può realizzarsi in presenza di un endotelio integro¹¹³. Questa metodica ha il vantaggio di non essere invasiva rispetto alla valutazione della funzione endoteliale a livello coronarico ed alla pletismografia "strain gauge"; tuttavia presenta una variabilità intra- ed inter-

operatore^{114,115}. Per ovviare a questi inconvenienti sarebbe opportuno, infatti, avere una accuratezza metodologica elevata e rispettare alcuni pre-requisiti, come mostrato in **Figura 9**. Sono considerati normali valori di FMD superiori al 10%¹¹¹.

Orario	l'esame dovrebbe essere eseguito sempre alla stessa ora del giorno
Temperatura	la valutazione ultrasonografica dovrebbe essere eseguita a temperatura costante, in un ambiente provvisto di condizionatore
Farmaci	tutti i farmaci vasoattivi dovrebbero essere sospesi la sera prima dell'esame
Caffè e tè	il giorno dell'esecuzione dell'esame il paziente dovrebbe astenersi dall'assunzione di caffè o tè
Fumo	allo stesso modo i pazienti dovrebbero astenersi dal fumo
Influenza del cibo	i pazienti non dovrebbero assumere pasti copiosi o ricchi di grassi
Diametro dell'arteria brachiale	deve essere compreso tra 2,5 e 5 mm

Figura 1. Prerequisiti e fattori che influenzano la Flow-mediated dilation¹¹¹.

2.2.3 Valutazione ecografica del grasso viscerale

L'obesità addominale è stata associata a intolleranza al glucosio, ipertensione, dislipidemia, iperinsulinemia e malattia cardiovascolare (**Figura 10**)^{116,117}.

L'associazione tra obesità addominale e fattori di rischio cardiometabolico è dovuta principalmente al *tessuto adiposo viscerale in eccesso* (*Visceral Adipose Tissue*, VAT), mentre il *tessuto adiposo addominale sottocutaneo* (*Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue*, SAAT) influenza il profilo metabolico del paziente in misura minore¹¹⁸. Il VAT è considerato più metabolicamente attivo del SAAT (**Figura 11**) e differisce, tra le altre cose, nella secrezione di adipochine/citochine, ormoni e molecole immunitarie e nella reattività lipolitica/lipo-genetica¹¹⁹.

Obesità addominale e rischio cardiovascolare

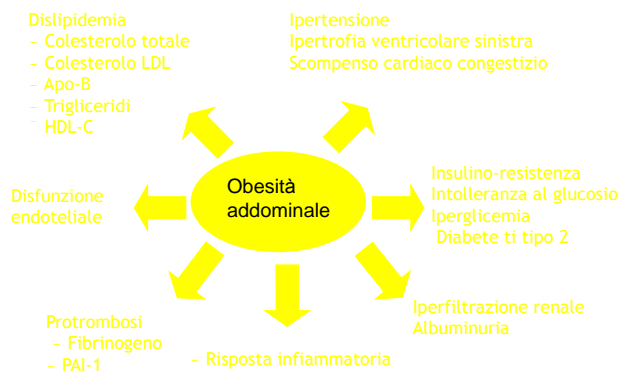


Figura 10. Effetti dell'obesità addominale sui parametri di rischio cardiometabolico¹¹⁷.

Il tessuto adiposo viscerale in eccesso causa direttamente la progressione dei fattori di rischio multipli, attraverso la secrezione di FFA in eccesso e adipochine infiammatorie, e la ridotta secrezione di adiponectina. Il contributo importante del VAT alla dislipidemia e all'insulino resistenza fornisce un legame indiretto, sebbene clinicamente importante, alla genesi e alla progressione dell'aterosclerosi e della malattia cardiovascolare. Il VAT in eccesso è tipicamente associata a elevati livelli di PCR e FFA, come pure a ridotti livelli di adiponectina. L'elevata PCR è un indicatore di infiammazione. E' stato dimostrato che l'obesità addominale si associa alla cascata infiammatoria, poiché il tessuto adiposo esprime una quantità di citochine infiammatorie. Attualmente si ritiene che l'infiammazione gioca un ruolo nello sviluppo di aterosclerosi e diabete di tipo 2. Elevati livelli di PCR sono considerati predittivi di malattia cardiovascolare e insulino resistenza. Elevati livelli di FFA appaiono giocare un ruolo significativo nello sviluppo di insulino resistenza. E' stato suggerito che elevati FFA e lipidi intracellulari inibiscono il meccanismo di segnalazione dell'insulina, portando a una riduzione del trasporto di glucosio al muscolo. I FFA giocano anche un ruolo di mediatori tra l'insulino resistenza e la

disfunzione delle B-cellule, indicando che una riduzione nel livello di FFA potrebbe essere un target terapeutico da conseguire. L'adiponectina è una proteina circolante specifica del tessuto adiposo che è coinvolta nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico. E' stato dimostrato che i livelli di adiponectina sono ridotti negli adulti con obesità e DMT2. Nei non diabetici, è stato dimostrato che ipertrigliceridemia e bassi livelli di colesterolo HDL sono associati a basse concentrazioni di adiponectina. Tutte queste componenti aiutano a spiegare perché l'adiposità addominale in eccesso è considerata una grande minaccia alla salute cardiovascolare e metabolica.

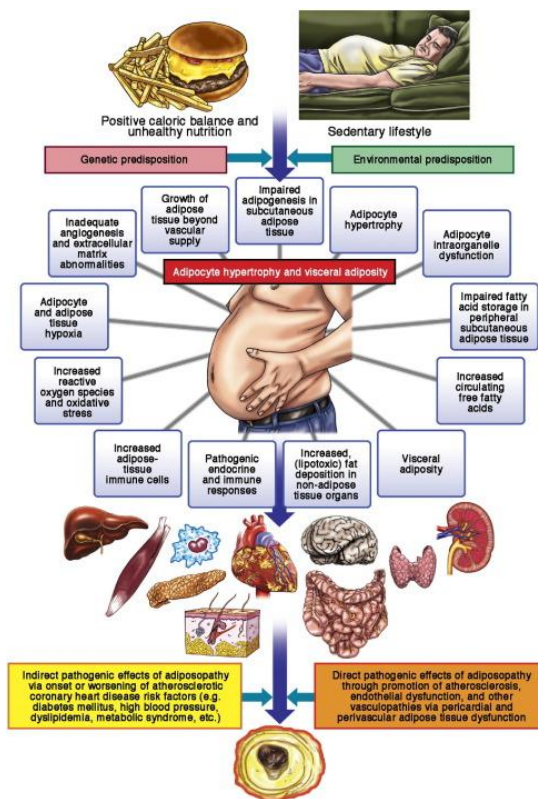


Figura 11. Effetti del tessuto adiposo viscerale in eccesso¹¹⁹.

Abitualmente la distinzione tra le due forme di obesità viene effettuata con le metodiche di *Tomografia Computerizzata* (TC) e di *Imaging a Risonanza Magnetica* (MRI). Queste vengono considerate il “*gold standard*” per la misura della distribuzione del grasso corporeo, ma sono metodiche troppo complesse e costose per un utilizzo di routine. Pertanto, è importante disporre di un metodo semplice e tollerabile per la quantificazione del VAT. La *Circonferenza Vita* (*Waist Circumference*, WC), un semplice marker antropometrico, è attualmente la misura più comunemente usata per l'obesità addominale¹²⁰. La WC è considerata una misura surreale del VAT e ci sono dati che suggeriscono che il WC è associato al rischio di sviluppare malattie cardiovascolari (*Cardiovascular Disease*, CVD)^{121,122}. Tuttavia, la WC è anche largamente influenzata dall'adiposità totale del paziente e non può essere utilizzata per distinguere il VAT dal SAAT. È stato suggerito che la WC potrebbe avere un'associazione più debole con l'aterosclerosi rispetto al VAT^{116,123}. Attualmente, l'ecografia è il metodo più semplice e conveniente per la stima del VAT¹²⁴.

3. STRATEGIE TERAPEUTICHE

3.1 APPROCCI FARMACOLOGICI INNOVATIVI

3.1.1 Le Incretine

Nel 1902 Bayliss e Starling identificarono per la prima volta un fattore chimico circolante, estratto dalla mucosa intestinale, capace di stimolare la secrezione esocrina del pancreas a cui venne dato il nome di secretina¹²⁵. Nel 1930, La Barre e Still purificarono un fattore intestinale, capace di stimolare in maniera selettiva la secrezione endocrina pancreatica, senza influenzare quella esocrina¹²⁶ che chiamarono “incretina”¹²⁷. Successivamente, nel 1940, con Loew et al., era stato ipotizzato che il controllo della glicemia post-prandiale dipendesse anche da fattori prodotti a livello intestinale¹²⁸.

Una determinata quantità di glucosio assunta per via orale determina un incremento di secrezione insulinica superiore rispetto a quella indotta dalla stessa quantità di glucosio somministrata per via endovenosa; per questo motivo si intuì la presenza di un fattore intestinale (*Figura 12*) che potenziasse la secrezione insulinica¹²⁹.

Il grafico in *Figura 12*, a sinistra mostra come i livelli di glicemia nel plasma aumentino in maniera sovrapponibile sia che il glucosio venga somministrato per via orale, sia che venga somministrato per via endovenosa; invece il grafico a destra, sempre in *Figura 12*, mostra che le concentrazioni plasmatiche di c-peptide sono molto più alte in tutti i tempi presi in esame se il carico di glucosio viene fatto per via orale (linea blu), rispetto a quando viene dato endovena (linea rossa)¹²⁹; questa fisiologica maggiore risposta insulinica ad un carico orale di glucosio somministrato per via orale, rispetto alla somministrazione per via endovenosa, prende il nome di “effetto incretinico”.

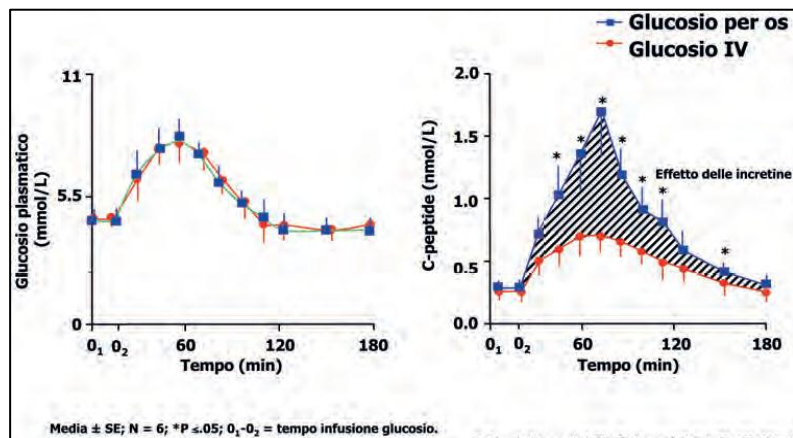


Figura 12. La secrezione insulinica in risposta a carico di glucosio è maggiore quando tale carico è effettuato per via orale rispetto a quando è effettuato per via endovenosa¹²⁹.

Fisiologicamente le principali incretine che vengono secrete dopo pasto sono il *Glucagon-Like Peptide 1* (GLP-1) ed il *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP). Il primo è un ormone polipeptidico secreto dalle cellule enteroendocrine L situate nel tratto distale dell'ileo e del colon; il secondo è sintetizzato dalle cellule K situate nel duodeno e nelle anse prossimali del digiuno.

Oltre al pancreas, i recettori per il GLP-1 e GIP sono presenti in diversi tessuti, quali: cuore, vasi, endotelio, reni, fegato, polmoni, cervello, stomaco, duodeno, tessuto adiposo, surrene, muscolo scheletrico, ipofisi, facendo intuire un loro ruolo anche in altri distretti (**Figura 13**).

La secrezione del GLP-1 è regolata da stimolatori sia di origine neuronale, sia endocrini, ma anche per contatto diretto dei nutrienti con le cellule entero-endocrine L. Il GIP viene rilasciato in seguito alla stimolazione dei grassi contenuti negli alimenti. Entrambi aumentano la secrezione insulinica glucosio-dipendente dalle β -cellule pancreatiche.

GIP e GLP-1 mostrano degli effetti comuni quali: riduzione della glicemia; aumento della secrezione insulinica glucosio-dipendente; aumento delle β -cellule pancreatiche; riduzione dell'apoptosi delle β -cellule; riduzione dello svuotamento gastrico; aumento dell'utilizzazione periferica del glucosio. Gli effetti che riguardano

solamente il GLP-1 sono: aumento del senso di sazietà; riduzione dell'assunzione di cibo; riduzione del peso corporeo; riduzione della secrezione di glucagone; riduzione della secrezione gastrica; riduzione dell'estrazione epatica dell'insulina; aumento della biosintesi dell'insulina.

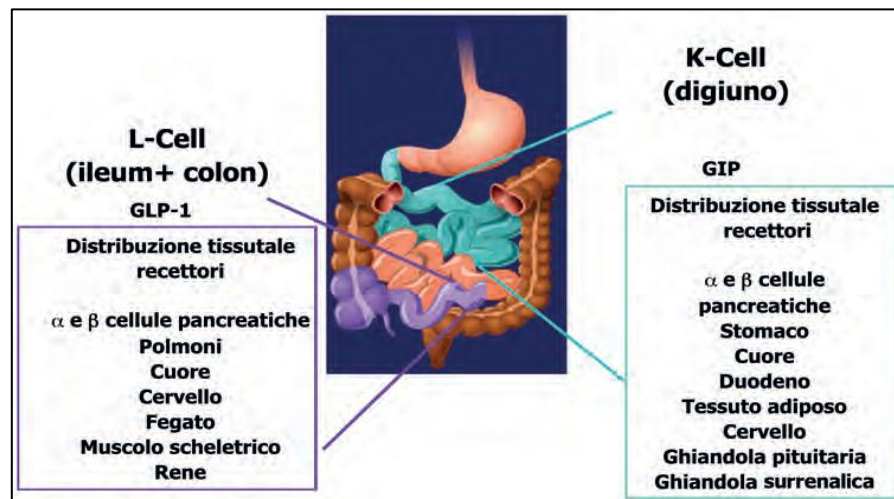


Figura 13. Localizzazione tissutale delle cellule produttrici GIP e GLP-1 e loro distribuzione recettoriale¹³⁰.

Il GLP-1 riduce la secrezione di glucagone da parte delle α - cellule pancreatiche ed è anche in grado di rallentare lo svuotamento gastrico, di indurre sazietà e perdita di peso; tuttavia la limitazione risulta essere quella di avere un'emivita di circa 2 minuti¹³¹ e di essere rapidamente degradato dall'enzima *Dipeptidil-Peptidasi IV* (DPP-4) nella sua posizione N-terminale con la rimozione di 2 aminoacidi.

Nei soggetti diabetici di tipo 2 sono ridotte sia la secrezione insulinica glucosio-indotta^{132,133}, sia il potenziamento insulinico da parte delle incretine; inoltre, in questi soggetti, la secrezione di glucagone è elevata durante il digiuno, non viene soppressa durante un carico orale di glucosio ed è aumentata maggiormente dopo un pasto misto¹³⁴⁻¹³⁷. Questo è dovuto al fatto che i soggetti con DMT2 mostrano un ridotto

effetto incretinico rispetto ai soggetti normali (*Figura 14*) e la secrezione di GLP-1 è ridotta in risposta ad un pasto^{138,139} (*Figura 15*).

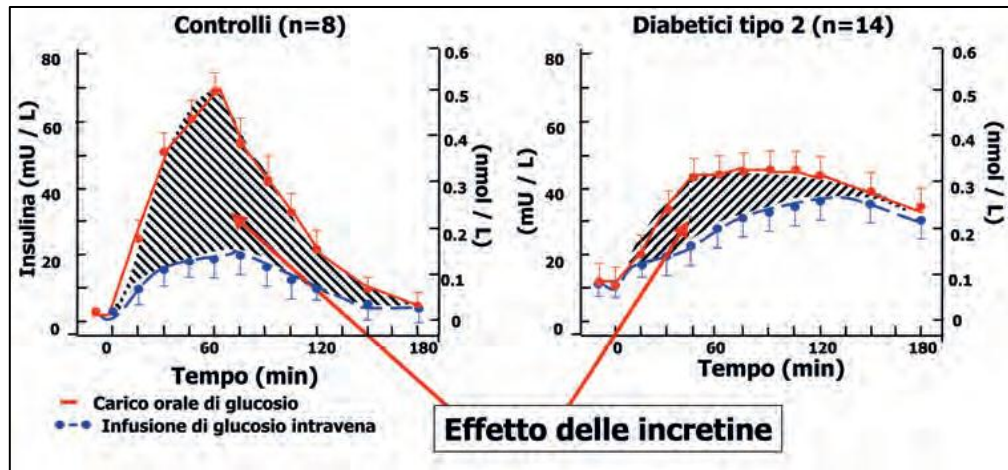


Figura 14. Effetto delle incretine nei soggetti sani ed in soggetti con DMT2¹³⁰.

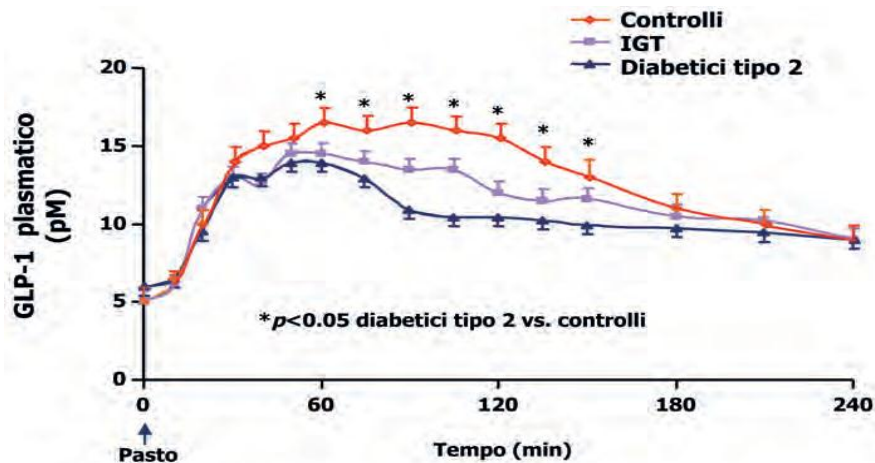


Figura 15. Riduzione dell'effetto del GLP-1 in soggetti con DMT2¹⁴⁰.

A prescindere dal loro effetto ipoglicemizzante, il GLP-1 e i suoi analoghi esercitano effetti benefici sul sistema cardiovascolare ed a livello epatico. È stato dimostrato

come il GLP-1 riesca a modulare la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa; inoltre, ha un effetto protettivo contro i danni causati dalla riperfusione ischemica¹⁴¹. È molto importante sottolineare il fatto che la terapia con analoghi del GLP-1 sembra agire sui fattori di rischio cardiovascolari, tra cui ipertensione, dislipidemia e infiammazioni sub-cliniche di basso grado^{142,143}. Questi effetti favorevoli sul sistema cardiovascolare sono mediati esclusivamente mediante il GLP-1R espresso nei miocardiociti, nelle cellule endoteliali coronariche e nelle cellule vasali muscolari lisce^{141,144}. Il miglioramento della pressione arteriosa può essere correlato al fatto che si ha una maggiore escrezione urinaria di sodio ed acqua e un miglioramento della filtrazione glomerulare¹⁴⁵. In aggiunta a questo, alcuni studi suggeriscono come il metabolita inattivo, presumibilmente il GLP-1 (9-36) ammide, possa migliorare il recupero funzionale nel cuore ischemico attraverso dei meccanismi estranei al GLP-1R¹⁴⁶. A livello epatico, il GLP-1 ha un effetto anabolizzante che porta ad un aumento della sintesi di glicogeno a partire dal glucosio circolante e possa essere in grado di sopprimere la produzione epatica di glucosio, inibendo la secrezione di glucagone da parte delle cellule α -pancreatiche.

Osservando le caratteristiche del GLP-1 sono stati prodotti dei farmaci che cercano di riprodurre le caratteristiche del GLP-1 (seppur con qualche modifica) e di inibire l'attività dell'enzima che degrada il GLP-1. Questi farmaci usati, al momento, per la terapia del DM2 sono gli agonisti recettoriali e gli analoghi del GLP-1. Le modifiche apportate agli analoghi del GLP-1 in posizione N-terminale conferiscono a queste molecole di resistere alla degradazione del DPP-4, mentre quelle con sostituzioni a livello della porzione C-terminale sono caratterizzate da una minore clearance renale¹⁴⁷. Inoltre in base alla loro emivita in circolo si dividono in analoghi ad emivita più breve (exenatide, lixisenatide) e in analoghi ad emivita più lunga (exenatide LAR, liraglutide e dulaglutide); è stato visto negli studi LEAD-6 (*Liraglutide Effect and Action in Diabetes*) e DURATION-6 che gli analoghi ad emivita più lunga riescano a ridurre in maniera più efficace l'*Emoglobina Glicata* (HbA1c) e la glicemia a digiuno

rispetto agli analoghi a più breve emivita^{148,149}. Possono essere utilizzate in associazione ad altri ipoglicemizzanti orali. Il trattamento con questi farmaci inizialmente potrebbe comportare nausea e vomito e questa terapia è sconsigliata in soggetti con insufficienza renale cronica. Questa nuova classe di farmaci è molto importante da tenere in considerazione non soltanto per raggiungere il controllo glicemico, ma anche per i pochi effetti collaterali, il basso rischio di ipoglicemie, per gli effetti sul peso corporeo e per il mantenimento dell'efficacia che sembra mantenersi indipendentemente dal peso corporeo e dalla HbA1c di partenza. Agendo sulla funzione endocrina insulare, dovrebbero essere utilizzati in una fase precoce della malattia, dove ancora è presente una buona massa di β -cellule funzionanti. Nonostante il ricorso a questi farmaci sia consentito dopo il fallimento terapeutico con altri antidiabetici orali, sarebbe opportuno, in linea con le indicazioni EASD/ADA, adottare un atteggiamento terapeutico pro-attivo, che permetta di utilizzare le incretine non appena i valori di HbA1c vadano oltre il valore di 7.0%. Di contro però, le stesse indicazioni ufficiali ne raccomandano l'uso per modeste deviazioni dell'obiettivo terapeutico suggerendone l'introduzione per valori di HbA1c $\geq 7.5\%$ dopo il fallimento della terapia con metformina. Ancora più adeguato sarebbe il loro utilizzo in fasi precoci se si confermasse un effetto protettivo della β -cellula. Studi ad hoc in pazienti con pre-diabete sono in corso, così come sono in corso trials clinici con lo scopo di verificare se gli incretino-mimetici, da soli o in associazione ad insulino-sensibilizzante, saranno in grado di mantenere a lungo il compenso glicemico¹⁵⁰. Inoltre, un altro vantaggio da prendere in considerazione con l'utilizzo degli analoghi del GLP-1 è la perdita di peso; infatti, ad oggi, sono gli unici a stimolare la secrezione insulinica senza comportare un aumento del peso corporeo, al contrario di sulfoniluree o insulina.

Da alcuni anni i farmaci incretinici per mantenere la commercializzazione devono dimostrare la propria sicurezza cardiovascolare, cioè viene richiesto, relativamente all'incidenza di eventi cardiovascolari maggiori, che il farmaco in studio non sia

inferiore al placebo, con un margine superiore dell'intervallo di confidenza che non superi 1.30, in un trial specifico o in una metanalisi di trial condotti su popolazioni ad alto rischio¹⁵¹.

Il primo studio è stato con Lixisenatide (*Evaluation of Lixisenatide in Acute Coronary Syndrome study, ELIXA*)³⁹. ELIXA è uno studio randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli disegnato per valutare il rischio cardiovascolare di lixisenatide, rispetto a placebo su una popolazione di 6.000 soggetti adulti con DMT2, ad elevato rischio cardiovascolare (recente episodio di sindrome coronarica acuta). L'endpoint primario composito, valutato per la non-inferiorità e la superiorità, comprendeva morte per cause cardiovascolari, infarto del miocardio non fatale, ictus non fatale o ricovero per angina instabile. Lo studio è iniziato nel giugno 2010 ed è stato completato nel 2015. Il GLP-1 analogo si è rivelato non inferiore, anche se non superiore al placebo per quanto attiene la sicurezza sugli endpoint cardiovascolari.

Simile risultato è stato confermato dallo studio EXSCEL (*Exenatide Study of Cardiovascular Event Lowering*) con Exenatide⁴⁰ che ha valutato la sicurezza e l'efficacia CV a lungo termine della formulazione settimanale a rilascio prolungato (extended release, ER) dell'originale Exenatide. L'outcome primario dello studio è stato la prima comparsa di uno degli eventi compositi di morte CV, l'infarto miocardico non fatale o l'ictus non fatale (3 punti *Major Adverse Cardiac Event, MACE*), mentre gli outcome secondari hanno compreso la mortalità per tutte le cause, la morte per cause CV e la prima comparsa di infarto miocardico non fatale o fatale, l'ictus non fatale o fatale, l'ospedalizzazione per sindrome coronarica acuta e il ricovero per insufficienza cardiaca. L'outcome primario ha dato risultati deludenti, con un HR per il braccio exenatide vs. placebo di 0.91 (IC 95% 0.83-1.00; $p < 0.001$ per la non inferiorità, ma solo 0.061 per la superiorità). Tutti gli altri outcome secondari, inclusi i componenti del primario nonché il ricovero per insufficienza cardiaca, erano neutrali.

Lo studio LEADER (*Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results*)⁴¹ è un trial effettuato allo scopo di dimostrare la sicurezza cardiovascolare della Liraglutide. Lo studio è stato eseguito su pazienti con diabete di tipo 2 e alto rischio cardiovascolare, prevalentemente con pregressi eventi. Sebbene l'obiettivo primario fosse la non inferiorità rispetto al placebo, nello studio LEADER si è evidenziata una riduzione significativa dell'incidenza complessiva di eventi cardiovascolari maggiori e della mortalità, sia totale che cardiovascolare; un trend verso la riduzione, seppure senza raggiungere la significatività statistica, è stato osservato anche per l'incidenza di infarto, ictus e ospedalizzazioni per scompenso cardiaco.

Recentemente, sono stati ottenuti ottimi risultati sull'outcome cardiovascolare anche con un altro agonista del GLP-1, Semaglutide (*Long-term Outcomes with Semaglutide in Subjects with Type 2 Diabetes Study, SUSTAIN 6*)⁴². L'endpoint primario dello studio era il primo evento di morte cardiovascolare, infarto miocardico o ictus non fatale. L'endpoint primario è stato osservato in 108 su 1648 pazienti (6.6%) nel gruppo allocato a semaglutide ed in 146 su 1649 pazienti (8.9%) in quello a placebo (*Hazard Ratio, HR= 0.74; 95% Confidence Interval, CI= 0.58 to 0.95; p<0.001 per la non-inferiorità*). L'infarto non fatale è stato documentato nel 2.9% dei pazienti trattati con semaglutide e nel 3.9% di quelli trattati con placebo (*HR= 0.74; 95% CI, 0.51 to 1.08; p=0.12*); mentre i pazienti con ictus non fatale erano l'1.6% e il 2.7%, rispettivamente per Semaglutide e placebo (*HR= 0.61; 95% CI, 0.38 to 0.99; p=0.04*). Per Semaglutide si è osservato il fenomeno opposto, con un rischio minore di ictus e (in misura minore) di infarto non fatali, mentre la mortalità non ha mostrato significative riduzioni.

Questi diversi studi meriterebbero una maggiore attenzione in quanto potrebbero riflettere i possibili differenti meccanismi di protezione cardiovascolare peculiari delle singole molecole. Il nostro gruppo ha condotto uno studio clinico che ha dimostrato come liraglutide riduce l'IMT carotideo, marker di aterosclerosi

subclinica, dopo 8 mesi di terapia in add-on a metformina¹⁵². Si è trattato di uno studio pilota su 64 pazienti con DMT2 in prevenzione cardiovascolare primaria, e l'aggiunta di liraglutide (1.2 mg/die) a metformina (1500 mg/die) ha migliorato i parametri glicemici e lipidici, nonché l'IMT carotideo¹⁵². Tuttavia le variazioni dell'IMT carotideo non erano correlate con le variazioni di qualsiasi altro parametro studiato, suggerendo che l'effetto della liraglutide sull'aterosclerosi subclinica era indipendente dai cambiamenti della glicemia e dei lipidi. Dai dati di letteratura più recenti sembra che la liraglutide possa essere utilizzata nei pazienti con sindrome metabolica, la cui espressione ecografica è la steatosi epatica. A tale proposito occorre citare lo studio LEAN (*Liraglutide Safety and Efficacy in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis*)¹⁵³ dove liraglutide veniva somministrata a pazienti diabetici con NAFLD al dosaggio giornaliero di 1.8 mg per 48 settimane; l'outcome primario era la risoluzione del quadro di NAFLD senza peggioramento della fibrosi dal basale alla fine del trattamento, valutato da due patologi mediante biopsia epatica a fine trattamento. Lo studio ha dimostrato che liraglutide è sicura, ben tollerata ed ha portato alla risoluzione istologica di NAFLD¹⁵³. Alla luce di tale studio, abbiamo voluto valutare l'effetto della liraglutide sulla riduzione dell'aterosclerosi subclinica nei soggetti diabetici con e senza NAFLD¹⁵⁴ ed in modo analogo, oltre alla riduzione dei pattern glicemici e lipidici, l'IMT carotideo si è ridotto significativamente nei pazienti diabetici con NAFLD¹⁵⁴. Il nostro gruppo ha inoltre condotto uno studio clinico che ha dimostrato come liraglutide riduce l'IMT carotideo dopo 18 mesi di terapia in add-on a metformina¹⁵⁵. Si è trattato di uno studio pilota su 121 pazienti con DMT2 in prevenzione cardiovascolare primaria, e l'aggiunta di liraglutide (1.2 mg/die) a metformina (1500-3000 mg/die) ha migliorato i parametri antropometrici, glicemici e lipidici, nonché l'IMT carotideo durante tutti i 18 mesi¹⁵⁵. Tuttavia le variazioni dell'IMT carotideo erano correlate con le variazioni dei trigliceridi e la prevalenza dei criteri della sindrome metabolica è stata significativamente ridotta durante lo studio (circa il 26% dei soggetti non ha più soddisfatto i criteri per

sindrome metabolica dopo 18 mesi)¹⁵⁵. In un altro studio, abbiamo valutato l'effetto di liraglutide su marcatori di stress ossidativo, *Eme Ossigenasi-1* (HO-1) e livelli plasmatici di grelina in pazienti con DMT2¹⁵⁶. In uno studio pilota prospettico di 2 mesi su 20 pazienti, l'aggiunta di liraglutide a metformina (1500 mg/die) ha comportato un miglioramento dello stress ossidativo nonché della grelina plasmatica e delle concentrazioni di HO-1 nei pazienti diabetici. Questi cambiamenti non erano correlati con i cambiamenti nella glicemia a digiuno o della emoglobina glicata¹⁵⁶.

3.1.1.1 Exenatide

Exenatide è stato il primo degli agonisti recettoriali del GLP-1 approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) nel 2005 da utilizzare nei pazienti con DMT2 non adeguatamente controllato. Exenatide è una versione sintetica dell'exendina-4, un ormone trovato nella saliva della lucertola Gila Monster, che vive nel deserto della California.

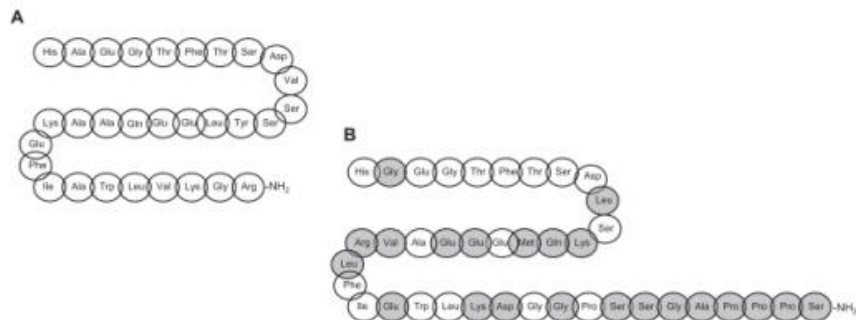


Figura 16. Struttura molecolare del GLP-1 umano (A), Exenatide (B)

Exenatide è composta da 39 aminoacidi e condivide con il GLP-1 umano il 53% di omologia strutturale, rendendola maggiormente resistente all'azione degradativa del DPP-4 (**Figura 16**). Exenatide si lega al recettore del GLP-1, lo attiva e riduce i livelli di glicemia sia a digiuno che post-prandiale.

Nonostante la farmacocinetica dell'Exenatide sia più lunga rispetto al GLP-1 nativo, questa necessita di due somministrazioni giornaliere. Nel 2003, per ovviare a questa breve, seppur maggiore, emivita è stata sviluppata una formulazione a lunga durata d'azione, incapsulandola in micro-sfere di un polimero biodegradabile del diametro di 0.06 mm¹⁵⁷; quando questa formulazione viene iniettata per via sottocutanea, le microsfele si degradano lentamente, controllando il rilascio del farmaco oltre le 10 settimane. È stato visto che Exenatide *Long-Acting Release* (LAR) 2 mg raggiunge la minima concentrazione terapeutica (>50 pg/ml) in circa 2 settimane e lo steady-state (circa 300 pg/ml) in 6-7 settimane; possiede un'emivita media di circa due settimane e dopo la sospensione è stato visto che la concentrazione decresce in circa 6-7 settimane¹⁵⁸. È eliminato prevalentemente attraverso la filtrazione renale ed ha una clearance media di 9.1 l/h.

Gli studi DURATION 1-6 hanno comparato Exenatide LAR con altri ipoglicemizzanti compresa l'insulina; questi studi generalmente hanno incluso pazienti con una HbA1c compresa tra 7.1% - 11% ed un BMI compreso tra 24-40 kg/m². Gli studi DURATION e le metanalisi a disposizione hanno permesso di chiarire meglio gli effetti di Exenatide rispetto agli altri ipoglicemizzanti orali sul controllo glicemico e su altri parametri come peso corporeo e pressione sanguigna¹⁵⁹.

Effetti sul controllo glicemico

Negli studi DURATION-1 e DURATION-5 sono stati comparati l'efficacia ed il profilo di sicurezza di Exenatide LAR contro 10 µg di Exenatide somministrata due volte al giorno. Nel primo sono stati presi 295 pazienti con DM2 ed una HbA1c= 8.3% (deviazione standard= 1.0). Alla fine delle 30 settimane si sono ottenuti risultati migliori nel controllo glicemico con l'Exenatide settimanale rispetto alla somministrazione giornaliera, con una riduzione della HbA1c di circa 1.9% rispetto a circa 1.5% della giornaliera ed il 77% dei pazienti ha raggiunto il target di HbA1c= 7.0%, contro il 61% dei pazienti valutabili. Exenatide LAR ha migliorato anche la

glicemia a digiuno di circa 41 mg/dl vs 25 mg/dl. Tuttavia la glicemia post-prandiale è risultata più bassa nella formulazione giornaliera (-124 mg/dl vs -95 mg/dl)¹⁶⁰. Anche lo studio DURATION-5, della durata di 24 settimane, ha messo in evidenza come l'Exenatide LAR migliora l'HbA1c e la glicemia a digiuno rispetto alla somministrazione bis-in-die, in accordo con lo studio DURATION-1¹⁶¹. Exenatide LAR si è mostrata superiore nel ridurre la HbA1c e la glicemia a digiuno rispetto a sitagliptin e pioglitazone, come mostra lo studio DURATION-2 in cui si ha, alla fine delle 52 settimane, un miglioramento della HbA1c pari a $1.6 \pm 0.1\%$ e un miglioramento della glicemia a digiuno di -32 ± 5 mg/dl nei pazienti che hanno ricevuto solo Exenatide LAR. I pazienti che hanno fatto lo switch da sitagliptin ad Exenatide LAR hanno avuto un miglioramento sulla HbA1c pari a $0.3 \pm 0.1\%$ e sulla glicemia a digiuno pari a 13 ± 4 mg/dl. Infine i pazienti che hanno cambiato da pioglitazone a Exenatide LAR hanno ottenuto risultati paragonabili ai pazienti che hanno avuto solamente Exenatide LAR per quanto riguarda la HbA1c ed una glicemia a digiuno pari a -31 ± 5 mg/dl¹⁶². È stato comparato anche Exenatide LAR con insulina glargine nello studio DURATION-3 in cui, a tre anni, la variazione nella media dei minimi quadrati dell'HbA1c è risultata di -1.01% (*Standard error*, ES 0.07) nel gruppo Exenatide rispetto a -0.81% (SE 0.07) nel gruppo glargine¹⁶³. La valutazione degli effetti di Exenatide a rilascio prolungato rispetto ad un altro agonista del GLP-1R è stato fatto nello studio randomizzato, open-label, DURATION-6 della durata di 26 settimane. I risultati preliminari hanno evidenziato come i risultati migliori si sono ottenuti nei pazienti del gruppo liraglutide 1.8 mg giornaliera; infatti, la HbA1c si è ridotta di 1.48% (SE= 0.05) nei soggetti appartenenti a questo gruppo, rispetto a quelli appartenenti a Exenatide LAR (HbA1c= -1.28% , SE= 0.05)¹⁴⁸. Questi risultati persistono per più di 2 anni, come dimostrato nella fase di continuazione degli studi DURATION, in cui mostrano che dopo 2 anni, la HbA1c e la glicemia a digiuno hanno una riduzione media di -1.7% e -40 mg/dl, rispettivamente^{164,165}. Gli studi clinici con Exenatide a rilascio prolungato

hanno indicato un miglioramento della funzione β -cellulare, usando metodi di misurazione come *l'Homeostasis Model Assesment* (HOMA-B) la durata dell'effetto sulla funzione beta-cellulare è stata mantenuta per 52 settimane.

Effetti sul peso corporeo

Un effetto molto interessante di Exenatide osservato non soltanto negli studi DURATION, ma anche in diverse metanalisi, è stato quello sul controllo del peso corporeo; indipendentemente dalla presenza di nausea, Exenatide determina una riduzione dell'assunzione di cibo senza modificare il dispendio energetico, determinando un significativo calo ponderale¹⁶⁶, che sembra essere maggiore se viene associato alla metformina, suggerendo una possibile sinergia tra i due farmaci¹⁶⁷. La terapia con Exenatide LAR è associata ad una perdita di peso di -2.56 kg (95% CI= -3.12 a -2.00)¹⁶⁸. Analisi post-hoc hanno raccolto dati da pazienti che assumevano Exenatide ed hanno osservato che c'è stata una perdita di peso dal base-line di -2.5 kg (95% CI= -2.8 kg a -2.3 kg), dopo 24-30 settimane di trattamento¹⁶⁹. Rispetto ai comparatori, come pioglitazone ed insulina glargine, Exenatide LAR ha avuto risultati nettamente migliori sul peso corporeo, il quale è risultato essere maggiore al termine del trattamento sia con pioglitazone (DURATION-2 e -4) che con glargine (DURATION-3). Tuttavia non ci sono stati significativi cambiamenti nei pazienti che hanno assunto altri analoghi del GLP-1 (DURATION-1 e -5); di contro, la liraglutide è stata più efficace nella perdita di peso corporeo con -3.6 kg (SE= 0.18), rispetto a -2.68 kg (SE= 0.18) di Exenatide LAR al termine delle 26 settimane (DURATION-6). Da valutare è anche l'andamento nel tempo dell'effetto ponderale; infatti le estensioni in aperto degli studi clinici in doppio cieco mostrano che, proseguendo la terapia, la riduzione del peso continua senza avere un apparente effetto "*plateau*" fino a 3 anni di trattamento¹⁷⁰, suggerendo che Exenatide non induca tolleranza ai propri effetti sul peso, almeno a medio termine.

Effetti sul profilo lipidico

È stato osservato anche l'importante contributo che Exenatide LAR offre sul profilo lipidico. Gli agonisti del GLP-1R sono in grado di ridurre le LDL piccole e dense, che sono le principali responsabili del rischio aterogeno, con un aumento delle LDL di più grandi dimensioni¹⁴³. È stato visto come l'Exenatide settimanale, somministrata per 30 settimane, riduce l'apolipoproteina B e il rapporto apolipoproteina B/ apolipoproteina A₁, indipendentemente dal compenso glicemico e dalla perdita di peso¹⁷¹. In un altro studio di 52 settimane è stato visto che, pazienti che all'inizio avevano LDL ≥ 100 mg/dl, HDL $\leq 40/50$ (maschi/femmine) o trigliceridi ≥ 150 mg/dl hanno mostrato, al termine dello studio, miglioramenti importanti in tutti questi parametri lipidici con il trattamento di Exenatide LAR:

1. LDL: -12.7 (SE=1.61) mg/dl, $p < 0.0001$;
2. HDL: 2.5 (SE=0.34) mg/dl, $p < 0.0001$;
3. trigliceridi: -21% (1.9), $p < 0.0001$ ¹⁷².

Effetti sui fattori di rischio cardiovascolare

Il trattamento con agonisti GLP-1R è stato visto essere in grado di ridurre la pressione arteriosa. Studi di metanalisi, hanno mostrato come sia in grado di abbassare la pressione sistolica di -1.79 mmHg (95% CI = -2.94 a -0.64) in confronto al placebo e di -2.39 mmHg (95% CI = -3.35 to -1.42) rispetto al controllo attivo; la pressione diastolica, invece, non ha subito grandi variazioni di importanza statistica¹⁷³. In considerazione di queste osservazioni uno studio di 52 settimane ha valutato anche l'effetto di Exenatide LAR sulla pressione arteriosa. I risultati alla fine questo studio hanno mostrato miglioramenti sia sulla *pressione sistolica* (SBP), che su quella *diastolica* (DBP):

- SBP: -3.6 (SE=0.56) mmHg, $p < 0.0001$;
- DBP: -1.2 (SE=0.34) mmHg $p < 0.001$.

I risultati migliori si sono osservati nei pazienti con SBP elevata all'inizio dello studio (≥ 130 mmHg), con i seguenti valori alla fine delle 52 settimane:

- SBP: -8.5 (SE=0.85) mmHg, $p < 0.0001$;
- DBP: -3.0 (SE=0.50) mmHg, $p < 0.0001$.

Infine pazienti che al base-line avevano SBP ≥ 130 mmHg e DBP ≥ 80 mmHg, alla fine dello studio mostravano:

- SBP: -8.9 (SE=1.10) mmHg, $p < 0.0001$;
- DBP: -5.0 (SE=0.58) mmHg $p < 0.0001$.

Dei pazienti *Intent-To-Treats* (ITT) con SBP anormale alla base-line, il 41% ha raggiunto una SBP normale al termine delle 52 settimane¹⁷². Questa azione probabilmente è dovuta ad una azione diretta del farmaco sulle resistenze periferiche¹⁷⁴. Uno studio ha messo in rilievo come l'exendina-4 riesca a inibire l'ipertrofia cardiaca attraverso l'up-regolazione dell'espressione del recettore del GLP-1 e attivando il pathway di segnale AMPK/mTOR (*AMP-Activated Protein Kinase /Mammalian Target of Rapamycin*)¹⁷⁵; inoltre, un altro studio, effettuato su topi modificati geneticamente, ha mostrato come l'exendina-4 sia capace di migliorare l'infiammazione epatica e vasale, risultando potenzialmente e simultaneamente utile nel trattamento della NASH e dell'aterosclerosi, attraverso la riduzione dell'infiltrazione macrofagica nel fegato e la riduzione delle LDL ossidate fagocitate dai macrofagi a livello vasale¹⁷⁶. Non è da escludere che Exenatide possa agire attivando questa stessa via e contribuire alla riduzione dell'ipertrofia cardiaca. Tuttavia il ruolo del GLP-1 sull'ipertrofia cardiaca rimane ancora sconosciuto.

Sicurezza e tollerabilità

L'ipoglicemia è l'evento avverso più significativo quando si attua una terapia anti-diabetica, soprattutto se si utilizzano sulfoniluree ed insulina (DURATION-1 e -5). Le terapie basate su Exenatide, verosimilmente dovuto al suo meccanismo d'azione, sono associate ad un minimo rischio di ipoglicemia. Uno degli studi a dimostrare

questo è stato lo studio EUREXA (*Europe Exenatide Study*) che ha documentato come l'incidenza di ipoglicemia è stata significativamente inferiore con Exenatide rispetto alle sulfoniluree¹⁷⁴. L'incidenza dell'ipoglicemia è aumentata quando Exenatide LAR è stato usato in associazione con una sulfonilurea (24% vs 5.4%) e per ridurre il rischio sarebbe opportuno rivalutare la terapia con le sulfoniluree, diminuendone la dose. Exenatide LAR è stato associato ad un'incidenza significativamente inferiore di episodi di ipoglicemia rispetto ad un'insulina basale nei pazienti che ricevevano metformina ed anche nei pazienti che ricevevano metformina associata ad una sulfonilurea (DURATION-3)¹⁶³.

I frequenti eventi avversi associato ad Exenatide e sottolineati negli studi DURATION sono stati legati ad una sintomatologia gastro-intestinale, come nausea e vomito, i quali tendono a migliorare dopo circa 8 settimane di trattamento. Lo studio DURATION-1 mostra come l'Exenatide settimanale ha un'incidenza di nausea minore rispetto all'Exenatide Bis-in-die, rispettivamente 26% e 35%; inoltre, sempre in questo studio, l'incidenza del vomito è stata minore ancora una volta nella somministrazione settimanale, con un 11% rispetto al 19%¹⁴⁹. Tuttavia, le percentuali di sospensione della terapia a causa degli effetti collaterali sono state maggiori nei soggetti con Exenatide LAR vs insulina glargine (DURATION-3), Exenatide LAR vs iDPP-4 (DURATION-2 e -4) e pressoché paragonabili negli studi in cui si confrontavano Exenatide LAR vs metformina, pioglitazone ed Exenatide bis-in-die (DURATION-4 e -5). È stato osservato che alcuni pazienti possono sviluppare anticorpi anti-Exenatide, in seguito al trattamento con Exenatide LAR; questo titolo anticorpale diminuisce nel tempo e circa il 45% dei pazienti ha avuto un titolo anticorpale basso alla fine degli studi clinici. Dal punto di vista del controllo glicemico non sono state viste discordanze rispetto ai pazienti che non hanno sviluppato anticorpi anti-Exenatide.

L'uso degli analoghi del GLP-1 è stato potenzialmente associato all'incremento del rischio di pancreatiti e di tumore al pancreas. Bisogna però sottolineare che il rischio

di pancreatite nei soggetti diabetici è aumentato rispetto alla popolazione generale, a seguito della concomitante presenza in questi soggetti di possibili altri fattori di rischio per la pancreatite stessa, quali calcolosi biliare e ipertrigliceridemia. Sono state fatte delle ricerche riguardanti gli agonisti del recettore del GLP-1 e di Exenatide LAR raccogliendo tutti gli studi randomizzati della durata maggiore di 11 settimane che hanno arruolato pazienti con DMT2. I dati ottenuti hanno confermato la sicurezza degli agonisti del GLP-1R per quanto riguarda la pancreatite ed il cancro al pancreas, in quanto l'incidenza di queste due patologie non era significativamente differente rispetto ai comparatori¹⁷⁷. Tuttavia dovrebbero essere condotti in futuro ulteriori studi a lungo termine, con campioni di pazienti più ampi, per confermare questi risultati, in quanto i pareri a riguardo da parte della comunità scientifica sono ancora discordanti.

Alla luce di questi risultati, l'Exenatide LAR si presenta non soltanto come un farmaco altamente tollerabile, ma anche con un buon profilo di sicurezza.

3.2 APPROCCI NUTRACEUTICI

Oltre alla terapia farmacologica, o in associazione ad essa, in ambito clinico si assiste ad un crescente utilizzo di prodotti naturali in grado di agire sui parametri ematochimici e strumentali. Ed è proprio in questo quadro che si inserisce il nuovo significato di alimentazione intesa non più come la semplice assunzione di alimenti, ma piuttosto come strumento di cura e mezzo per il raggiungimento del benessere psicofisico. Questo concetto non è recente, ma già nel quarto secolo a.C. Ippocrate nel *De Dieta* scriveva “*l'uomo è ciò che mangia*” ed è su questa base che si è diffuso il consumo degli alimenti funzionali i quali secondo la nutraceutica hanno una funzione benefica sulla salute¹⁷⁸. Il termine *nutraceutica* è stato coniato nel 1989 dal Dr. S. De Felice, si tratta di un neologismo derivante dalla fusione dei termini nutrizione e farmaceutica e si riferisce allo *studio di alimenti che hanno un'influenza benefica su una o più funzioni del corpo tanto da risultare rilevante per uno stato di*

*benessere o per la riduzione del rischio di malattia*¹⁷⁹. L'Italia può vantare straordinarie potenzialità di sviluppo nel campo della nutraceutica soprattutto per la presenza di numerosi prodotti naturali che contengono nutrienti importanti per ridurre il rischio di incorrere in patologie cardiovascolari, degenerative e tumorali. I più noti nutrienti, contenuti in diversi alimenti di uso comune (carni rosse, crostacei, pomodoro, spinaci, broccoli, uova, mele, uva, vino rosso) sono: la carnitina, la glucosamina, l'octacosanolo, le proantocianidine, il licopene, l'acido linolenico, la luteina. E' stato dimostrato che il chitosano ha effetti benefici su diversi parametri metabolici inclusi i lipidi, la resistenza all'insulina e obesità¹⁸⁰. Evidenze sperimentali ed epidemiologiche suggeriscono che, negli alimenti, la presenza di polifenoli, in particolare, di flavonoidi ha un effetto positivo nel ridurre l'insorgenza di aterosclerosi¹⁸¹. In particolare, il consumo giornaliero del succo del frutto *Citrus Bergamiae Risso* ha mostrato di influenzare positivamente i livelli di lipidi plasmatici e ridurre il rischio di malattia coronarica¹⁸². Gli effetti ipolipemizzanti possono essere correlati a diversi componenti di succo agrumi, come i flavonoidi (naringina e esperidina), pectine e acido ascorbico, che hanno un elevato potenziale antiossidante e interferiscono con il metabolismo del colesterolo¹⁸³. Inoltre i nutraceutici possono essere utilizzati in associazione alle terapie praticate per modulare al meglio gli effetti terapeutici dei farmaci e ridurre il rischio di complicanze; per esempio la curcuma, l'acido clorogenico, la silimarina e la silibina hanno mostrato ottimi risultati in pazienti con SM in add on alle terapie farmacologiche praticate¹⁸⁴.

I risultati delle ricerche sui composti naturali sono stati accolti con grande favore dalla comunità scientifica internazionale ed hanno contribuito alla diffusione del modello alimentare della *Dieta Mediterranea* (DM), a tal punto che nel 2010 l'UNESCO ha inserito tale Dieta nella prestigiosa lista dei patrimoni immateriali dell'Umanità. La DM è ricca di alimenti particolarmente benefici, come l'*Olio Extravergine d'Oliva* (EVO) e l'*Opuntia Ficus-Indica* (OFI) che, per la loro

composizione ricca di polifenoli, si rivelano particolarmente utili per la salute dell'organismo.

3.2.1 Olio extravergine di oliva ad alto contenuto di *Oleocantale* (OC)

Composizione dell'olio extravergine d'oliva

Gli oli provenienti dalla lavorazione delle olive rappresentano uno dei più antichi alimenti. Insieme alla pianta di olivo essi sono, infatti, noti da millenni sia come impiego alimentare sia come unguento e come fonte di illuminazione. Oggi hanno prevalentemente la destinazione di condimento, sostanza grassa di copertura o mezzo di cottura. Negli ultimi trent'anni si sono verificati profondi cambiamenti nella conoscenza degli aspetti nutrizionali dell'olio di oliva, tanto da considerarlo alla base della cosiddetta "dieta mediterranea" e quindi ricco di importanti principi nutrizionali indispensabili, quali gli acidi grassi monoinsaturi, gli acidi grassi essenziali e vari antiossidanti. Viene definito "olio extravergine d'oliva", l'olio ottenuto direttamente dalle olive e unicamente da procedimenti meccanici, la cui acidità libera espressa in acido oleico è al massimo 0,8 g per 100 g di olio¹⁸⁵. La composizione chimica dell'olio d'oliva è rappresentata da una frazione saponificabile e dai componenti che costituiscono la frazione insaponificabile. Mentre i componenti della prima frazione, sono pressoché uguali in tutti gli oli d'oliva, quelli della seconda, invece, subiscono variazioni qualitative e quantitative molto importanti. La *porzione saponificabile* è costituita per il 98-99% da una miscela di gliceridi, cioè esteri del glicerolo con acidi grassi (soprattutto trigliceridi). Gli acidi grassi presenti possono essere monoinsaturi, come l'acido oleico, che è il più abbondante degli acidi grassi (75%), saturi come il palmitico (7-15%) e lo stearico (26%) oppure polinsaturi come il linoleico e l' α -linolenico (9%). Nella frazione saponificabile, accanto ai trigliceridi sono presenti, sia pure in quantità minime, digliceridi (2-3%) e monogliceridi (0,1-0,2%) e pochissimi acidi grassi liberi. La *frazione insaponabile* è costituita da componenti minori, cioè presenti in piccole quantità, che corrispondono a più di 230 sostanze chimiche

appartenenti a diverse classi. Tra i componenti minori vi sono fosfolipidi, cere, sfingolipidi, metil steroli, alcoli lineari, di- e triterpenici, dialcoli triterpenici, steroli, tra cui il più cospicuo è il β -sitosterolo, mentre risulta quasi assente il colesterolo ed infine i tocoferoli. Questi ultimi sono composti antiossidanti di struttura analoga alla vitamina E ed hanno la funzione di proteggere dall'ossidazione perché essi stessi sono ossidabili, catturano i radicali liberi che si formano durante l'ossidazione dei composti insaturi. Tra i componenti troviamo anche idrocarburi olefinici, come lo squalene, e paraffinici, alcuni pigmenti come i caroteni (principalmente luteina e β -carotene), antociani, flavonoidi e clorofille ed i loro derivati come le feofitine. Tra i componenti minori non saponificabili troviamo le sostanze fenoliche. Tra queste, una molecola sempre presente nella drupa è l'oleuropeina (allo stato di glucoside) che è prevalentemente la sostanza causa del sapore amaro delle olive. Sul profilo aromatico dell'olio assumono importanza i componenti volatili: i più significativi sono aldeidi, alcoli ed esteri a 6 atomi di carbonio (la trans-2-esenale, il 2-esenolo e l'esenilacetato). Inoltre sono presenti anche l'*Oleocantale* (OC), l'idrossitirosolo e il tirosolo, che sono le principali sostanze nutraceutiche dell'olio extravergine d'oliva. Tra le vitamine si possono annoverare le liposolubili quali A, che si forma dal suo precursore, il β -carotene, D che controlla il metabolismo del calcio, previene il rachitismo e regola la crescita delle ossa, PP, H ed infine la vitamina K che ha un'azione antiemorragica¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

Effetti nutraceutici dell'olio extravergine d'oliva

La particolare composizione dell'olio d'oliva extravergine, ricco in acido oleico e con adeguate quantità di importanti antiossidanti, si rivela particolarmente utile per la salute dell'organismo. La particolare fragranza dell'olio d'oliva rende le varie vivande più gustose e appetibili e questo, si è dimostrato, contribuisce ad attivare gli stimoli secretori dell'apparato digerente favorendo una migliore digeribilità e metabolizzazione ed un'ottima tolleranza gastrica ed intestinale. Per il suo contenuto

ricco di acidi grassi monoinsaturi, in particolare di acido oleico, protegge la mucosa gastrica, diminuisce la secrezione di acido cloridrico (importante per coloro i quali soffrono di ulcera gastrica o duodenale), inibisce la secrezione della bile, migliora lo svuotamento biliare della cistifellea prevenendo così la formazione di calcoli, produce una minore attività secretoria del pancreas, importante nelle patologie come la pancreatite e facilita l'assorbimento delle vitamine liposolubili e del calcio. Inoltre esercita un'azione lassativa contribuendo a correggere la stipsi cronica, riducendo il rischio di alcune malattie autoimmuni e di tumori del seno e del colon retto¹⁸⁹. L'acido oleico presente nell'EVO interferisce positivamente sui processi di biosintesi e sul metabolismo del colesterolo, mantenendo bassi o riducendo sia i livelli di colesterolo totale (riduzione del 10%), sia di colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità LDL (riduzione del 13%), impedendo anche la sua ossidazione (riduzione del 14%) e sia dei trigliceridi VLDL (riduzione del 13%). Non diminuisce invece il livello del colesterolo legato alle lipoproteine ad alta densità HDL, il cosiddetto "colesterolo buono" che evita l'accumulo dei grassi nelle pareti delle arterie. Questi grassi potrebbero penetrare nelle cellule della parete interna delle arterie attraverso dei recettori e in tali condizioni queste cellule tenderebbero ad irrigidirsi ed a rompersi. Quest'ultime inglobate dai macrofagi darebbero vita alle cosiddette cellule schiumose che si accumulerebbero nell'intima dando luogo a delle strie lipidiche e quindi alle famigerate placche aterosclerotiche, impedendo il normale flusso del sangue o causando dei trombi. L'acido oleico agisce anche sulla pressione arteriosa riducendola e negativamente sulla sintesi dell'acido arachidonico, il quale ha una nota azione pro-infiammatoria¹⁸⁹⁻¹⁹⁶. Oltre all'acido oleico, l'EVO è una fonte preziosa di *Acidi Grassi Essenziali* (AGE) come l'acido linoleico e l' α -linolenico, precursori dei PUFA: acido arachidonico, *Eicosapentaenoico* (EPA), *Docosapentaenoico* (DHA). Gli acidi grassi della serie ω -3, EPA e DHA hanno un'importante attività anti-aterogena, anti-infiammatoria, anti-trombotica e anti-aggregante, mentre l'acido arachidonico è importante sia nello sviluppo embrionale

sia nell'accrescimento del bambino. Il DHA inoltre è estremamente importante per il corretto sviluppo del *Sistema Nervoso Centrale* (SNC) del feto in quanto è il principale costituente dei fosfolipidi di membrana delle cellule nervose, soprattutto per quella parte neurale che andrà a definire l'occhio: la retina. I costituenti minori dell'olio d'oliva, anche se presenti in piccole quantità, rappresentano elementi di grande importanza funzionale o nutraceutica. Tra questi i più importanti sono i polifenoli che conferiscono il tipico sapore lievemente amaro e piccante all'olio d'oliva. Questi composti, si è visto che riducono il rischio di sviluppare aterosclerosi e vari disturbi cardiovascolari grazie alle loro proprietà anti-infiammatorie ed anti-ossidanti; è noto infatti, come un eccesso di radicali liberi possa causare l'ossidazione di molecole quali DNA e lipidi. Da studi si è potuto constatare come i polifenoli inibiscono, in particolare, il percorso di attivazione della NF- κ B, un dimero che in assenza di uno stimolo infiammatorio, è localizzato nel citoplasma, complessato con una proteina inibitoria chiamata I κ B (*Inhibitor of NF- κ B*), la quale maschera la sua *Sequenza di Localizzazione Nucleare* (NLS). Quando uno stimolo extracellulare attiva la via di NF- κ B si attivano le IKK, chinasi specifiche per I κ B, che fosforilano I κ B α , promuovendo la reazione di poliubiquitinazione sulle lisine e quindi la rapida degradazione di I κ B. In sua assenza è dunque smascherata la sequenza di localizzazione nucleare e NF- κ B può migrare nel nucleo dove attiva la trascrizione dei geni bersaglio come le citochine IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), INF γ (*Interferon Gamma*), TNF- α , COX-2 (Ciclossigenasi), iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*), VCAM-130, molecole alla base del processo infiammatorio¹⁹⁷⁻²⁰⁰.

Inoltre i polifenoli dell'olio extravergine d'oliva hanno effetti nutrigenomici. La nutrigenomica è la scienza che studia le relazioni tra il cibo e la struttura del DNA individuale, focalizzandosi sugli effetti che ha il cibo sull'espressione genica. Il nome scientifico fu coniato dal ricercatore Jim Kaput indicando con nutrigenomica la disciplina che applica la genetica alla scienza della nutrizione. Allo stato attuale,

esistono pochi dati sull'effetto in vivo dell'espressione genica indotta dalla dieta mediterranea. Ma alcuni effetti benefici sulla salute, di particolari componenti dell'olio d'oliva, sono già stati studiati sia in vitro che nei modelli animali. Per esempio si è visto che un estratto polifenolico dell'olio d'oliva ha effetti chemioprotettivi ed anti-proliferativi su alcune cellule di adenocarcinoma del colon umano, poiché interagiscono con vie di segnalazione responsabili dello sviluppo del cancro del colon-retto. Nello studio è stato utilizzato un estratto contenente idrossitirosolo, tirosolo e vari derivati secoiridoidi, tra cui oleuropeina, che inibiva la proliferazione delle cellule tumorali, determinando un blocco del ciclo cellulare fase G2/M, che è mediato dalla capacità dei polifenoli dell'olio di oliva (50 microg/ml) di esercitare una rapida inibizione di p38 e CREB (*cAMP Response Element-Binding Protein*). In particolare è stato mostrato che i polifenoli inibiscono la trascrizione del c-AMP che determina, a sua volta, la mancata fosforilazione di CREB, con il risultato di una conseguente riduzione dell'espressione della COX-2. Questi risultati ottenuti in colture cellulari o in modelli animali sono rilevanti per la conoscenza della relazione tra aspetti nutrizionali ed espressione genica, ma sono limitati dall'uso di dosi più alte rispetto a quelle ingerite con la dieta. L'identificazione di geni espressi in alcune cellule mononucleate in seguito al consumo di EVO nelle cellule di sangue periferico offre uno spunto sui meccanismi biologico-molecolari. Sottolineando i benefici dell'EVO sulla salute umana in particolare nella prevenzione delle malattie età correlate. In accordo con ciò, è stata dimostrata una differenza nell'espressione dei geni, correlati con il progredire dell'arteriosclerosi, dopo 3 settimane di consumo di EVO nella dieta²⁰¹.

L'oleocantale: caratteristiche e funzioni

L'oleocantale è un composto presente nella frazione polifenolica dell'olio extravergine d'oliva, anche conosciuto come (-)dicarboxymethyl ligstroside aglycone.

Esso è una potenziale molecola terapeutica in quanto ha mostrato importanti proprietà farmacologiche in vari processi patogenici, tra cui:

- infiammazione;
- tumori;
- malattie neurodegenerative come l'Alzheimer.

L'oleocantale è stato identificato per la prima volta da Montedoro et al. nel 1993²⁰², ma isolato, estratto e sintetizzato solo nel 2005 da Beauchamp et al.²⁰³ i quali hanno osservato che la sua ingestione provocava una sensazione di irritazione nella regione orofaringea simile a quella che si osservava dopo l'ingestione dell'EVO. Essi dimostrarono che l'oleocantale era l'unico fenolo responsabile della sensazione pungente dell'olio extravergine d'oliva e per questo motivo lo chiamarono oleocanthal: oleo- per oliva, canth- per stringenza ed al- per aldeide. La scoperta fu raggiunta attraverso la quantificazione dell'oleocantale in vari oli extravergine e la misurazione dell'irritazione alla gola. Tuttavia per escludere la possibilità che altri composti in EVO potessero contribuire alla caratteristica percettiva, l'oleocantale è stato sintetizzato e disciolto in olio di mais. L'irritazione risultava uguale a quella dell'EVO ed inoltre era dose-dipendente (di oleocantale) dimostrando effettivamente che l'oleocantale è l'unico responsabile della sensazione irritante²⁰³. Inoltre questa forte sensazione di bruciore era simile a quella causata da un anti-infiammatorio non steroideo, l'ibuprofene benchè strutturalmente diverso^{204,205}. Un punto di interesse è che l'irritazione prodotta dall'oleocantale è specifica per la regione orofaringea. Generalmente composti irritanti o pungenti sono percepiti in tutte le regioni della cavità orale piuttosto che isolati ad un'area spazialmente distinta. Questo implica l'esistenza di un recettore sensoriale specifico per l'oleocantale nella regione orofaringea²⁰⁴. Peyrot des Gachons et al.²⁰⁶ hanno identificato il recettore *Transient Receptor Potential Ankyrin-1* (TRPA-1) un canale cationico, non selettivamente permeabile ai cationi, appartenente alla sottofamiglia A1, che lega l'oleocantale. Ipotizzarono che la grande variabilità inter-individuale nella sensibilità

all'oleocantale potesse essere dovuta a variazioni di espressione dei recettori TRPA-1 nella regione orofaringea²⁰⁶. Quindi, il grado di irritazione percepito da un singolo individuo poteva essere determinato non solo dalla concentrazione di oleocantale presente nell'olio extravergine d'oliva, ma soprattutto dalla sensibilità che ha un individuo nei confronti del composto, e cioè dalla diversa espressione dei recettori. Già nel 2009 Cicerale et al. avevano dimostrato che utilizzando un olio extravergine di oliva contenente una concentrazione di oleocantale di 54 mg/kg, l'effetto variava da una leggera irritazione alla gola ad una irritazione di intensità sufficiente a produrre tosse negli individui altamente sensibili²⁰⁴. E' stato confermato che l'oleocantale è capace di formare addotti con la cisteina, ma questa caratteristica non consente di attivare TRPA-1, come invece fa la cinnamaldeide. Per verificare l'ipotesi che l'oleocantale non attiva TRPA-1 tramite modifica cisteinica, i ricercatori hanno testato l'attività dell'oleocantale su un mutante TRPA-1 reso insensibile o debolmente sensibile agli agonisti elettrofili, attraverso la sostituzione di due cisteine reattive con due residui di serina e si è visto che l'azione della cinnamaldeide era alterata nelle cellule che esprimono la TRPA-1 mutante, invece l'oleocantale induceva correnti ioniche, simili a quelle evocate nelle cellule wild-type. Questi dati confermano che l'oleocantale attiva il canale ionico tramite un meccanismo diverso rispetto agli agonisti TRPA-1 più elettrofili. E' anche possibile, ed è ancora oggetto di studio, che i livelli di recettore TRPA-1 nei muscoli del resto del corpo riflettano i livelli che possiamo trovare nella regione orofaringea e pertanto bassi o alti livelli di TRPA-1 nella regione orofaringea possono a loro volta riflettere la risposta infiammatoria nei muscoli (**Figura 17**) attraverso l'attivazione di p38 MAPK²⁰⁶.

Gli studiosi osservando che la sensazione di irritazione alla gola causata dall'oleocantale era simile alla sensazione provocata dall'ibuprofene (*Farmaci Anti-Infiammatori Non Steroidei*, FANS), ipotizzarono e provarono che i due composti hanno caratteristiche farmacologiche simili, nonostante siano strutturalmente diversi (**Figura 18**).

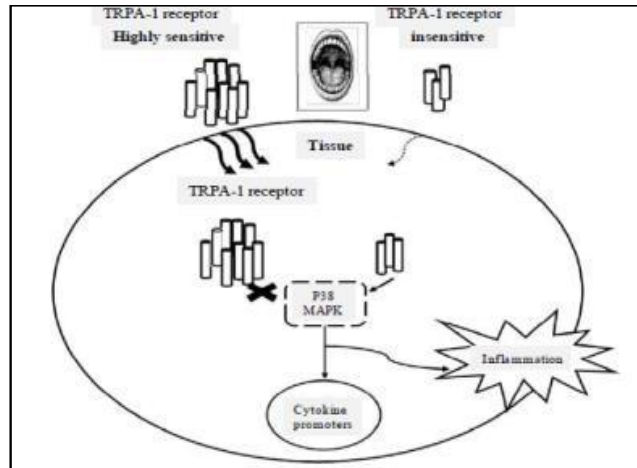


Figura 17. La pungenza dell'olio extra-vergine d'oliva è dovuta all'espressione restrittiva del recettore per l'oleocantale²⁰⁶.

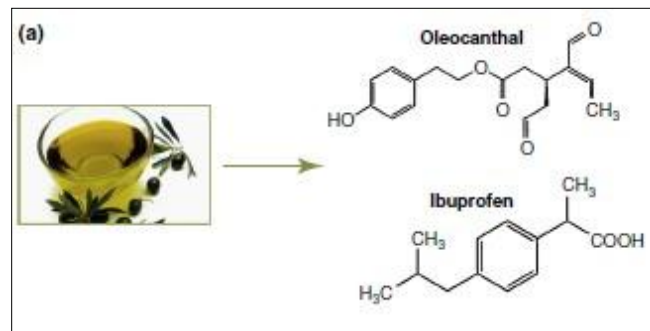


Figura 18. Oleocantale, composto naturale e piccante dell'olio d'oliva²⁰³.

Per questo motivo, negli ultimi anni l'oleocantale è diventato oggetto di interesse scientifico, focalizzando l'attenzione sui possibili meccanismi in cui esso può agire. Esistono due possibili pathways su cui l'oleocantale può operare: il pathway dell'acido arachidonico e il pathway del NFκB.

- 1) L'acido arachidonico è un acido grasso rilasciato dallo strato fosfolipidico delle membrane cellulari dalla *Fosfolipasi A2* (PLA2). L'enzima COX sintetizza le *Prostaglandine H2* (PGH2) in due steps attraverso due siti attivi separati, un sito

di ciclossigenasi ed un sito di perossidasi. L'acido arachidonico è il primo ad essere ossidato a *idroperossido* (PGG₂) dalla COX, il quale è ridotto dalla *perossidasi ad alcol* (PGH₂)²⁰⁷⁻²¹⁰. Le prostaglandine H₂ sono i precursori di un gran numero di *prostanoidi* inclusi PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2α} e *trombossani* (*Trombossano A₂*, TXA₂). Prostaglandine e trombossani sono prodotte da stimoli nocivi e funzionano in maniera paracrina ed autocrina²¹¹. Fino al 1990 si pensava esistesse un solo enzima COX, ma studi effettuati in questo campo hanno permesso di affermare che esistono due isoenzimi: la COX1 espressa in molti tessuti e fondamentale per numerosi meccanismi fisiologici come la regolazione della produzione di muco e di acido cloridrico a livello gastrico, e la COX2 maggiormente espressa nelle cellule infiammatorie e indotta principalmente dagli stimoli infiammatori come le citochine (TNF- α , IL-1 e IL-6 o come le endotossine batteriche^{212,213}. Beauchamp et al.²⁰³ dimostrarono che l'oleocantale imita l'attività anti-infiammatoria dell'ibuprofene inibendo in maniera dose-dipendente gli enzimi infiammatori COX1 e COX2. Inoltre questa inibizione era significativamente maggiore rispetto a concentrazioni equimolari di ibuprofene²⁰³. Per esempio, 25 mM di oleocantale inibiva il 41-57% dell'attività della COX rispetto ai 25 mM di ibuprofene il quale inibiva solo il 13-18% dell'attività della COX in vitro. Oleocantale costituisce approssimativamente il 10% della componente fenolica totale dell'EVO, ma questa quantità appare sufficiente a contribuire alla modifica delle funzioni fisiologiche del corpo riducendo il rischio di patologie infiammatorie²¹³. Corona et al.²¹⁴ suggerirono che un meccanismo con il quale la porzione fenolica dell'EVO inibisce la COX è l'inibizione della fosforilazione di p38/CREB. L'oleocantale da solo incrementa la fosforilazione di p38 in colture umane di condrociti²¹⁵, che a sua volta riduce l'espressione di p38 (**Figura 19**).

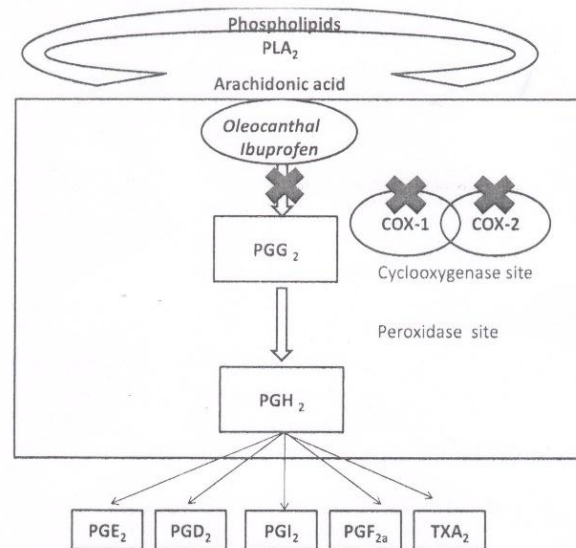


Figura 19: Pathway dell'acido arachidonico nell'infiammazione²¹⁶.

- 2) Un altro meccanismo attraverso il quale l'oleocantale agisce è attraverso l'inibizione del NFκB il quale controlla l'espressione di oltre 200 geni che codificano per molti mediatori dell'infiammazione. Nelle cellule a riposo NFκB è mantenuto nel citoplasma ed è associato a proteine inibitorie come IκB (IκBα, IκBβ e IκBε); in risposta a stimoli tossici come LPS (*Lipopolisaccaride*) NFκB è degradato oppure fosforilato in modo tale da poter traslocare nel nucleo e legarsi a specifici promotori. Inoltre citochine pro-infiammatorie come TNF-α sono capaci di indurre IκB e successivamente di attivare NFκB. La fosforilazione di IκB è mediata da IKK che è costituita da tre subunità di chinasi (IKKα, IKKβ, IKKγ) cosicché l'inibizione di IKK potrebbe sopprimere la capacità di NFκB (**Figura 20**) di indurre la trascrizione di geni pro-infiammatori²¹⁷⁻²¹⁹.

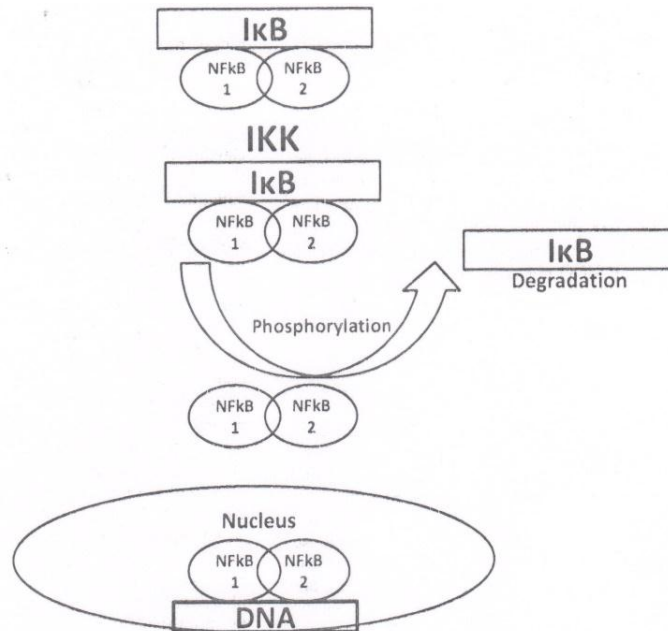


Figura 20. Attivazione di NFκB attraverso la fosforilazione di IκB²¹⁶.

Un'ulteriore prova dell'attività anti-infiammatoria dell'oleocantale si è osservata in particolari linee cellulari, i condrociti murini ATDC5 e i macrofagi J774, in uno studio effettuato da Scotece et al.²²⁰ nel 2012. Gli studiosi osservarono che l'oleocantale non solo inibiva la produzione di NO LPS-indotta tramite la downregulation di iNOS nei macrofagi, senza compromettere la vitalità cellulare, ma inibiva anche l'espressione dell'mRNA dei mediatori infiammatori MIP-1α e IL-6, così come la loro sintesi proteica in entrambi i tipi cellulari. Si è pure osservata una riduzione delle citochine pro-infiammatorie come IL-1β e TNF-α. Questi mediatori infiammatori hanno notevoli ruoli in malattie articolari infiammatorie-degenerative come l'osteoartrite e l'artrite reumatoide, pertanto questi dati suggeriscono come l'oleocantale potrebbe essere un agente terapeutico per il trattamento di malattie degenerative delle articolazioni.

Diversi recenti studi hanno dimostrato che il consumo di EVO riduce il rischio di vari tipi di cancro, tra cui della prostata, del polmone, della laringe, dell'ovaio, della

mammella e tumori del colon^{221,222}. Un altro interessante studio fatto da Margarucci et al. ha rivelato importanti effetti dell'oleocantale sulla *Proteina Heat Shock* (HSP-90), una cheperone con un ruolo chiave in diverse malattie umane, in particolare cancro e neurodegenerazione. Si è osservato un potente effetto inibitore sulla HSP-90 in cellule U937 monocitiche di linfoma umano²²³.

L'oleocantale è stato recentemente collegato alla riduzione del rischio di *malattia di Alzheimer* (*Alzheimer disease*, AD), una malattia neurodegenerativa che è caratterizzata dall'accumulo nel cervello della proteina β -amiloide. In particolare, l'oleocantale riduce la fibrillizzazione della proteina tau, che è una proteina associata ai microtubuli e che promuove il loro assemblaggio. La mancanza di questa stabilizzazione è associata allo sviluppo di grovigli neurofibrillari caratteristici dell'Alzheimer. LI, W et al.²²⁴ hanno dimostrato che l'oleocantale altera la fibrillazione della proteina tau attraverso interazioni covalenti con la lisina dell'amino gruppo del frammento K81 della tau in maniera aspecifica. Inoltre effettua anche interazioni covalenti non specifiche con tau-441 che induce un cambiamento conformazionale che potrebbe spiegare la capacità anti-fibrillogena dell'oleocantale.

Sebbene l'oleocantale abbia dimostrato così tanti effetti benefici contro vari meccanismi patogenici, come tutti i fenoli è soggetto a degradazione quando a contatto col calore. Sono stati effettuati degli studi proprio per osservare la possibile degradazione della componente anti-infiammatoria dell'EVO durante la cottura, ed è stato visto che l'oleocantale risulta stabile quando esposto a temperature superiori ai 240° per più di 90 minuti²²⁵, riportando un minimo aumento di degradazione (16%), in contrasto a quanto accade agli altri fenoli. Gli studi riportati suggeriscono chiari effetti benefici di questo composto nei processi patogenici come lo stress ossidativo, l'infiammazione, le malattie neurodegenerative e cardiovascolari e indicano un possibile ruolo, per l'oleocantale, di agente terapeutico per il trattamento futuro di alcune malattie. Tuttavia la maggior parte di questi studi sono stati effettuati solo in

sistemi in vitro e, quindi è difficile estrapolare queste conclusioni in interi organismi. Così, ulteriori ricerche sia in vitro che in vivo devono essere effettuate. Un primo passo importante sarebbe quello di delineare i meccanismi di azione dei farmaci di oleocantale e per determinare se quest'ultimo media i suoi effetti su recettori cellulari di superficie o su bersagli intracellulari. Inoltre, sono necessarie maggiori informazioni relative alla farmacocinetica e farmacodinamica dell'oleocantale. Allo stato attuale, non sono disponibili molti dati da studi clinici e sarà, pertanto, necessario effettuare studi clinici completi sia sul potenziale di prevenzione sia sull'efficacia curativa del composto in diversi stati di malattia, prima che queste indicazioni terapeutiche possano essere convalidate. In ogni caso, si deve usare cautela per evitare aspettative non veritiere di successo nell'uso di questo composto come agente farmacologico. Una migliore comprensione della farmacologia dell'oleocantale fornirà anche un solido fondamento logico per l'introduzione di alimenti funzionali, come l'EVO, per migliorare le strategie alimentari che saranno di aiuto nella pratica clinica²¹⁶.

3.2.2 *Opuntia ficus-indica*

***Opuntia ficus-indica*: caratteristiche e composizione**

Opuntia ficus-indica (OFI), comunemente chiamato fico d'India o cactus nopal (**Figura 21**), appartiene alla famiglia delle cactacee dicotiledoni angiosperme, una famiglia che comprende circa 1500 specie di cactus. OFI è una pianta tropicale e subtropicale, può crescere in climi aridi e semi-aridi, con una distribuzione geografica che comprende Messico, America Latina, Sud Africa e paesi del Mediterraneo; è caratterizzata da un elevato contenuto di polifenoli che presentano proprietà antiossidanti e antinfiammatorie²²⁶. È interessante notare la presenza di alcaloidi, indicaxantina, neobetanine e vari flavonoidi che sono stati isolati dal cactus²²⁷.

Il frutto del cactus contiene notevoli quantità di acido ascorbico, vitamina E, fibre, carotenoidi, aminoacidi e composti antiossidanti ed è una preziosa fonte di sostanze

nutritive, presenta attività antiossidante, antitumorale, neuroprotettivo, epatoprotettiva, antiproliferativo²²⁸⁻²³².

I cladodi del cactus contengono vitamine, antiossidanti e vari flavonoidi, in particolare etere quercetina 3-metile, uno scavenger radicalico altamente efficiente²³⁰. Gli estratti dei cladodi di OFI possono abbassare il livello di colesterolo, presentano proprietà anti-infiammatorie, e l'acqua estratta migliora notevolmente la guarigione delle ferite²³³.



*Figura 21. Opuntia ficus-indica*²³⁴.

Tutte le parti della pianta sono ricche di membri della famiglia dei polifenoli come ad esempio flavonoidi e acidi fenolici. Nel fiore, i principali composti sono rappresentati da acido gallico e 6-isoramnetina 3-O-robinobioside, pari a 4900 e 4269 mg/100 g di sostanza secca, rispettivamente²³⁵. Altre molecole fenoliche sono presenti in quantità non superiore a 10 mg/g. Nella polpa, il contenuto totale fenolico è di 218,8 mg/100 g²³⁶, con un alto contenuto del glicoside isoramnetina (50,6 mg / 100 g) rispetto ad altri flavonoidi²³⁷. I semi del frutto contengono elevate quantità di composti fenolici da 48 a 89 mg / 100 g compreso i derivati feruloil, tannini e sinapoil diglucoside²³⁸. È interessante notare che le scorze di frutta hanno un alto contenuto di fenoli (45,7 g /

100 g). Molti di questi fenoli sono molecole bioattive, derivati dai flavonoidi quali camferolo e quercetina, il cui contenuto è 0,22 e 4,32 mg / 100 g, rispettivamente²³⁹.

Gli effetti benefici dei polifenoli di OFI sulla salute potrebbero essere derivanti dalle loro proprietà antiossidanti di scavenger radicalici. Per esempio, l'acido gallico, in gran parte si trova nei fiori del cactus, mostra un'elevata attività antiossidante responsabile per la sua capacità di ridurre il danno al DNA²⁴⁰ e per tamponare i radicali liberi²⁴¹.

I cladodi di OFI sono ricchi di nicotiflorina che, attraverso meccanismi antinfiammatori e neuroprotettivi, ha dimostrato di ridurre i danni dell'infarto cerebrale, di attenuare i deficit neurologici indotti da ischemia e di up-regolare l'ossido nitrico sintasi endoteliale nella coltura di cellule dell'endotelio vascolare di cervello di ratto²⁴². La nicotiflorina, a concentrazioni nanomolari, ha un effetto neuroprotettivo contro l'ipossia o lo stress ossidativo²⁴³.

L'analisi cromatografica dei lipidi totali estratti da cladodi Cactus²⁴⁴ indica che l'acido palmitico (C16:0), acido oleico (C18:1), l'acido linoleico (C18:2), acido linolenico (C18:3) contribuisce al 13.87%, 11.16%, 34.87% e 32.83% del contenuto totale di acidi grassi. Questi quattro acidi grassi rappresentano quindi oltre il 90% degli acidi grassi totali con acidi linoleico e linolenico, i principali acidi grassi polinsaturi, pari al 67.7%. Il contenuto di acido linoleico in cactus cladodi (34.87%) è quindi vicino alla percentuale (29% al 40.41%) in olio di argan.

Le varie parti di *Opuntia* contengono una buona percentuale di acido linoleico al quale, essendo precursore dell'acido arachidonico, è stato assegnato un potere ipocolesterolemizzante e proprietà inibitorie contro il cancro al colon. Omega-3 (acido linolenico) è conosciuto per gli effetti benefici per la salute, le malattie cardiovascolari, patologie infiammatorie, malattia autoimmune e diabete²⁴⁵.

Sin dai tempi antichi, OFI è stata utilizzata nella medicina popolare tradizionale, e recentemente la popolarità dei cladodi è aumentata anche nei paesi sviluppati, essendo riconosciuto come fonte di sostanze fitochimiche e prebiotiche²⁴⁶.

Il cladodio è un ramo trasformato, spesso di consistenza coriacea, che assume l'aspetto (**Figura 21**) e la funzione di una foglia; è in grado di effettuare la fotosintesi clorofilliana in piante che riducono l'apparato fogliare²⁴⁷. I cladodi, specie nelle prime fasi di crescita, oltre ad avere una elevata quantità di acqua, sono un'ottima fonte di sostanze nutritive in termini sia di fibra (carboidrato) ma anche di vitamine tra cui vitamina C e precursori della vitamina A. I principali elementi presenti in nopal sono calcio, potassio, magnesio, sodio, e piccole quantità di ferro e manganese. Questi elementi sono presenti come carbonati, cloruri, solfati, ossalati e fosfati nei cladodi dove la loro composizione varia a seconda della stagione, luogo di coltivazione, tipo di terreno, e l'età della pianta²⁴⁸.

Diversi studi hanno evidenziato la presenza di composti naturali aventi l'effetto antinfiammatorio, antiossidante, ipoglicemico, antimicrobico e attività neuroprotettiva²⁴⁹. Il potenziale terapeutico degli estratti del cladodio è stato dimostrato in vitro o in vivo. Un certo numero di malattie sono stati trattati, tra cui DMT2, obesità, reumatismi, ischemia cerebrale, malattie renali, tumori, infezioni virali e batteriche²⁵⁰. Inoltre è stata mostrata l'attività prebiotica di oligosaccaridi derivati dai cladodi. La fermentazione dell'acido lattico esercita anche un effetto conservante sui livelli di vitamina C e carotenoidi; la fermentazione lattica, potrebbe essere una strategia utile e innovativa per sfruttare le caratteristiche intrinseche dei cladodi di OFI. Due derivati flavonoidi (camferolo e isoramnetina) sono stati identificati negli estratti, e sono stati considerati i principali composti che presentano un'elevata attività di scavenger radicalico e di immuno-modulazione. I flavonoidi agiscono a più livelli, attraverso l'inibizione delle vie di IL-8 e TFN α , diminuendo la produzione di radicali liberi, sopprimendo l'attività di COX-2 e inibendo la sintesi di *Prostaglandin E2* (PGE2).

Nella prospettiva di produrre un alimento funzionale, integratore alimentare o farmaceutico, l'estratto del cladodio fermentato può fungere come adiuvante antinfiammatorio per ripristinare omeostasi in condizioni di stress cellulare²⁵¹.

L'alta concentrazione di composti funzionali e le caratteristiche intrinseche di OFI permettono di considerare tale pianta, ed in particolare il cladodio come componente adatto alla preparazione di composti utili alla promozione della salute²⁴⁶.



Figura 21. Cladodio (foto originale).

Grazie alle proprietà antiossidanti di scavenger radicalico, la betalaina potrebbe essere usata per le malattie degenerative che colpiscono la funzione endoteliale come l'aterosclerosi, l'aterotrombosi, ictus²⁴⁹.

In un modello murino di infiammazione acuta (pleurite), la somministrazione orale di indicaxantina riduce la dimensione di essudato e il reclutamento di leucociti in cavità pleurica e l'espressione di m-RNA di PGE-2, NO, IL-1B, i-NOS e COX-2 nei leucociti reclutati²⁵².

Nopal è una pianta di cactus che è ampiamente consumata nella dieta messicana. Ha un basso indice glicemico ed è considerato un alimento funzionale a causa del suo alto contenuto di fibra alimentare e concentrazione di polifenoli e la sua attività antiossidante. La fibra alimentare è classificata come fibra dietetica totale, insolubile e solubile; può essere presente in un pasto normale (diete con alto contenuto di fibre)

o come ingrediente aggiunto ai prodotti alimentari generati in precedenza da diversi processi (enzimatica, fisici o chimici) da una grande varietà di materie prime²⁵³. Inoltre, la fibra alimentare è uno dei componenti alimentari autorizzati negli alimenti funzionali in tutto il mondo in quanto contribuisce alla salute delle arterie coronarie e colon.

Ruolo di OFI sull'attività cardiovascolare.

Opuntia può avere molteplici effetti sul metabolismo, nella regolazione del glucosio, lipidi, colesterolo totale, lipoproteine ad alta densità, e lipoproteine a bassa densità²⁵⁴. Tuttavia, ci sono pochi studi sulla specie più comune, OFI, ma il meccanismo d'azione dell'effetto ipocolesterolemizzante non è chiaro. L'azione dei fenoli sembra avere un significato cruciale in quanto composti che inibiscono l'enzima lipasi pancreatica²⁵⁵ che catalizza l'idrolisi dei trigliceridi.

Inibendo la funzione di questo enzima, si riduce il livello di colesterolo²⁵⁶. La lipasi pancreatica è un enzima chiave nell'assorbimento dei trigliceridi della dieta, determinando l'idrolisi dei trigliceridi in 2-monoacilglicerolo e acidi grassi. È noto che i grassi alimentari non sono direttamente assorbiti dall'intestino se non sono stati sottoposti all'azione della lipasi pancreatica²⁵⁷. Alcuni componenti naturali come proteine e saponine inibiscono le lipasi gastrointestinali, impedendo l'idrolisi dei grassi alimentari, riducendo il successivo assorbimento intestinale di prodotti di lipolisi²⁵⁸. Questo potrebbe spiegare perché OFI diminuisce i livelli di colesterolo nei topi che sono stati indotti all'ipercolesterolemia impedendo così l'idrolisi dei grassi alimentari e riducendo il loro successivo assorbimento intestinale.

Ruolo di OFI sul metabolismo epatico

L'accumulo di lipidi a livello epatico è il risultato di uno squilibrio tra l'acquisizione dei lipidi (derivati da acidi grassi nel tessuto adiposo e quelli prodotti de novo tramite lipogenesi) e lo smaltimento dei lipidi (ossidazione dei lipidi e Trigliceridi,

secrezione di lipoproteine)²⁵⁹. Molte evidenze indicano che l'accumulo di *Trigliceridi* (TG) nel fegato è un fattore causale correlato con l'insulino-resistenza e con le basse concentrazioni di adiponectina, una citochina anti-infiammatoria²⁶⁰. Nella steatosi epatica, l'accumulo di lipidi nel fegato e la presenza di ROS promuovono la perossidazione lipidica, il rilascio di citochine infiammatorie, l'attivazione delle cellule stellate epatiche, e la funzione mitocondriale alterata. Recentemente è stato dimostrato che una dieta a base di nopal riduce i livelli sierici di TG, proteina C-reattiva, l'intolleranza al glucosio e aumenta le concentrazioni sieriche adiponectina in soggetti con sindrome metabolica²⁶¹.

Ruolo di OFI sul metabolismo delle lipoproteine aterogene:

Sono stati condotti studi sulla capacità delle polveri di *Opuntia* di inibire l'ossidazione delle LDL generata nelle *cellule endoteliali aortiche murine* (CRL2181). Questo sistema in vitro mima gli eventi iniziali che si verificano nella parete vascolare cioè l'ossidazione delle LDL nell'intima vascolare (endoteliale), assorbimento di LDL ossidate tramite il sistema scavenger recettoriale, accumulo di lipidi nel citosol, e la formazione di cellule schiumose. La presenza di OFI è in grado di inibire l'ossidazione delle LDL indotta dai macrofagi e tale attività potrebbe essere dovuta all'effetto della quercetina, un flavonoide con elevata attività antiossidante²⁶².

3.3 APPROCCIO CHIRURGICO

La chirurgia bariatrica si occupa del trattamento chirurgico dei pazienti affetti da obesità; offre una notevole riduzione del rischio di mortalità e del rischio di sviluppare nuove comorbidità. La chirurgia bariatrica è l'unico trattamento in grado di determinare una perdita di peso significativa nel lungo termine, ma rappresenta ad oggi uno strumento di supporto alla necessità e alla determinazione della persona obesa di perdere peso e di riuscire a mantenerlo nel lungo periodo.

La chirurgia bariatrica ha un rapporto costi/benefici molto vantaggioso e spesso consente un notevole risparmio sui costi socio-sanitari rispetto all'approccio conservativo.

La chirurgia bariatrica non è indicata per tutti i pazienti obesi e soprattutto non può essere richiesta per motivi puramente estetici (immagine negativa del proprio corpo). Il suo principale scopo è quello di prevenire e/o correggere i problemi medici associati all'obesità. Tra i requisiti principali richiesti per sottoporsi a un intervento di chirurgia bariatrica vi sono i seguenti: oltre che per motivi puramente estetici, bisogna avere un BMI maggiore o uguale a 40 kg/m² o un BMI compreso tra 35 e 39,9 kg/m² se associato a una o più malattie o complicanze correlate all'obesità (diabete mellito di tipo 2 (HbA1C <8%), malattie cardiache, ipertensione arteriosa, dislipidemia, problemi alle giunture, apnee notturne, ecc). Il paziente dovrà ovviamente astenersi dal consumo di alcolici, droghe e fumo a partire da almeno 6 settimane prima dell'intervento di chirurgia bariatrica.

I principali interventi chirurgici attualmente in uso in Italia sono di tre tipi e la loro efficacia è andata progressivamente consolidandosi in questi ultimi decenni, supportata da ampie casistiche e da periodi di osservazione post-intervento sufficientemente lunghi. La chirurgia gastrorestrittiva riduce la quantità di cibo che si può assumere in un solo pasto, in modo da percepire più precocemente il senso di sazietà e più a lungo. Si basa sulla separazione di una piccola parte alta dello stomaco con il posizionamento di un anello gonfiabile per formare una tasca gastrica che si svuota nell'area rimanente dello stomaco attraverso un orifizio stretto e non dilatabile (bendaggio gastrico regolabile, gastroplastica verticale e sleeve gastrectomy). Gli interventi di chirurgia mista svolgono un'azione prevalentemente funzionale; abbinano la componente gastrorestrittiva a quella di ridotto assorbimento del cibo. Comprendono il bypass gastrico e le sue varianti. L'intervento prevede la creazione di una piccola tasca gastrica che non comunica con il resto dello stomaco (a differenza del bendaggio gastrico regolabile), ma viene direttamente collegata all'intestino tenue

a distanza variabile dal duodeno. Il bypass determina un calo di peso corporeo riducendo di molto la quantità di cibo introdotta e inducendo un precoce senso di sazietà. Gli interventi di tipo malassorbitivo riducono drasticamente l'assorbimento del cibo e dell'energia. Le procedure chirurgiche malassorbitive comportano una riduzione irreversibile delle dimensioni dello stomaco e un marcato cambiamento del processo digestivo. Lo stomaco viene collegato alla parte terminale dell'intestino tenue; in questo modo il cibo percorre soltanto una piccola parte del tratto gastrointestinale, con conseguente notevole riduzione dell'assorbimento delle sostanze nutritive e induzione di un precoce senso di sazietà (diversione biliopancreatica).

Nei casi di diabete ed obesità (*Diabesity*)²⁶³, la chirurgia bariatrica diventa uno strumento importante nella terapia a lungo termine dei pazienti diabetici gravi^{264,265}. Numerosi studi hanno mostrato che la chirurgia bariatrica determina un buon compenso glicemico nella maggior parte dei pazienti operati²⁶⁶. Le metodiche utilizzate con maggiore frequenza sono il bypass gastrico, la diversione biliopancreatica con switch duodenale, la sleeve gastrectomy. Queste tecniche determinano i loro effetti metabolici attraverso una combinazione di: restrizione del volume dello stomaco, bypass intestinale e modificazioni ormonali. I benefici della chirurgia bariatrica includono anche un miglioramento dei fattori di rischio cardiovascolare come dislipidemia e ipertensione^{267,268}.

4. SCOPO DELLO STUDIO

Nuove conoscenze, relative al ruolo della MetS e dei suoi componenti quali il diabete, hanno modificato profondamente i nostri concetti sulla prevenzione ed il trattamento terapeutico per cui dalla nozione di rischio cardiovascolare globale si è passati al concetto moderno di *rischio cardiometabolico globale*, nel senso che siamo impegnati oggi a prevenire la mortalità dovuta alle malattie cardiometaboliche.

Nel passato l'attenzione clinica si rivolgeva alla correzione dei singoli elementi quali l'ipertensione, la dislipidemia, il diabete e il fumo di sigaretta. L'allargamento delle conoscenze ha permesso di evidenziare nuovi elementi di rischio quali l'obesità addominale, lo stato proinfiammatorio e protrombotico cronico, la disfunzione endoteliale, lo stress ossidativo. Il concetto di MetS avvalorava la necessità di individuare, in ogni soggetto, non più il singolo fattore di rischio ma la molteplicità dei determinanti che possono condurre allo sviluppo della patologia e l'approccio terapeutico personalizzato adatto al management globale del suo rischio. L'approccio terapeutico che deriva da questa visione dell'individuo esula pertanto dalla correzione del singolo fattore di rischio presente, ma si pone l'obiettivo di affrontare i problemi del soggetto nella loro globalità.

Lo scopo del progetto di dottorato è stato quello di individuare nuovi approcci farmacologici, nutraceutici e interventistici idonei al management clinico, diagnostico e terapeutico dei pazienti ad elevato rischio cardio-metabolico.

5. STUDI CLINICI

5.1 EFFETTI DI EXENATIDE LAR IN PAZIENTI CON DIABETE MELLITO TIPO 2

5.1.1 MATERIALI E METODI

Pazienti inclusi nello studio

In questo studio è stata valutata una coorte di 60 pazienti (41 uomini e 19 donne, con età media di 60 ± 10 anni) con DMT2 afferenti presso l'Ambulatorio di Diabetologia e Prevenzione Cardiovascolare (Resp. Prof. M. Rizzo) dell'U.O.C. di Medicina Interna (Dir. Prof. G. Montalto) del Policlinico di Palermo. La coorte di pazienti è stata suddivisa in quelli con steatosi (con $FLI \geq 60$, $n = 18$) e quelli senza steatosi (con $FLI < 60$, $n = 42$), valutata utilizzando un indice chiamato "*Fatty Liver Index*" (FLI) frutto del calcolo di alcuni parametri comunemente valutati nei pazienti diabetici come l'indice di massa corporea, la circonferenza addominale, i trigliceridi, e la gammaGT che da contezza della salute del fegato²⁶⁹. Sui 60 pazienti arruolati allo studio è stato valutato l'effetto di Exenatide LAR sui diversi parametri cardio-metabolici. Durante la fase di reclutamento, ogni singolo paziente ha visionato e firmato il consenso informato per partecipare allo studio clinico, approvato dal Comitato Etico del Policlinico Universitario di Palermo. Questo studio è stato registrato in clinicaltrials.com (NCT02380521). Ciascun paziente è stato sottoposto a visita medica, raccogliendo dati anamnestici, clinici e biochimici relativi ad ogni singolo paziente. Sono stati registrati il peso, la circonferenza vita, l'altezza ed è stato calcolato l'indice di massa corporea (BMI) in Kg/m^2 . Le procedure utilizzate sono in accordo con la Dichiarazione di Helsinki del 1975, modificata nel 1983, e sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Palermo.

Tutti i soggetti coinvolti nel seguente studio erano naïve alla terapia basata sulle incretine ed erano trattati solo con metformina da almeno 8 settimane ad un dosaggio compreso tra 1500 e 3000 mg al giorno.

Tabella 2. *Principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio (n=60).*

Età (anni)	60±10
Donne, n (%)	19 (32)
Durata Diabete (anni)	9±8
Fumatori, n (%)	13 (22)
Familiarità per malattie cardiovascolari, n (%)	34 (57)
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	128±12
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	73±8
Ipertensione, n (%)	42 (70)
Obesità, n (%)	31 (53)
Dislipidemia, n (%)	36 (60)
Complicanze diabetiche, n (%)	0 (0)
Uso di farmaci anti-ipertensivi	
beta-bloccanti, n (%)	11 (18)
inibitori enzima di conversione dell'angiotensina, n (%)	17 (28)
antagonisti del recettore dell'angiotensina II, n (%)	19 (32)
calcio antagonisti, n (%)	9 (15)
diuretici, n (%)	15 (25)
Uso di farmaci ipolipemizzanti	
statine, n (%)	25 (42)
fibrati, n (%)	2 (3)
acidi grassi poli-insaturi, n (%)	7 (12)
Uso di antiaggreganti, n (%)	22 (37)

I criteri di inclusione dello studio erano: 1) uomini e donne > 18 anni con DM2; 2) BMI >25 Kg/m²; 3) HbA1c compresa tra 7,5% e 8,5%.

Invece i criteri di esclusione erano: 1) gravidanza o eventuale prospettiva imminente; 2) insufficienza epatica o renale di grado moderato o severo; 3) recente evento cerebro-cardiovascolare maggiore; 4) infezioni (HIV-*Virus dell'Immunodeficienza*

Umana, HBV-Virus dell'Epatite B, HCV-Virus dell'Epatite C) e neoplasie; 5) trigliceridi >400 mg/dl e LDL colesterolo >250 mg/dl.

Nella **Tabella 2** sono elencate le principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio e le terapie farmacologiche assunte che sono rimaste costanti per tutta la durata dello studio clinico.

Exenatide LAR è stato somministrato alla dose di 2 mg a settimana in aggiunta alla metformina da 1500 fino a 3000 mg/die, fino alla fine dello studio; è stato prescritto ai pazienti mediante piano terapeutico AIFA, come da legislazione italiana.

Metodiche di indagine

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ecocolor-doppler dei tronchi sovra-aortici per valutare il cIMT con sonda ecografica lineare B-mode real-time. Con la stessa sonda è stata valutata la funzione endoteliale con la tecnica della FMD dell'arteria brachiale sia al momento del reclutamento che alla fine dello studio.

Inoltre, al momento del reclutamento e dopo 8 mesi, i pazienti sono stati sottoposti a prelievo ematochimico, dopo 14 ore di digiuno notturno, per le analisi di laboratorio. In particolare, sono stati dosati l'HbA1c tramite HPLC (cromatografia liquida ad alta risoluzione); il pattern lipidico (*colesterolo totale-CT*, TG, HDL-C) con metodi enzimatici-colorimetrico standard²⁷⁰⁻²⁷²; mentre le LDL-C attraverso la formula di Friedewald. Tutti i parametri clinici ed antropometrici (inclusi peso e circonferenza vita) sono stati valutati sia all'inizio che alla fine dello studio.

Determinazione ultrasonografica del cIMT

L'indagine strumentale è stata eseguita da un unico operatore (AMP) utilizzando un ecografo Medison SONOACE Pico con una sonda di 7.5-10.0 MHz. L'esame ecografico è stato eseguito in modo standardizzato con angoli fissi di insonazione. I pazienti sono stati esaminati in posizione supina ed ogni porzione arteriosa è stata esaminata per identificare il sito medio-intimale. Ogni scansione della carotide

comune iniziava appena sopra la clavicola mentre il trasduttore veniva spostato lungo la biforcazione della carotide e lungo l'arteria carotide interna. Sono stati identificati e misurati tre segmenti, sia sul piano anteriore che posteriore, su ciascun lato: il distale ad 1 cm dell'arteria carotide comune vicino alla biforcazione, la biforcazione stessa ed in prossimità della carotide interna²⁷³. In ciascun sito di rilevazione è stato determinato il cIMT, inteso come la distanza tra la linea ecogenica che rappresenta l'interfaccia della porzione intimale dell'arteria, e la linea ecogenica rappresentante la giunzione dell'avventizia.

Determinazione ultrasonografica della funzione endoteliale

Prima di procedere con la valutazione della disfunzione endoteliale è stato chiesto ai pazienti di astenersi dall'assunzione di caffè o tè e di astenersi dal fumo; successivamente ogni singolo paziente è stato fatto distendere su un lettino cardiologico in posizione supina e, dopo essere rimasto in una stanza climatizzata per circa 10 minuti, è stata studiata l'arteria brachiale del braccio destro in diverse scansioni longitudinali con la sonda posta sopra la piega del gomito. Una volta ottenuta la scansione longitudinale più assimilabile a un "ponte cinese", il diametro del vaso, definito come la distanza tra il margine superiore dell'eco prodotto dall'interfaccia fra lume e parete anteriore del vaso e il margine superiore dell'eco prodotto dall'interfaccia fra lume e parete posteriore del vaso, è stato misurato quattro volte nel picco massimo del flusso pulsato della curva spettrale dell'ecografo, per calcolarne poi il valore medio. Successivamente si è posto un manicotto di sfigmomanometro a circa 3-5 cm sopra la piega del gomito ed è stato gonfiato rapidamente ad una pressione maggiore di circa 25-30 mmHg rispetto a quella sistolica precedentemente misurata. È stata mantenuta tale pressione per 5 minuti e al termine di questo periodo si è proceduto a una desufflazione rapida del manicotto, comportando il fenomeno dell'iperemia reattiva e misurando il diametro dell'arteria brachiale ad intervalli di circa 20 secondi per 3 minuti, considerando che il valore

massimo di dilatazione si ottiene in media tra i 60 ed i 90 secondi²⁷⁴. Il valore della FMD è stato calcolato come differenza percentuale tra il massimo diametro post-iperemia raggiunto ed il diametro medio basale, utilizzando la formula:

$$FMD_{(\%)} = [(diámetro\ post-iperemia - diámetro\ basale) / diámetro\ basale] \times 100.$$

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS (V.17.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). L'analisi univariata è stata effettuata utilizzando il paired t-test. Le correlazioni lineari sono state valutate tramite il test di Spearman.

5.1.2 RISULTATI

Tabella 3. Effetti di Exenatide LAR sui parametri cardiometabolici in pazienti diabetici con e senza steatosi (n=60).

	Senza Steatosi Prima terapia	Senza Steatosi Dopo terapia	P= (Senza Steatosi, prima vs. dopo terapia)	Con Steatosi Prima terapia	Con Steatosi Dopo terapia	P= (Con Steatosi, prima vs. dopo terapia)	P= (tra gruppi)
Peso (kg)	74±8	72±9	0.1769	95±17	92±17	0.0005	<0.0001
CV (cm)	97±5	96±8	0.8438	114±12	110±12	0.0067	<0.0001
HbA1c (%)	8.1±0.3	7.2±0.9	0.0006	8.0±0.4	6.8±1.1	<0.0001	0.2170
CT (mmol/l)	4.2±0.8	4.2±1.0	0.7719	4.5±0.9	4.2±0.9	<0.0001	0.0321
HDL-C(mmol/l)	1.4±0.2	1.3±0.2	0.4795	1.1±0.3	1.2±0.3	0.0015	0.0172
LDL-C (mmol/l)	2.3±0.7	2.3±0.9	0.6152	2.6±0.9	2.2±0.9	<0.0001	0.0398
FDW (%)	5.6±1.1	6.6±1.6	0.0018	5.8±1.4	6.9±1.7	<0.0001	0.8818

Dopo 8 mesi di exenatide LAR, i pazienti con steatosi hanno avuto un maggiore controllo cardio-metabolico rispetto a quelli senza steatosi (**Tabella 3**). Inoltre, AST (*Aspartato Amino Transferasi*) e ALT (*Alanino Amino Transferasi*) sono migliorati

significativamente solo nei pazienti con steatosi (20 ± 6 vs 24 ± 9 mU/ml, $p=0.0037$ e 26 ± 14 vs 32 ± 16 mU/ml, $p=0.0013$, rispettivamente).

5.1.3 DISCUSSIONE

Esiste una stretta correlazione tra DMT2 e lo sviluppo di complicanze cardiovascolari. La presenza di alterati parametri metabolici, come l'obesità centrale, la dislipidemia, e l'ipertensione incrementano ulteriormente il rischio cardiovascolare in pazienti con DMT2. In questo studio prospettico di 8 mesi, abbiamo visto che Exenatide LAR migliora i diversi fattori di rischio cardiometabolici, incluso il cIMT e la disfunzione endoteliale in pazienti con DMT2 e steatosi. Diversi studi presenti in letteratura, come gli studi DURATION 1-6, hanno messo in evidenza che Exenatide LAR ha effetti positivi sul peso corporeo e sul controllo glicemico²⁷⁵.

Anche il nostro studio ha mostrato come Exenatide LAR possa migliorare i parametri antropometrici; in particolare nei pazienti diabetici con steatosi, il peso corporeo ha visto una riduzione significativa di circa 3 kg (da 95 ± 17 kg all'inizio dello studio, a 92 ± 17 kg dopo 8 mesi; $p=0.0005$); infine, la circonferenza vita ha mostrato dei miglioramenti (da 114 ± 12 cm 110 ± 12 cm; $p<0.0001$). Questi risultati sono in accordo con precedenti studi, in cui veniva mostrato un miglioramento del peso, circonferenza vita e BMI nei pazienti in trattamento con analoghi del GLP-1, in particolare Liraglutide, indipendentemente dal compenso glucidico^{143,155}. Ad esempio, con lo studio LEAD-6, Liraglutide è stata messa a confronto con Exenatide *Bis In Die* (BID) e non sono state osservate differenze significative tra i due trattamenti relativamente al peso corporeo, che risultava essersi ridotto sia con la somministrazione di Liraglutide (-3.24 kg), sia con la somministrazione di Exenatide BID (-2.87 kg)¹⁴⁸. Lo studio DURATION-6 ha confrontato, invece, Exenatide LAR con Liraglutide, mostrando una perdita di peso maggiore nel gruppo di pazienti che assumevano Liraglutide rispetto al gruppo Exenatide (-3.6 kg contro -2.68 kg) al termine delle 26 settimane di studio¹⁴⁹. Un aspetto interessante da prendere in considerazione è che le

estensioni in aperto degli studi clinici hanno mostrato che con la prosecuzione della terapia, la riduzione del peso è continua fino a 3 anni¹⁷² e 7 anni²⁷⁶, facendo intuire che Exenatide non induca tolleranza per quanto riguarda i propri effetti sul peso, nel medio e lungo termine.

Nel presente studio, abbiamo trovato anche una significativa riduzione dei lipidi plasmatici, sia nel gruppo dei diabetici con steatosi che in quelli senza steatosi, coerentemente ai dati già presenti in letteratura, in cui Exenatide settimanale migliora il rapporto apolipoproteina B / apolipoproteina A₁ indipendentemente dal compenso glucidico e dalla perdita di peso¹⁷². Un altro studio di 52 settimane ha mostrato come Exenatide LAR sia stata in grado di aumentare HDL-C e ridurre LDL-C e TG ($p < 0.0001$)²⁷⁷. Tuttavia, il nostro studio, non ha mostrato la significatività statistica per quanto riguarda i trigliceridi in entrambi i gruppi di trattamento, con un indice di Spearman $p = 0.0781$ e $p = 0.4229$, rispettivamente.

Il controllo glicemico raggiunto nel nostro studio si trova in accordo con tutti gli studi DURATION 1-6 e con gli studi fatti verso gli altri analoghi del GLP-1, in particolare gli studi LEAD 1-6²⁷⁸; infatti, i nostri pazienti, all'inizio dello studio, mostravano una glicemia a digiuno pari a 8.8 ± 2.5 mmol/l (in diabetici con steatosi) e pari a 8.8 ± 3.5 mmol/l (in diabetici senza steatosi), ed al termine dello studio a valori pari a 7.4 ± 2.3 ($p < 0.0016$) e 6.9 ± 1.8 ($p < 0.0018$) rispettivamente. Anche per quanto riguarda l'HbA_{1c}, il nostro studio, ha ridotto sensibilmente i valori, portandoli da 8.1 ± 0.3 % all'inizio dello studio, fino a 7.2 ± 0.9 % ($p = 0.0006$) nei pazienti senza steatosi e da 8.0 ± 0.4 % all'inizio dello studio, fino a 6.8 ± 1.1 % ($p < 0.0001$) nei pazienti con steatosi dopo 8 mesi di trattamento.

Con il nostro studio si è voluto valutare anche l'cIMT e la disfunzione endoteliale, due markers precoci dell'aterosclerosi, all'inizio e alla fine dello studio sempre mettendo a confronto le due categorie di diabetici con e senza steatosi; questi risultati si sono mostrati incoraggianti, in quanto al termine dello studio i pazienti mostravano un cIMT di 0.87 ± 0.15 mm rispetto al baseline 0.98 ± 0.14 ; $p = 0.0018$ (in diabetici

senza steatosi) e di 0.87 ± 0.14 mm rispetto al baseline 0.98 ± 0.13 ; $p < 0.0001$ (diabetici con steatosi); stessa cosa per la disfunzione endoteliale che è migliorata significativamente nei due gruppi di circa 1% (da $5.6 \pm 1.1\%$ a $6.6 \pm 1.6\%$, $p < 0.0018$ e da $5.8 \pm 1.1\%$ a $6.6 \pm 1.6\%$, $p < 0.0001$).

Inoltre, la gran parte dei nostri pazienti al momento dell'arruolamento erano sottoposti ad una terapia farmacologica anti-ipertensiva, anti-ipercolesterolemica ed anti-aggregante e questi farmaci avrebbero potuto avere un peso sui diversi parametri misurati. Tuttavia, per ridurre al minimo possibili *bias*, la terapia è rimasta pressoché invariata per tutta la durata dello studio.

I meccanismi attivati dagli analoghi del GLP-1 responsabili del miglioramento della disfunzione endoteliale sono sicuramente svariati e necessitano di maggiori approfondimenti. Un possibile effetto di Exenatide sui markers precoci di rischio aterosclerotico, quali cIMT e disfunzione endoteliale, potrebbe essere correlato al miglioramento della secrezione e della sensibilità insulinica, che porta di conseguenza ad un miglior controllo glicemico e ad una riduzione dello stress ossidativo; infatti uno studio *in vitro* ha mostrato che Exenatide migliora il potenziale antiossidante e riduce lo stress ossidativo nelle colture di cellule monocito/macrofagiche umane²⁷⁹, diminuendo i livelli di ROS e di malondialdeide, attraverso la riduzione dell'espressione di *Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato* (NADPH)-ossidasi, un enzima che partecipa alla formazione di ROS; inoltre è stato visto che Exenatide aumenta l'espressione e l'attività della superossido dismutasi e della glutatione reduttasi, due enzimi antiossidanti²⁷⁹. Un altro studio ha mostrato come Exenatide migliora la funzione diastolica e riduce la rigidità di parete arteriosa in pazienti con DMT2²⁸⁰. Specifici miglioramenti della funzionalità cardiaca associata al GLP-1, includono anche uno studio *in vitro*, in cui viene visto un aumento della concentrazione di cAMP nei miociti cardiaci²⁸¹ e migliora la funzione ventricolare sinistra nell'uomo, nei roditori e nei cani²⁸²⁻²⁸⁴.

Uno studio di particolare interesse riporta che Exenatide, somministrata in modelli suini con danno ischemico e riperfusione, non solo riduce l'infarto, ma previene anche il deterioramento della funzione cardiaca sistolica e diastolica²⁸⁵.

Gli effetti degli analoghi del GLP-1 sul rischio cardiovascolare sono stati visti negli studi LEADER⁴¹, ELIXA³⁹ e SUSTAIN⁴², per gli analoghi Liraglutide, Lixisenatide e Semaglutide, rispettivamente; invece, per Dulaglutide, lo studio REWIND²⁸⁶ è ancora in corso. Per quanto riguarda Exenatide LAR, nello studio Exenatide di riduzione degli eventi cardiovascolari (EXSCEL)⁴⁰, l'outcome primario composto si è verificato in 839 su 7356 pazienti nel gruppo exenatide una volta alla settimana rispetto a 905 su 7396 pazienti nel gruppo placebo (HR= 0.91, IC 95% 0.83-1.00). Pertanto, exenatide una volta alla settimana non era inferiore alla sicurezza ma non superiore all'efficacia (p<0.001 per non inferiorità; p=0.06 per superiorità⁴⁰). Questo è paragonabile a lixisenatide nello studio ELIXA³⁹. EXSCEL aggiunge informazioni sugli agenti ipoglicemizzanti della classe GLP-1 RA ai risultati ELIXA, LEADER e SUSTAIN-6 già pubblicati. Tuttavia, Exenatide LAR ha ridotto la mortalità per tutte le cause del 14%, una riduzione simile a quella osservata per liraglutide sebbene, per ragioni formali, a causa della mancanza di un impatto significativo sull'endpoint primario composto, non possa essere accettata come significativa⁴⁰. Questi studi potrebbero aiutare a comprendere meglio gli effetti di Exenatide LAR sulla funzione endoteliale, sul cIMT e sul rischio cardiovascolare e non si può escludere che i diversi trattamenti con gli analoghi del GLP-1, e più in generale con le terapie incretiniche, possano avere effetti diversi sull'aterosclerosi subclinica e conclamata.

Un punto debole del nostro studio è stato l'assenza di un braccio di controllo che raggruppasse pazienti trattati solo con metformina. Tuttavia, i dati presenti già presenti in letteratura indicano che la metformina non influisca in maniera predominante sul cIMT^{287,278}, ma al massimo può avere efficacia sulla circonferenza vita, peso e BMI²⁸⁷⁻²⁹⁰. Per quanto riguarda la disfunzione endoteliale, invece, dopo 4 settimane di trattamento, la metformina ha migliorato la disfunzione endoteliale nei

modelli di ratto, attraverso il miglioramento della biodisponibilità di NO e la riduzione dello stress ossidativo²⁹¹. A supporto di ciò, un altro studio ha voluto studiare gli effetti della metformina in associazione a basse dosi di Liraglutide sia su colture di cellule endoteliali di vena ombelicale umana, sia su topi sottoposti ad una dieta ad alto contenuto di grassi; i risultati hanno mostrato un effetto sinergico della metformina in associazione a Liraglutide sul miglioramento della disfunzione endoteliale rispetto al singolo trattamento sia con metformina che con Liraglutide²⁹². Pertanto, noi non sappiamo se nel nostro studio, il miglioramento della disfunzione endoteliale sia attribuibile anche al contributo della metformina e se possa esistere una sinergia tra il trattamento con Exenatide LAR in associazione a metformina. Exenatide LAR è associato ad un maggiore controllo cardio-metabolico nei pazienti diabetici con steatosi piuttosto che con quelli senza. Resta da stabilire se questi risultati si tradurranno in un'efficace prevenzione CV nei pazienti diabetici con NAFLD.

I risultati sul cIMT e sulla disfunzione endoteliale sembrano essere indipendenti dal compenso glicometabolico.

5.2 EFFETTI DI OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA AD ELEVATA CONCENTRAZIONE DI *OLEOCANTALE* IN PAZIENTI CON SINDROME METABOLICA

5.2.1 MATERIALI E METODI

Pazienti inclusi nello studio

L'EVOO ad alto contenuto di OC (*Figura 22*) è stato fornito dal Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (Prof. Tiziano Caruso), dell'Università degli Studi di Palermo e utilizzato ai fini di questo studio. Tutti i pazienti sono stati indirizzati alla nostra Unità di Diabete e Prevenzione Cardiovascolare (Resp. Prof. M. Rizzo) per una valutazione clinica e sono stati inclusi nello studio consecutivamente. L'olio

d'oliva è stato somministrato a 23 soggetti con MetS alla dose fissa di 4 cucchiaini grandi al giorno (che corrisponde a 32 g di OC) durante i pasti principali (pranzo e cena) ed i pazienti non dovevano assumere nessun altro tipo di olio. La dose dell'EVOO non è stata modificata durante lo studio. I soggetti sono stati seguiti per 2 mesi e il progetto ha incluso una visita clinica, l'esecuzione di analisi biochimiche e una ecografia addominale. Tutte le terapie concomitanti sono state sempre mantenute costanti durante lo studio e non sono stati cambiati i dosaggi. Le procedure adottate erano in accordo con la Dichiarazione di Helsinki del 1975 riveduta nel 1983 e lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Palermo.

I criteri di inclusione erano soggetti caucasici di età compresa tra 18 e 70 anni, la diagnosi di MetS, come definito dai criteri internazionali²⁹³. I criteri di esclusione includevano l'assenza di steatosi epatica (valutata mediante ecografia addominale), insufficienza renale acuta e cronica, malattie epatiche, malattie acute, infiammatorie croniche o infettive, tumori e consumo di alcol (> 30 g / die per uomini e > 20 g / die per donna).



Figura 22. Olio extra-vergine di oliva arricchito con oleocantale Progetto Di.Me.Sa (foto originale).

Tutti i pazienti hanno dato il consenso informato informato per partecipare allo studio e compilato il questionario alimentare "Epic"²⁹⁴ per valutare le abitudini alimentari e

la frequenza di consumo di alimenti e bevande. Tutti i pazienti avevano probabilmente abitudini alimentari simili, poiché erano nati e vissuti in Sicilia.

Table 4. Principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio (n = 23).

Età (anni)	60±11
Donne, n (%)	8 (35)
Fumatori, n (%)	4 (17)
Familiarità per malattie cardiovascolari, n (%)	15 (65)
Pregressi eventi di malattia cerebro-cardiovascolare, n (%)	0 (0)
Ipertensione, n (%)	14 (61)
Diabete Mellito Tipo 2, n (%)	12 (52)
Dislipidemia, n (%)	15 (65)
Obesità, n (%)	14 (61)
Uso di farmaci anti-ipertensivi	
beta-bloccanti, n (%)	6 (26)
inibitori enzima di conversione dell'angiotensina, n(%)	10 (43)
calcio antagonisti, n (%)	2 (9)
diuretici, n (%)	4 (17)
Uso di farmaci ipolipemizzanti	
statine, n (%)	8 (35)
acidi grassi poli-insaturi, n (%)	4 (17)
ezetimibe, n (%)	2 (9)
Uso di antiaggreganti, n (%)	9 (39)
Use of ipoglicemizzanti	
biguanidi, n (%)	10 (43)
sulfaniluree, n (%)	2 (9)
liraglutide, n (%)	1 (4)

Tutti i pazienti non hanno usato alcun integratore naturale per la dislipidemia.

Durante lo studio i pazienti sono stati invitati a non modificare né le abitudini alimentari né lo stile di vita (sedentario); sono state eseguite telefonate settimanali per accertarsi della compliance dei pazienti allo studio. Le caratteristiche basali dei pazienti sono riportate nella **Tabella 4**. Tutti i farmaci cardio-metabolici concomitanti sono stati mantenuti a dosi fisse durante lo studio.

Metodiche di indagine

Al momento del reclutamento e dopo 2 mesi, i pazienti sono stati sottoposti a prelievo ematochimico, dopo 14 ore di digiuno notturno, per le analisi di laboratorio. In particolare, sono stati dosati l'HbA1c tramite HPLC; la glicemia, la fosfatasi alcalina, la *Gamma Glutamil Trasferasi* (GGT), le transaminasi AST ed ALT ed il pattern lipidico (CT, TG, HDL-C) con metodi enzimatici-colorimetrico standard²⁷⁰⁻²⁷²; mentre le LDL-C attraverso la formula di Friedewald [LDL colesterolo = Colesterolo Totale - HDL colesterolo + (trigliceridi / 5)]. Tutti i parametri clinici ed antropometrici (inclusi peso e circonferenza vita) sono stati valutati sia all'inizio che alla fine dello studio.

Dosaggio delle citochine

I campioni di sangue sono stati raccolti in provette specifiche per la raccolta del siero senza *acido etilendiamminotetraacetico* (EDTA). Il siero è stato separato dal sangue intero mediante centrifugazione a bassa velocità a 2500 rpm per 15' a 4 °C. L'analisi sierologica dei livelli delle principali citokine pro- (IL-6, IL-17A, TNF- α , IL-1B) e anti-infiammatorie (IL-10) è stata condotta usando saggi Luminex, accoppiati a Bio-Plex Manager Software.

Valutazione ecografica del grasso addominale

La distribuzione del grasso addominale è stata valutata con ultrasuoni al mattino, dopo un digiuno di almeno 10 ore, da un singolo operatore (AT), utilizzando un ecografo Philips 5000 HDI in tempo reale con una sonda a frequenza multipla a 2-5 MHz e 12- Sonda lineare multitensione da 5 MHz. Tutti i pazienti avevano una steatosi epatica, come criterio di inclusione per lo studio²⁹⁵. La severità della steatosi è stata valutata come: grado 1 (steatosi lieve), caratterizzata da un aumento di ecogenicità; grado 2 (steatosi moderata), accompagnato da un aumento dell'ecogenicità e dell'attenuazione del fascio posteriore con visualizzazione

leggermente alterata dei vasi intraepatici e del diaframma; grado 3 (grave steatosi), con un marcato aumento di ecogenicità e marcata attenuazione del fascio posteriore con conseguente mancata dimostrazione dei vasi intraepatici, del diaframma e del lobo posteriore destro del fegato²⁹⁶. Tutti i pazienti inclusi nel presente studio avevano steatosi moderata. Lo *Spessore Massimo del Grasso Sottocutaneo* (SFT max) è stato misurato a 5 cm dall'ombelico sulla linea xypho-ombelicale, mentre lo *Spessore Minimo del Grasso Sottocutaneo* (SFT min) è stato misurato dalla regione appena sotto il processo xifoide²⁹⁷. Tali misurazioni sono state prese direttamente dallo schermo utilizzando i calibri elettronici nelle interfacce pelle-grasso (escluso la pelle) e grasso-muscolo, e quindi è stato calcolato lo spessore medio. Le misurazioni dello strato di *Grasso Preperitoneale* (PFT) sono state prese dalla regione in cui è più chiaramente visibile appena sotto il processo xifoideo, tra la faccia interna della linea alba e la superficie del fegato. La misurazione del grasso preperitoneale ai bordi superiore e inferiore del fegato è stata evitata perché lo strato di grasso preperitoneale cambia improvvisamente in queste regioni. Per misurare lo spessore dello strato di grasso viscerale prelevato tra la faccia interna del muscolo addominale e la parete anteriore dell'aorta²⁹⁸ è stata utilizzata una sonda convex (3,5 MHz). A tutti i pazienti è stato chiesto di trattenere il respiro durante l'esame; è stata prestata particolare attenzione a mantenere la sonda appena a contatto con la pelle per impedire la compressione degli strati di grasso.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS (V.17.0 per Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). È stato condotto il test di Wilcoxon non parametrico, mentre l'analisi di correlazione è stata effettuata utilizzando il metodo di correlazione di Spearman, per valutare se i cambiamenti nei fattori di rischio cardio-metabolici erano associati a cambiamenti di altri parametri misurati.

5.2.2 RISULTATI

L'integrazione con EVOO ha portato a una significativa riduzione del peso corporeo, del BMI, della CV e dell'ALT (**Tabella 4**).

Tabella 4. Effetto di EVOO con un'alta concentrazione di OC su parametri antropometrici e di laboratorio.

	<i>Baseline</i>	<i>Dopo 2 mesi</i>	<i>P-value</i>
Peso (kg)	87±17	85±16	0.035
BMI (kg/m ²)	31±4	30±4	0.031
CV (cm)	108±12	105±10	0.037
Glicemia (mmol/l)	5.35±1.11	5.86±1.34	0.055
HbA1c (%)	6.13±0.60	6.05±0.45	0.192
CT(mmol/l)	4.61±0.98	4.60±0.89	0.851
HDL-C (mmol/l)	1.17±0.25	1.16±0.25	0.392
LDL-C (mmol/l)	2.82±0.72	2.72±0.69	0.422
TG (mmol/l)	1.74±0.75	1.71±0.98	0.909
AST (mU/ml)	29.21±26.88	22.32±7.52	0.167
ALT (mU/ml)	38.52±30.56	29.64±20.62	0.029
GGT (U/L)	32.30±17.24	30.50±17.41	0.284

Inoltre, i livelli di tutte le citochine pro-infiammatorie misurate (IL-6, IL-17A, TNF- α , IL-1B) diminuivano significativamente, mentre le concentrazioni della citochina IL-10 anti-infiammatoria aumentavano significativamente (**Tabella 5**).

Tabella 5. Effetto di EVOO con un'alta concentrazione di OC sulle citochine plasmatiche.

	<i>Baseline</i>	<i>Dopo 2 mesi</i>	<i>P-value</i>
IL-6 (pg/ml)	2.9±2.2	2.0±1.9	0.020
IL-17A (pg/ml)	3.2±4.0	1.5±1.3	0.044
TNF- α (pg/ml)	7.3±2.2	6.3±2.1	0.003
IL-1B (pg/ml)	0.8±1.4	0.2±0.3	0.045
IL-10 (pg/ml)	0.4±0.4	0.9±1.3	0.039

Per quanto riguarda la distribuzione del grasso addominale, valutata mediante ecografia (**Tabella 6**), abbiamo riscontrato che il SFT max è aumentato significativamente solo dopo l'integrazione con EVOO.

Tabella 6. Effetto di EVOO con un'alta concentrazione di OC sui parametri degli ultrasuoni addominali.

	<i>Baseline</i>	<i>Dopo 2 mesi</i>	<i>P-value</i>
Spessore del grasso viscerale (mm)	6.42±2.23	6.44±2.22	0.972
Spessore minimo del grasso sottocutaneo (mm)	1.18±0.61	1.34±0.51	0.170
Spessore massimo del grasso sottocutaneo (mm)	1.67±0.74	2.19±0.78	0.003
Spessore pre-peritoneae minimo (mm)	0.56±0.36	0.55±0.23	0.633
Spessore pre-peritoneae massimo (mm)	1.22±0.82	1.11±0.45	0.679
Ratio Spessore del grasso viscerale / Spessore massimo del grasso sottocutaneo	3.98±1.63	3.28±1.49	0.020

Abbiamo anche eseguito analisi di correlazione (dati non mostrati) al fine di valutare le potenziali associazioni tra i cambiamenti in tutti i parametri valutati. Abbiamo trovato un'associazione significativa tra i cambiamenti nel peso corporeo e nel BMI e quelli nel SFT max ($r=0.426$, $p=0.043$; $r=0.490$, $p=0.018$, rispettivamente) e tra i cambiamenti sia del peso corporeo che del BMI e quelli nello spessore minimo del grasso pre-peritoneale (PFT min) ($r=0.561$, $p=0.012$ ed $r=0.525$, $p=0.021$, rispettivamente). Inoltre, abbiamo trovato un'associazione significativa tra i cambiamenti in IL-6 e quelli in SFT max ($r=-0.505$, $p=0.014$) e tra i cambiamenti in IL-1B e quelli in PFT max ($r=0.662$, $p=0.026$).

5.2.3 DISCUSSIONE

È noto che la MD è un modello alimentare caratterizzato dalla presenza di diverse varietà di cereali integrali, frutta e verdura fresca, prodotti di grano (pane, pasta), legumi, patate, fagioli, noci e semi, prodotti lattiero-caseari (come formaggio e yogurt), pesce azzurro e pollame consumati in quantità moderate, basso consumo di

carne rossa, zucchero raffinato e grasso animale. Tuttavia, la principale componente distintiva della MD è l'EVOO, che rappresenta la principale fonte di grassi e polifenoli alimentari²⁹⁹, che sono potenti inibitori delle specie reattive dell'ossigeno e associati a un rischio ridotto di CVD e diversi tipi di cancro^{300,301}. Recenti studi hanno confermato gli effetti benefici dei polifenoli nell'olio d'oliva sui fattori di rischio di malattia cardiaca e danno ossidativo³⁰²⁻³⁰⁴. Inoltre, l'olio d'oliva è stato ampiamente studiato per i suoi effetti favorevoli sulle concentrazioni plasmatiche di LDL-C e colesterolo totale³⁰⁵, nonché sulla pressione sanguigna^{306,307}. Owen et al.¹⁹¹ hanno suggerito che la frazione fenolica antiossidante, insieme ad alti contenuti di squalene e acido oleico, possono conferire all'olio d'oliva le sue proprietà benefiche per la salute. In questo contesto, lo studio Epicor, che studia l'associazione tra consumo di frutta, verdura e olio d'oliva e l'incidenza di CHD, ha dimostrato che il consumo di olio d'oliva nella dieta ha portato a una riduzione del rischio CV tra le donne italiane di mezza età senza diagnosi di ictus, infarto miocardico, diabete o iperlipidemia³⁰⁸. L'EVOO in MD è in grado di contrastare lo stress ossidativo postprandiale attraverso la down-regulation della *Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato Ossidasi* (NOX2)³⁰⁹ e riduce il rischio di diabete tra le persone ad alto rischio CV³¹⁰. Lo studio PREDIMED (*Primary Prevention of Cardiovascular Disease with Mediterranean Diet*), con un totale di 7.447 persone arruolate³¹¹, ha dimostrato che l'aggiunta di EVOO a MD riduce il rischio di incidenza di eventi CV importanti.

Esistono diversi studi che hanno preso in considerazione gli effetti di altri polifenoli derivati da EVOO ma nessuno ha valutato gli effetti clinici di EVOO con un'alta concentrazione del suo composto fenolico OC, come abbiamo fatto nel presente studio. Precedenti studi hanno riportato l'attività OC come potente antiossidante e come agente antinfiammatorio non steroideo²⁰³. Infatti, Beauchamp et al. hanno mostrato che le strutture di OC e il farmaco antinfiammatorio ibuprofene condividono una geometria molecolare simile e, come l'ibuprofene, l'OC esibisce l'attività di

inibizione della COX. Inoltre, il consumo di 9 mg di OC al giorno media l'effetto anti-infiammatorio, che è equivalente a quello mediato da 90 mg di ibuprofene²⁰³.

MetS è una costellazione di disturbi che influiscono negativamente sull'omeostasi metabolica di un individuo, in cui il sovraccarico metabolico induce reazioni di stress, come l'ipertrofia ossidativa, infiammatoria, degli organi e delle cellule, portando a un circolo vizioso, in cui fattori ambientali, genetici e psicosociali interagiscono attraverso reti complesse. MetS è un insieme di disturbi che influiscono negativamente sull'omeostasi metabolica di un individuo, in cui il sovraccarico metabolico induce reazioni di stress, ipertrofia ossidativa, infiammatoria dell'organo e delle cellule. La difficoltà nella gestione di MetS è concomitante alla sua natura multifattoriale, in cui fattori ambientali, genetici e psicosociali interagiscono attraverso intricate reti, anche se l'infiammazione è uno dei fattori chiave alla base della progressione di MetS. Pertanto, è essenziale valutare le strategie antinfiammatorie, in particolare quelle associate alla gestione della dieta, poiché queste "strategie" non sono solo efficaci dal punto di vista dei costi per implementare, ma anche arbitrare e limitare gli effetti collaterali. Nel presente studio, valutiamo l'impatto di EVOO con un'alta percentuale di OC sui parametri metabolici, sulla distribuzione del grasso addominale, nonché sulle citochine pro- e antinfiammatorie, negli adulti con il MetS, una popolazione nota per avere un elevato rischio per CVD³¹².

Il nostro studio è il primo a determinare gli effetti benefici di EVOO con un'alta percentuale di OC in soggetti con MetS. Abbiamo dimostrato che il consumo di EVOO con un OC elevato ha influito positivamente sui parametri antropometrici, poiché ha portato a una riduzione del peso corporeo, del BMI e della circonferenza della vita. Sebbene i pazienti non abbiano cambiato il loro stile di vita o le abitudini alimentari, sono stati sufficienti 2 mesi di intervento dietetico con olio d'oliva per ridurre significativamente tali parametri. L'effetto osservato può essere dovuto ad un aumento dell'ossidazione del grasso post-prandiale, che è stato osservato dopo un

pasto ricco di olio d'oliva³¹³; tuttavia, non possiamo escludere che ciò sia dovuto anche ad un "effetto-prova", poiché i soggetti sono stati attentamente monitorati durante lo studio.

Non abbiamo riscontrato variazioni statisticamente significative dei lipidi e dei parametri glicemici, come la glicemia a digiuno e la HbA1c. Allo stesso modo, in uno studio randomizzato, in singolo cieco e controllato con placebo, di cui 41 adulti in sovrappeso e obesi, la sostituzione dell'olio usato comunemente con EVOO per 3 mesi ha cambiato glicemia e lipidi plasmatici³¹⁴. Tuttavia, non escludiamo che l'assenza di cambiamenti significativi in questi parametri possa essere dovuta al tempo limitato dello studio, mentre in uno studio crossover che includeva 200 volontari sani maschi assegnati casualmente a 3 sequenze di somministrazione giornaliera di 25 ml di 3 diversi oli di oliva (con basso, medio o alto contenuto fenolico), sono stati trovati benefici sui lipidi plasmatici³¹⁵. Al contrario, abbiamo trovato nel presente studio che l'integrazione di EVOO con un'alta concentrazione di OC ha ridotto significativamente l'ALT, ed è noto che le concentrazioni di transaminasi sono associate ai gradi di steatosi epatica, come valutato dagli ultrasuoni³¹⁶; pertanto, anche se non dimostrato direttamente, non possiamo escludere che l'uso di olio d'oliva abbia portato a un miglioramento del grado di steatosi epatica, sebbene il periodo di follow-up sia limitato. Inoltre, l'azione epato-protettiva di EVOO è stata dimostrata negli animali³¹⁷, sebbene l'effetto della OC sulla funzione epatica sia ancora da investigare.

Per quanto riguarda la distribuzione del grasso addominale, abbiamo riscontrato un aumento significativo della SFT max, con una diminuzione del rapporto tra lo spessore dello strato di grasso viscerale e lo spessore massimo del grasso sottocutaneo. Questa scoperta può avere importanti implicazioni cliniche, dal momento che il tessuto adiposo viscerale (VAT) è considerato più metabolicamente attivo del tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) e differiscono anche nella loro capacità di secernere adipochine / citochine, ormoni e molecole immunitarie¹¹⁹. È anche ben

documentato che un eccesso di VAT può essere considerato un buon marker di un profilo di rischio cardiometabolico alterato associato a un aumentato rischio di CVD³¹⁸. L'analisi della correlazione ha rivelato associazioni positive tra i cambiamenti nel peso corporeo e nell'IMC e quelli nell'SFT max, evidenziando gli effetti concomitanti della supplementazione di EVOO con un'alta concentrazione di OC su parametri antropometrici e distribuzione del grasso addominale.

Infine, abbiamo scoperto che i livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-17A, TNF- α e IL-1B) diminuivano significativamente, mentre la citochina anti-infiammatoria (IL-10) aumentava significativamente. Questi dati suggeriscono che il consumo di EVOO ad alto contenuto di OC può avere effetti anti-infiammatori ed è coerente con le naturali proprietà anti-infiammatorie di OC^{215,224,319-321}.

Uno dei meccanismi attraverso cui l'OC può attenuare l'infiammazione inibendo la via NF-KB, che a sua volta molti non solo riducono i livelli di citochine pro-infiammatorie ma attenuano anche la segnalazione di COX-2³²². Tuttavia, ulteriori indagini devono essere portate avanti a questo proposito.

All'analisi di correlazione, abbiamo trovato un'associazione inversa tra i cambiamenti in IL-6 e quelli in SFT max, che evidenzia ulteriormente gli effetti concomitanti della supplementazione di olio di oliva sulle citochine anti-infiammatorie e sulla distribuzione del grasso addominale.

I potenziali limiti del presente studio includono il numero limitato di soggetti inclusi, la mancanza di un gruppo di controllo (placebo) e il periodo di intervento relativamente breve. I punti di forza includono il tipo di olio d'oliva mono-cultivar, la novità dello studio e l'elevato numero di parametri biochimici e degli ultrasuoni valutati. Tutte le misurazioni sono state valutate in modo cieco, il che significa che l'operatore ecografico non ha avuto accesso a scansioni precedenti e tutti i parametri biochimici sono stati valutati in aliquote con codici ciechi.

In conclusione, questo è il primo studio che studia l'effetto dell'integrazione di EVOO con un'alta concentrazione di OC in soggetti con MetS. I nostri risultati suggeriscono

che tale integrazione con olio d'oliva ha molteplici effetti benefici sui parametri antropometrici e biochimici, nonché sulla distribuzione del grasso addominale. Ulteriori studi possono fornire una migliore comprensione dei meccanismi alla base degli effetti dell'OC sull'infiammazione e, di conseguenza, potenziali approcci terapeutici per la prevenzione e / o la riduzione del rischio cardio-metabolico generale in tale popolazione.

5.3 EFFETTI DI PASTA ARRICCHITA CON ESTRATTO DI *OPUNTIA FICUS INDICA* IN PAZIENTI CON SINDROME METABOLICA

5.3.1 MATERIALI E METODI

Pazienti inclusi nello studio

La pasta arricchita con estratto di *Opuntia ficus indica* è stata somministrata per 1 mese a 49 soggetti (36 maschi e 13 femmine, di età: 56 ± 5 anni) con almeno uno dei criteri della sindrome metabolica che sono stati visitati presso la Divisione di Ricerca e Internazionalizzazione (ARNAS- Civico Di Cristina e Benfratelli, Palermo, Italia), in aggiunta alle terapie cardio-metaboliche già in uso, mantenute a dosi stabili durante lo studio (*Tabella 7*). I criteri di esclusione includevano insufficienza renale grave o grave, un grave evento cardiovascolare, infezioni gravi come l'HIV, l'HBV, l'HCV e le patologie oncologiche.

Tabella 7. Principali caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio (n=49).

Età (anni)	56±5
Donne, n (%)	13 (27)
fumatori, n (%)	31 (63)
Ipertensione, n (%)	15 (31)
Dislipidemia n (%)	6 (12)
Obesità, n (%)	6 (12)
Diabete, n (%)	2 (4)

Prima di entrare nello studio, ai partecipanti è stato chiesto di non variare il loro cibo e/o l'attività fisica durante il periodo di studio. Di conseguenza, 49 soggetti hanno concluso lo studio pilota (94%) mentre tre partecipanti hanno abbandonato lo studio prima del completamento per motivi personali.

Il disegno dello studio ha previsto una visita medica con raccolta dei dati anamnestici, clinici e biochimici (sottofrazioni del LDL-C condotte presso l'Ambulatorio di Diabetologia e Prevenzione Cardiovascolare – Resp. Prof. M. Rizzo - dell'Università di Palermo) di tutti i pazienti sia al momento del reclutamento (T0 = tempo zero) che dopo 1 mese di somministrazione di pasta arricchita in OFI. In particolare, sono stati presi in considerazione l'età, il sesso, il consumo giornaliero di sigarette, la familiarità per CVD, comorbidità cardiovascolari, dislipidemie, ipertensione. Per ogni paziente in studio sono stati, inoltre, valutati e registrati i dati antropometrici relativi all'altezza, al peso, alla CV ed al BMI, che è stato calcolato come kg/m^2 .

Dopo una descrizione completa dello studio, è stato ottenuto il consenso informato scritto da tutti i partecipanti. Questo studio è stato registrato in “Di.Me.Sa.” PON02_00667_00451_3361785 ed ha adottato le procedure stabilite dalla dichiarazione di Helsinki del 1975 e approvate dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Palermo.

Metodiche di indagini

Preparazione della pasta

La pasta è stata ottenuta aggiungendo una piccola quantità di grano duro di alta qualità, ad alto contenuto proteico, Pietrafitta, a frumento duro Vertola e 3% di estratto di OFI (30% dei polisaccaridi insolubili con alto potere antiossidante). Il supplemento è stato dato ad una dose fissa di 500 grammi settimanali per 1 mese.

Analisi biochimiche

Ciascun soggetto è stato sottoposto ad un prelievo di sangue intero dopo un digiuno di 12-14-h a tempo zero e dopo 1 mese di terapia. I campioni di sangue intero sono stati raccolti in apposite provette senza l'aggiunta di anticoagulante ed il siero è stato separato per centrifugazione (3000 rpm per 15 min). Sono stati analizzati il pattern lipidico e cardio-metabolico. CT, TG e HDL-C sono stati quantificati mediante i normali metodi enzimatici-colorimetrici²⁷⁰⁻²⁷². LDL-C è stato calcolato usando la formula di Friedewald [LDL colesterolo = Colesterolo Totale – HDL colesterolo + (trigliceridi / 5)]. Il rapporto TG/HDL-C è stato calcolato come una misura indiretta di particelle piccole e dense LDL³²³.

Analisi delle sottofrazioni LDL

Le sottofrazioni delle lipoproteine LDL sono state determinate e dosate con il metodo Lipoprint System © (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA), l'unico strumento diagnostico approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) per fornire misure quantitative del colesterolo lipoproteico (per le frazioni lipoproteiche comprese tra VLDL e HDL)^{3,4}.

Il sistema lipoprint (**Figura 23**) è un dispositivo che utilizza un'elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide (PAGE) al 3% non-denaturante per separare, sulla base delle dimensioni (size), le frazioni e le sottofrazioni delle lipoproteine nei campioni di siero con una concentrazione di colesterolo totale maggiore di 100 mg/dl.

Il sistema lipoprint evidenzia il rischio di malattia cardiovascolare associata alla presenza di LDL piccole e dense, con una potenza superiore all'approccio convenzionale, basato sulla misurazione di CT, LDL-C, HDL-C, TG e apolipoproteina B. Differenti dislipidemie e diverse distribuzioni di lipoproteine possono richiedere approcci terapeutici differenti: una misura accurata di ciascuna sotto frazione delle lipoproteine permette di utilizzare la migliore terapia, e di monitorare puntualmente l'efficacia nel tempo.



Figura 23. Lipoprint™ Quantimetrix®: 1. Computer Mac (incluso Programma Lipoware Analysis); 2. Stampante a colori; 3. Scanner digitale (raggi UV, densitometro); 4. Camera elettroforetica; 5. Alimentatore (120V/220V); 6. Rack preparazione tubi; 7. Luce di preparazione (fotopolimerizzatore)³²⁴.

In particolare, tale sistema, consente di separare le LDL in un massimo di sette sottofrazioni LDL, denominate LDL-1 costituite da particelle più grandi, fino a LDL-7 costituite da particelle più piccole.

Inizialmente, i campioni di sangue intero sono stati raccolti in apposite provette (sistema vacuette) senza l'aggiunta di anticoagulante ed il siero è stato separato per centrifugazione (3000 rpm per 15 min), entro 30 minuti dal prelievo. Il siero è stato campionato in appositi tubi Eppendorf da 1,5 ml e conservato a - 80 ° C fino al momento dell'analisi, distinguendo per ciascun soggetto i campioni a tempo 0 e a 1 mese di terapia. Per ogni paziente vengono caricati 25 ul di campione con 300 ul di colorante lipofilo. Durante la fase di polimerizzazione, il colorante lipofilo si è legato in proporzione alla quantità relativa di colesterolo in ciascuna lipoproteina. Le lipoproteine premarcate sono state successivamente sottoposte ad elettroforesi verticale per 60 minuti a 36 mA (3 mA per ogni tubo presente) in una camera elettroforetica.

Durante la prima parte del processo elettroforetico, le particelle lipoproteiche sono state concentrate in una banda stretta e netta. Man mano che le particelle lipoproteiche migravano attraverso la matrice di gel di separazione, sono state risolte in bande in base alle dimensioni delle particelle che le compongono, dalle più grandi alle più piccole, in virtù dell'azione di filtrazione del gel: le HDL migravano più lontano, seguite dalle LDL piccole e dense, dalle LDL più grandi e galleggianti, dalle intermedie (costituite principalmente dalle IDL) e dalle VLDL (**Figura 24**). I chilomicroni, quando presenti, sono apparsi nella porzione superiore del gel.

Un profilo Lipoprint tipico è costituito da 1 banda VLDL, 3 bande intermedie, massimo 7 bande LDL e 1 banda HDL. Al termine dell'elettroforesi, le varie frazioni lipoproteiche marcate (bande) nel campione vengono identificate in base alla loro mobilità (Rf) usando le VLDL come punto di riferimento iniziale (VLDL = 0) e HDL come punto di partenza (HDL = 1).

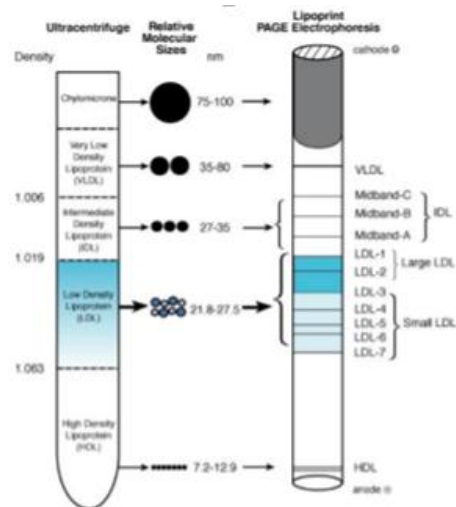


Figura 24. Relazioni tra densità, dimensioni molecolari e mobilità elettroforetica delle differenti lipoproteine³²⁴.

Per la quantificazione delle bande corrispondenti alle varie lipoproteine, è stata eseguita la scansione densitometrica (scan) dei tubi di gel, mediante uno scanner

digitale collegato ad un computer Mac (Apple Computer Inc.) dotato di apposito programma (Lipoware Analysis Program) (**Figura 23**)

Dopo la scansione, sono stati calcolati la mobilità elettroforetica e l'area relativa a ciascuna banda lipoproteica. Moltiplicando tale area per la concentrazione del colesterolo totale del campione, si ottiene la quantità di colesterolo per ciascuna banda in mg/dl. La concentrazione di colesterolo totale è stata preimpostata prima di eseguire gli scan. I risultati sono riportati e stampati come grafici a colori facili da interpretare e corrispondenti al profilo lipoproteico del paziente.

Un profilo lipoproteico normale (Pattern A) solitamente è costituito da bande VLDL; bande intermedie C, B e A (che comprendono IDL); LDL-1 e 2 e HDL (**Figura 25**).

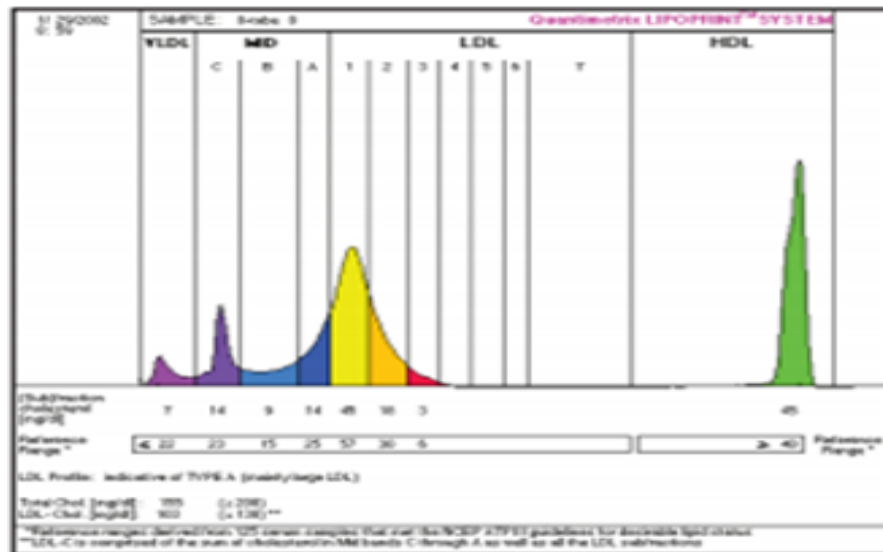


Figura 25. Profilo Lipoprint normale tipico³²⁴.

Un profilo Lipoprint anormale costituito prevalentemente da small dense LDL (sdLDL da LDL-3 a LDL-7) corrisponde al Tipo B ed è legato a un elevato rischio cardiovascolare (**Figura 26**).

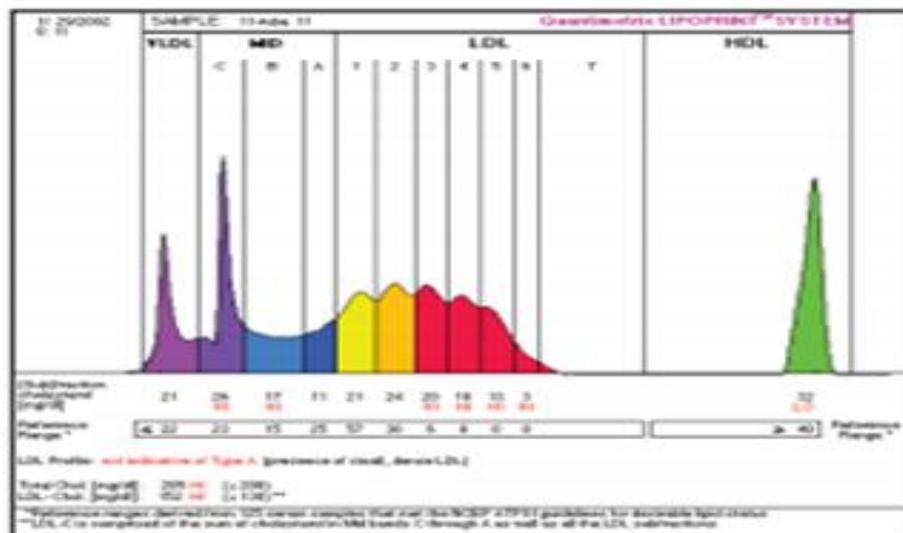


Figura 26. Profili Lipoprint anormale tipico³²⁴.

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate con il software SPSS (V.17.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). Le differenze dei parametri clinici e biochimici, analizzati a tempo zero e dopo 1 mese di somministrazione di pasta arricchita in OFI, sono stati valutati con il paired t-test. Le variabili sono state valutate con i coefficienti di correlazione di Spearman.

5.3.2 RISULTATI

Dopo 1 mese di pasta arricchita OFI è stato riscontrato un aumento significativo di LDL-1 (da 18.4 ± 5.3 a $21.4 \pm 3.9\%$, $p=0.0002$) e una riduzione concomitante di LDL-3 (da 3.1 ± 3.0 a $1.5 \pm 2.1\%$, $p=0.0004$). Inoltre, le sottoclassi LDL-4 e LDL-5 sono diminuite, ma le differenze non hanno raggiunto la significatività statistica (**Tabella 9**). Per quanto riguarda i lipidi plasmatici, TC, LDL-C e HDL-C sono rimasti invariati, mentre il TG è diminuito, sebbene i cambiamenti non fossero statisticamente significativi (**Tabella 8**). Tutti gli altri parametri esaminati (parametri antropometrici e bio-umani) non hanno subito importanti modifiche durante il

trattamento. Nessuna correlazione è stata trovata tra le variazioni di sdLDL e in qualsiasi altro parametro metabolico valutato.

Tabella 8: Effetti della pasta arricchita in *Opuntia* su vari parametri metabolici (n=49).

	<i>Baseline</i>	<i>Dopo 1 mese</i>	<i>P=</i>
<i>Peso (kg)</i>	70±14	70±14	0.4135
<i>CV (cm)</i>	92±12	92±10	0.2049
<i>BMI (kg/m²)</i>	26±4	26±4	0.2667
<i>HbA1c (%)</i>	5.4±0.4	5.4±0.4	0.9329
<i>CT (mmol/l)</i>	5.4±0.9	5.4±0.9	0.8504
<i>TG (mmol/l)</i>	1.2±0.6	1.0±0.6	0.2636
<i>LDL-C (mmol/l)</i>	3.6±0.9	3.6±0.9	0.9975
<i>HDL-C (mmol/l)</i>	1.6±0.4	1.6±0.3	0.9560

Tabella 9: Effetti della pasta arricchita in *Opuntia* sulle sottofrazioni LDL (n = 49).

	<i>Baseline</i>	<i>Dopo 1 mese</i>	<i>p=</i>
<i>VLDL (%)</i>	15.0±3.6	14.8±3.1	0.742
<i>IDL-C</i>	6.5±2.0	7.7±1.2	<0.0001
<i>IDL-B</i>	7.0±2.6	8.0±2.3	0.0002
<i>IDL-A</i>	7.6±3.3	10.7±2.4	<0.0001
<i>LDL-1 (%)</i>	18.4±5.3	21.4±3.9	0.0002
<i>LDL-2 (%)</i>	14.9±5.7	9.7±3.7	<0.0001
<i>LDL-3 (%)</i>	3.1±3.0	1.5±2.1	0.0004
<i>LDL-4 (%)</i>	0.5±1.9	0.2±0.6	0.2987
<i>LDL-5 (%)</i>	0.3±1.9	0.0±0.0	0.3223
<i>LDL-6 (%)</i>	-	-	-
<i>LDL-7 (%)</i>	-	-	-

5.3.3 DISCUSSIONE

L'effetto di OFI è principalmente esercitato sul metabolismo lipidico con una riduzione significativa delle sdLDL. Gli altri parametri esaminati (parametri antropometrici e bio-umorali) non si sono modificati durante il trattamento. Tuttavia,

i nostri risultati possono essere associati ad una durata relativamente breve dello studio.

Opuntia spp. è sempre stato utilizzato per scopi nutrizionali e curativi ed è considerato una fonte nutrizionale per prevenire il diabete, le malattie cardiovascolari, la sindrome metabolica, l'obesità o l'invecchiamento. Da studi condotti su cellule murine, l'OFI sembra avere effetti positivi sull'inibizione dell'ossidazione delle LDL in modo dose-dipendente, con un'attività massima a una concentrazione di 100 µg/mL in cui si ottiene il 50% di inibizione dopo 18 ore di incubazione²⁶². Tale attività può essere dovuta alla presenza di quercetina, un potente flavonoide con attività antiossidante. In un altro studio è stato ipotizzato che l'estratto acquoso di *Opuntia ficus-indica* inibisca la lipasi pancreatica, per la quale è stato condotto uno studio in vitro dell'attività inibitoria dell'estratto di *Opuntia* sulla lipasi pancreatica³²⁵. Inoltre, è stato rivelato che i cladodi e i frutti sono ricche fonti di antiossidanti fitochimici^{326,327}, fibre alimentari e minerali^{236,328,329}. I principali composti fenolici trovati nei fiori e nei cladodi di OFI erano gli acidi fenolici (acido idrossicinnamico, caffeico, ferulico e cumarico), flavonoli (quercitina, kaempferolo) e flavoni (derivati isoramnetina e isoramnetina)³³⁰. Le proprietà anti-aterogeniche dell'OFI derivano dall'elevato contenuto di antiossidanti (polifenoli) che potrebbero ridurre la perossidazione lipidica³³¹ e anche da fibre e proteine dietetiche che mostrano proprietà ipolipemizzanti³³². L'effetto protettivo dell'OFI può derivare dalla pectina, una fibra solubile³³² alterando il metabolismo epatico del colesterolo senza alterarne l'assorbimento^{333,334}. Il consumo di succo di frutta e polpa di *Opuntia* spp. previene naturalmente lo stress ossidativo e migliora lo stato di ossidoriduzione in soggetti sani³³⁵. *Opuntia* spp. potrebbe inibire gli stadi iniziali della genesi dell'ateroma²⁶² inibendo la NADPH ossidasi (NOX2) con conseguente diminuzione della generazione di anione extracellulare di ossido^{262,336}. Dopo 1 mese di integrazione di OFI con pasta, abbiamo riscontrato un aumento significativo di sottoclassi LDL-1 grandi e meno aterogeniche con una concomitante riduzione delle sottoclassi LDL-3,

più aterogeniche e delle sottoclassi LDL-4 e LDL-5, anche se quest'ultimo non ha raggiunto la significatività statistica. Budinski et al.³³⁷ hanno dimostrato che nei pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote, il consumo regolare di fichi d'India da parte di *Opuntia robusta* ha ridotto significativamente i livelli plasmatici di colesterolo LDL ma non ha avuto alcun effetto su HDL e trigliceridi. Nel nostro studio, il CT, il LDL-C e il HDL-C sono rimasti invariati, mentre i TG sono diminuiti, sebbene i cambiamenti non fossero statisticamente significativi. Allo stesso modo, il consumo da parte di donne affette da sindrome metabolica di *O. ficus-indica* ha mostrato un rapido aumento del livello di colesterolo HDL circolante in concomitanza con una diminuzione del LDL-C e (leggermente) nei TG³³⁸ come nel nostro studio.

Tutti gli altri parametri della sindrome metabolica non variano in modo significativo; il nostro è il primo studio che ha evidenziato l'effetto su sdLDL e i nostri dati preliminari richiedono ulteriori studi per confermare questo effetto.

5.4 EFFETTI DELLA CHIRURGIA BARIATRICA IN PAZIENTI OBESI CON NAFLD

5.4.1 MATERIALI E METODI

Pazienti inclusi nello studio

Sono stati arruolati 51 pazienti affetti da obesità severa (BMI >35) presso l'U.O.C. di Chirurgia Oncologica del Policlinico di Palermo per sottoporsi all'intervento chirurgico di by-pass gastrico. Questo studio ha adottato le procedure stabilite dalla dichiarazione di Helsinki del 1975 e approvate dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Palermo. Le caratteristiche dei pazienti inclusi nello studio sono riportate in *Tabella 10*.

Durante l'arruolamento, i 51 pazienti hanno firmato il consenso informato per la partecipazione allo studio e sono stati sottoposti a visita medica (valutazione delle

condizioni cliniche pre-intervento, peso e Body Max Index-BMI), prelievo ematochimico per le analisi di routine (emocromo, assetto lipidico, profilo glicemico, funzione renale, indici di coagulazione ed infiammazione) (**Tabella 11**) ed ecografia dell'addome superiore (per la stadiazione della steatosi secondo i criteri di Joseph); prima dell'intervento chirurgico, è stato eseguito prelievo ematochimico per la valutazione di citochine infiammatorie (TNF α , IL-1b, IL-6, IL-17a, IL-10) ripetuto dopo una settimana, al momento della dimissione.

Tabella 10: Caratteristiche generali dei pazienti (n=51).

Età media (anni)	39±12
Donne, n (%)	38 (75)
Tabagismo, n (%)	18 (35)
Consumo di alcol, n (%)	2 (4)
Diabete, n (%)	14 (27)
Ipertensione, n (%)	15 (29)
Dislipidemia, n (%)	20 (39)

Tabella 11: Dati antropometrici e biochimici preliminari dei 51 pazienti arruolati.

Peso (Kg)	121±26
BMI (Kg/m ²)	45±7
Glicemia (mg/dl)	97±32
Insulinemia (mcrU/ml)	26±22
Peptide C (ng/ml)	4±2
AST (mU/ml)	26±16
ALT (mU/ml)	34±17
GGT (U/l)	34±33
CT (mg/dl)	190±37
HDL-C (mg/dl)	53±19
LDL-C (mg/dl)	114±37
TG (mg/dl)	121±56

Durante la procedura chirurgica è stata effettuata biopsia epatica come da protocollo per la stadiazione istologica della steatosi (staging, grading) e per le analisi di

immunoistochimica di proteine coinvolte nella risposta allo stress dell'ER, tutt'ora in corso.

I 51 pazienti sono stati suddivisi in 4 gruppi (*Tabella 12*):

- **Obesi con NAFLD e diabete mellito tipo 2:** 12 pazienti
- **Obesi con NAFLD senza diabete mellito tipo 2:** 34 pazienti
- **Obesi senza NAFLD con diabete mellito tipo 2:** 3 pazienti
- **Obesi senza NAFLD e diabete mellito tipo 2:** 2 pazienti

Metodiche di indagine

Dosaggio delle citochine

I campioni di sangue sono stati raccolti in provette specifiche per la raccolta del siero senza EDTA. Il siero è stato separato dal sangue intero mediante centrifugazione a bassa velocità a 2500 rpm per 15' a 4 °C. L'analisi sierologica dei livelli delle principali citokine pro- (IL-6, IL-17A, TNF- α , IL-1B) e anti-infiammatorie (IL-10) è stata condotta usando saggi Luminex, accoppiati a Bio-Plex Manager Software.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS (V.17.0 per Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). È stato condotto il test di Wilcoxon non parametrico, mentre l'analisi di correlazione è stata effettuata utilizzando il metodo di correlazione di Spearman, per valutare se i cambiamenti nei fattori di rischio cardio-metabolici erano associati a cambiamenti di altri parametri misurati.

5.4.2 RISULTATI

Nelle tabelle (*Tabella 12-13*) sono mostrati i dati preliminari dei parametri antropometrici e biochimici e delle citochine infiammatorie, queste dosate solo su 17 pazienti. Inoltre sono riportate le correlazioni statistiche eseguite soltanto tra il gruppo di obesi con NAFLD e DMT2 ed il gruppo di obesi solo con NAFLD

considerando sia il confronto tra i parametri antropometrici e biochimici (**Tabella 14**) pre-intervento, ma anche i valori delle citochine infiammatorie (**Tabella 15-16**) pre e post-intervento. I risultati molecolari e genetici sono tuttora in corso.

Tabella 12: Parametri antropometrici e biochimici al baseline dei 4 gruppi di studio.

	<i>OBESI</i> <i>NAFLD</i> <i>DMT2</i> <i>(n=12)</i>	<i>OBESI</i> <i>NAFLD</i> <i>DMT2</i> <i>(n=34)</i>	<i>OBESI</i> <i>DMT2</i> <i>(n=3)</i>	<i>OBESI</i> <i>DMT2</i> <i>(n=2)</i>
Peso (Kg)	133±20	117±29	123±3	105±11
BMI (Kg/m ²)	46±6	46±7	40±3	40±4
Glicemia (mg/dl)	109±55	90±14	131±49	83±4
Insulinemia (mcrU/ml)	42±36	20±13	23±0	17±0
Peptide C (ng/ml)	5±3	3±1	4±0	3±0
AST (mU/ml)	24±8	28±18	18±6	17±5
ALT (mU/ml)	34±13	36±19	27±11	20±11
GGT (U/l)	35±21	35±38	40±37	18±6
CT (mg/dl)	181±40	193±36	157±9	223±5
HDL-C (mg/dl)	45±13	56±20	43±0	57±30
LDL-C (mg/dl)	105±42	115±46	137±61	139±25
TG (mg/dl)	143±86	113±35	113±76	136±1

Tabella 13: Risultati preliminari delle citochine infiammatorie nei 4 gruppi di studio.

	<i>OBESI</i> <i>NAFLD</i> <i>DMT2</i> <i>(n=5)</i>	<i>OBESI</i> <i>NAFLD</i> <i>DMT2</i> <i>(n=10)</i>	<i>OBESI</i> <i>DMT2</i> <i>(n=1)</i>	<i>OBESI</i> <i>DMT2</i> <i>(n=1)</i>
IL-6 (pg/ml)	1.2±0.9	2.7±1.2	2.1±0	10.7±0
IL-17A (pg/ml)	1.8±2.3	0.8±0.9	0.63±0	1.1±0
TNF ALFA (pg/ml)	10.0±15.3	5.6±3.2	5.7±0	2.0±0
IL-1B (pg/ml)	3.4±3.0	0.3±0.3	0.0±0	0.2±0
IL-10 (pg/ml)	0.7±0.6	0.4±0.5	0.0±0	82.3±0

Tabella 14: Analisi statistica sui parametri antropometrici e biochimici dei 2 gruppi di studio.

	<i>OBESI NAFLD DMT2 (n=12)</i>	<i>OBESI NAFLD ----- (n=34)</i>	<i>P = Value</i>
Peso (Kg)	133±20	117±29	0.3970
BMI (Kg/m ²)	46±6	46±7	0.9406
Glicemia (mg/dl)	109±55	90±14	0.1596
Insulinemia (mcrU/ml)	42±36	20±13	0.6985
Peptide C (ng/ml)	5±3	3±1	0.6016
AST (mU/ml)	24±8	28±18	0.6627
ALT (mU/ml)	34±13	36±19	0.3503
Gamma GT (U/l)	35±21	35±38	0.3725
Colesterolo Totale (mg/dl)	181±40	193±36	0.7373
HDL (mg/dl)	45±13	56±20	0.4882
LDL (mg/dl)	105±42	115±46	0.8740
Trigliceridi (mg/dl)	143±86	113±35	0.6016

Tabella 15: Analisi statistica sulle citochine infiammatorie dei 2 gruppi di studio (pre-intervento).

	<i>OBESI NAFLD DMT2 (n=5)</i>	<i>OBESI NAFLD ----- (n=10)</i>	<i>P = Value</i>
IL-6 (pg/ml)	1.2±0.9	2.7±1.2	0.0945
IL-17A (pg/ml)	1.8±2.3	0.8±0.9	0.3691
TNF ALFA (pg/ml)	10.0±15.3	5.6±3.2	0.5378
IL-1B (pg/ml)	3.4±3.0	0.3±0.3	0.0859
IL-10 (pg/ml)	0.7±0.6	0.4±0.5	0.1365

Tabella 16: Analisi statistica sulle citochine infiammatorie dei 2 gruppi di studio (post-intervento).

	<i>OBESI NAFLD DMT2 (n=5)</i>	<i>OBESI NAFLD ----- (n=10)</i>	<i>P = Value</i>
IL-6 (pg/ml)	2.3±1.8	6.1±5.1	0.0945
IL-17A (pg/ml)	3.1±1.5	0.9±0.7	0.3691
TNF ALFA (pg/ml)	12.4±17.4	6.0±2.5	0.5378
IL-1B (pg/ml)	2.6±5.0	0.41±0.42	0.0859
IL-10 (pg/ml)	1.4±1.1	0.7±1.0	0.1365

5.4.3 DISCUSSIONE

L'obesità si accompagna ad aumento di morbilità e mortalità per il DMT2 e le patologie cardiovascolari³³⁹. Il tessuto adiposo é stato riconosciuto come un complesso organo endocrino; non solo gli adipociti, ma anche altri componenti del tessuto adiposo, quali tessuto nervoso, matrice connettivale, cellule stromavascolari e cellule immunitarie^{80,340} sono in grado di secernere numerose molecole con molteplici azioni a livello locale e sistemico^{341,342}. Si assiste a modificazioni morfologiche e metaboliche a livello del tessuto adiposo, che si accompagnano a maggior espressione di citochine ad azione proinfiammatoria (IL-6 e TNF- α); queste modifiche si accompagnano a un aumento delle concentrazioni sieriche di proteine della fase acuta³⁴³, determinando l'infiammazione cronica "di basso grado", che ha un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione delle complicanze legate all'obesità. I nostri dati mostrano una panoramica metabolica ed infiammatoria dei pazienti che si sottopongono a chirurgia bariatrica; sono stati stratificati per presenza di comorbidità (NAFLD e Diabete vs NAFLD senza Diabete) per una più accurata valutazione terapeutica post-intervento. Numerosi studi dimostrano che le concentrazioni sieriche di IL-6, prodotta dal tessuto adiposo³⁴⁴, sono aumentate in condizioni di obesità^{78,81,345}. I depositi adiposi viscerali sono i maggiori responsabili dei livelli circolanti di IL-6 di origine adiposa⁷⁸ e possono modulare direttamente l'attività del

fegato nella sintesi di proteine della fase acuta, come la PCR. Il tessuto adiposo è anche un importante produttore di TNF- α , mediatore precoce della risposta di fase acuta, prodotto principalmente da macrofagi e adipociti⁸⁰; la secrezione di TNF- α aumenta in condizioni di obesità^{81,82} e stimola la produzione di chemochine, IL-6, PCR e induce l'espressione di molecole di adesione leucocitaria⁸³. Nel nostro studio dopo una settimana dall'intervento chirurgico non abbiamo avuto delle variazioni significative del pattern infiammatorio probabilmente per la breve tempistica prevista dallo studio. Inoltre è stato difficile eseguire un follow-up accurato a causa della mancata disponibilità dei pazienti a ritornare al centro Restiamo comunque in attesa delle analisi immuno-istochimiche per avere maggiori dettagli sulla valutazione del rischio di questi pazienti dopo l'intervento chirurgico. Questi dati sono preliminari e richiedono ulteriori studi, soprattutto una tempistica più lunga, per capire meglio quali sono i meccanismi implicati nella valutazione infiammatoria di questi soggetti.

6. CONCLUSIONI

Alla luce delle evidenze presentate in questa tesi, si evince che ci sono alternative terapeutiche che possono in un modo o nell'altro proteggere i pazienti ad elevato rischio cardiometabolico. Ormai è noto che i farmaci incretinici svolgano un ruolo di prevenzione dal punto di vista cardio-metabolico con la riduzione degli eventi cardiovascolari in particolare su pazienti diabetici; la nutraceutica con i suoi componenti ha mostrato sempre più degli effetti benefici sul metabolismo lipidico nei pazienti ad elevato rischio riducendo le sdLDL; in ultimo ci sono buone speranze che la chirurgia bariatrica possa agire sui parametri infiammatori favorendo oltre un effetto estetico anche un effetto terapeutico sulle comorbidità di cui sono affetti i pazienti obesi e metabolici.

Studi futuri condotti su casistiche più ampie e con follow-up maggiori potranno confermare ciò che questi studi pilota hanno dimostrato.

7. ABBREVIAZIONI

AD	Alzheimer Disease, malattia di Alzheimer
ADA	American Diabetes Association
ADOPT	A Diabetes Outcome Progression Trial
AGE	Acidi Grassi Essenziali
ALT	Alanino Amino Transferasi
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
AST	Aspartato Amino Transferasi
ATP	Adenosina Trifosfato
BAT	Brown Adipose Tissue, Tessuto Adiposo Bruno
BID	Bis In Die
BMI	Body Mass Index
CHD	Coronary Heart Disease, malattia coronarica
CI	Confidence Interval
cIMT	Ispessimento Medio Intimale Carotideo
COX	Ciclossigenasi
CREBP	cAMP Response Element-Binding Protein
CRL2181	Cellule Endoteliali Aortiche Murine
CT	Colesterolo Totale
CV	Cardiovascolare
CVD	Cardiovascular Disease, malattie cardiovascolari
DAG	Dicilgliceroli
DBP	Pressione Diastolica
DHA	Docosapentaenoico
DM	Diabete Mellito
DMG	Diabete Mellito Gestazionale
DMT1	Diabete Mellito di Tipo 1
DMT2	Diabete Mellito di Tipo 2
DNL	De Novo Lipogenesi
DPP-4	Dipeptidil-Peptidasi IV
EDTA	Acido Etilendiamminotetraacetico
eIF2 α	eukaryotic translation Initiation Factor 2 α
ELIXA	Evaluation of Lixisenatide in Acute Coronary Syndrome study

EPA	Eicosapentaenoico
ET-1	Endotelina-1
EUREXA	Europe Exenatide Study
EXSCEL	Exenatide Study of Cardiovascular Event Lowering
EVO	Olio Extravergine d'Oliva
FANS	Farmaci Anti-Infiammatori Non Steroidei
FDA	Food and Drug Administration
FFA	Free Fatty Acid, Acidi Grassi Liberi
FLI	Fatty Liver Index
FMD	Flow-Mediated Dilation
GGT	Gamma Glutamyl Trasferasi
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HBV	Virus dell'Epatite B
HCV	Virus dell'Epatite C
HDL-C	High Density Lipoprotein Cholesterol
HIV	Virus dell'Immunodeficienza Umana
HO-1	Eme Ossigenasi-1
HOMA-B	Homeostasis Model Assesment
HPLC	Cromatografia Liquida ad Alta Risoluzione
HR	Hazard Ratio
HSP-90	Heat Shock Protein-90
IDF	International Diabetes Foundation, Fondazione Internazionale del Diabete
IRS-1	Insulin Receptor Substrate-1
IL-1	Interleuchine 1
IL-6	Interleuchine 6
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IKK	NF- κ B kinase β
INF γ	Interferon Gamma
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
ITT	Intent-To-Treats
JNK	c-Jun N-terminal Kinase 1
LADA	Diabete Autoimmune Latente dell'Adulto
LAR	Long-Acting Release

LDL-C	Low Density Lipoprotein Cholesterol
LEAD-6	Liraglutide Effect and Action in Diabetes
LEADER	Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results
LEAN	Liraglutide Safety and Efficacy in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis
LPS	Lipopolisaccaride
MACE	Major Adverse Cardiac Event
MCP-1	Protein Chemoattractant Monociti 1
MD	Dieta Mediterranea
MetS	Sindrome Metabolica
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young, Diabete di Tipo Adulto a Esordio Giovanile
MRI	Imaging a Risonanza Magnetica
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NADPH	Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease, Steatosi Epatica non Alcolica
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NCEPATPIII	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NF-κB	Nuclear factor κ chain transcription in B cells
NLS	Sequenza di Localizzazione Nucleare
NO	Ossido Nitrico
NOX2	Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato Ossidasi
OC	Oleocantale
OFI	Opuntia ficus-indica
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PCR	Proteina C-Reattiva
PFT	Grasso Preperitoneale
PGC-1	PPAR- γ, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha
PGE2	Prostaglandin E2
PGH2	Prostaglandine H2
PI3-K	Fosfatidilinositolo-3-Chinasi
PKCε	Proteina Chinasi Cε
PLA2	Fosfolipasi A2

PKR	Protein Kinase RNA-activated
RE	Reticolo Endoplasmatico
PREDIMED	Primary Prevention of Cardiovascular Disease with Mediterranean Diet
ROS	Specie Reattive dell'Ossigeno
SAAT	Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue, Tessuto Adiposo Addominale Sottocutaneo
SBP	Pressione Sistolica
sdLDL	small-dense LDL
SE	Standard Error
SFT max	Spessore Massimo del Grasso Sottocutaneo
SFT min	Spessore Minimo del Grasso Sottocutaneo
SNC	Sistema Nervoso Centrale
SUSTAIN	Long-term Outcomes with Semaglutide in Subjects with Type 2 Diabetes Study
TC	Tomografia Computerizzata
TG	Trigliceridi
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNF- β	Tissue Necrosis Factor- β
TRPA-1	Transient Receptor Potential Ankyrin-1
TXA2	Trombossano A2
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
UPR	Unfolded Protein Response
VAT	Visceral adipose tissue, Tessuto Adiposo Viscerale in Eccesso
VCAM	Vascular Cell Adhesion Protein
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WAT	White Adipose Tissue, Tessuto Adiposo Bianco
WC	Waist Circumference, Circonferenza Vita
WHR	Waist to Hip Ratio, Rapporto Vita-Fianchi

8. BIBLIOGRAFIA

1. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit Pathw Cardiol.* 2005 Dec;4(4):198-203.
2. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). 2001 May;285(19):2486-97.
3. Mikhailidis DP, Elisaf M, Rizzo M, et al. "European panel on low density lipoprotein (LDL) subclasses": a statement on the pathophysiology, atherogenicity and clinical significance of LDL subclasses: executive summary. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011 Sep;9(5):531-2.
4. Mikhailidis DP, Elisaf M, Rizzo M, et al. "European panel on low density lipoprotein (LDL) subclasses": a statement on the pathophysiology, atherogenicity and clinical significance of LDL subclasses. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011 Sep;9(5):533-71.
5. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, et al. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med.* 2011 May;9:48.
6. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, et al. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med.* 2008 Nov-Dec;14(11-12):741-51.
7. Mansego ML, Redon J, Martinez-Hervas S, et al. Different impacts of cardiovascular risk factors on oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2011 Sep;12(9):6146-63.
8. Stern MP, Williams K, González-Villalpando C, et al. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care.* 2004 Nov;27(11):2676-81.
9. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014 Mar; 2014:943162.

10. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. INTERHEART Study Investigators. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*. 2005 Nov;366(9497):1640-9.
11. "WHO progress report on the implementation of the European Charter on Counteracting Obesity" Brussels, Belgium 8/12/2010- www.euro.who.int
12. No authors listed. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:I-XII, 1-253.
13. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, et al. Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 91 million participants. *Lancet*. 2011 Feb;377(9765):557-67.
14. Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature*. 2000 Apr;404(6778):632-4.
15. Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Sep;32(9):2052-9.
16. Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*. 2003 Jun;144(6):2195-200.
17. Kralisch S, Klein J, Lossner U, et al. Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol*. 2005 Jun;185(3):R1-8.
18. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec;444(7121):860-7.
19. Batra A, Siegmund B. The role of visceral fat. *Dig Dis*. 2012 May;30(1):70-4.
20. Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest*. 2002 Nov;25(10):823-35.
21. Symonds ME. Brown adipose tissue growth and development. *Scientifica (Cairo)*. 2013 Mar;2013:305763.

22. Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, et al. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Oct;301(4):E567-84.
23. Thundyil J, Pavlovski D, Sobey CG, et al. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br J Pharmacol.* 2012 Jan;165(2):313-27.
24. Kishida K, Kim KK, Funahashi T, et al. Relationships between circulating adiponectin levels and fat distribution in obese subjects. *J Atheroscler Thromb.* 2011 Mar;18(7):592-5.
25. Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2563-8.
26. No authors listed. Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am J Clin Nutr.* 1992 Feb;55(2 Suppl):615S-619S.
27. Wing RR, Koeske R, Epstein LH, et al. Long-term effects of modest weight loss in type II diabetic patients. *Arch Intern Med.* 1987 Oct;147(10):1749-53.
28. Dattilo AM, Kris-Etherton PM. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 1992 Aug;56(2):320-8.
29. Björntorp P, Rosmond R. Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000 Jun;24 Suppl 2:S80-5.
30. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2006. *Diabetes Care.* 2006 Jan;29 Suppl 1:S4-42.
31. Szabo M, Máté B, Csép K, et al. Genetic Approaches to the Study of Gene Variants and Their Impact on the Pathophysiology of Type 2 Diabetes. *Biochem Genet.* 2017 Nov. [Epub ahead of print]
32. Dodds S. The How-To for Type 2: An Overview of Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Nurs Clin North Am.* 2017 Dec;52(4):513-522.
33. Caspard H, Jabbour S, Hammar N, et al. Recent Trends in the Prevalence of Type 2 Diabetes and the Association With Abdominal Obesity Lead to Growing Health Disparities in the United States. *Diabetes Obes Metab.* 2017 Oct. [Epub ahead of print]

34. Roden M. Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Sep;29 Suppl 2:S111-5.
35. Liu C, Lin JD. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011 Apr;43(4):248-57.
36. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017 Jun;128:40-50.
37. Barrett EJ, Liu Z, Khamaisi M, et al. Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Nov 8. [Epub ahead of print]
38. Reaven, G. M. HOMA-beta in the UKPDS and ADOPT. Is the natural history of type 2 diabetes characterised by a progressive and inexorable loss of insulin secretory function? Maybe? Maybe not? *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*. 2009 Apr;6(2):133-8.
39. Pfeffer MA, Claggett B, Diaz R, et al.; ELIXA Investigators. Lixisenatide in patients with type 2 diabetes and acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2015 Dec;373(23):2247-57.
40. Holman RR, Bethel MA, Mentz RJ, et al.; EXSCEL Study Group. Effects of Once-Weekly Exenatide on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017 Sep;377(13):1228-1239.
41. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al.; LEADER Trial Investigators. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016 Jul;375(4):311-22.
42. Marso SP, Bain SC, Consoli A, et al.; SUSTAIN-6 Investigators. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1834-1844.
43. Rugarli C. *Medicina interna sistematica 6°Ed*. Masson. 2014; 68:1561-1576.
44. <http://www.epicentro.iss.it/problemi/colesterolo/epid.asp>.

45. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM*. 2006 Jan;99(1):1-14.
46. Berneis K, Rizzo M. LDL size: does it matter ? *Swiss Med Weekly*. 2004 Dec;134(49-50):720-4.
47. Austin MA. Genetic epidemiology of low-density lipoprotein subclass phenotypes. *Ann Med*. 1992 Dec;24(6):477-81.
48. National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of High Blood Cholesterol in Adult (Adult Treatment Panel II). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of high Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002 Dec;106(25):3143-421.
49. De Graaf J, Swinkels DW, Demacker PN, et al. Differences in the low density lipoprotein subfraction profile between oral contraceptive users and controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Jan;76(1):197-202.
50. Bjornheden T, Babyi A, Bondjers G, et al. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis*. 1996 Jun;123(1-2):43-56.
51. Carlsson R, Lindberg G, Westin L, et al. Serum lipids four weeks after acute myocardial infarction are a valid basis for lipid lowering intervention in patients receiving thrombolysis. *Br Heart J*. 1995 Jul;74(1):18-20.
52. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 2013 May;5(5):1544-60.
53. Fracanzani AL, Petta S, Lombardi R, et al. Liver and Cardiovascular Damage in Patients With Lean Nonalcoholic Fatty Liver Disease, and Association With Visceral Obesity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017 Oct;15(10):1604-1611.
54. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015 May;61(5):1547-54.

55. Bedossa P. Histological Assessment of NAFLD. *Dig Dis Sci.* 2016 May;61(5):1348-55.
56. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol.* 2013 Sep;59(3):550-6.
57. Asrih M, Jornayvaz FR. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Dec;418(1):55-65.
58. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004 Jul;279(31):32345-53.
59. Roden M, Price TB, Perseghin G, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest.* 1996 Jun;97(12):2859-65.
60. Shubham K, Vinay L, Vinod PK. Systems-level organization of non-alcoholic fatty liver disease progression network. *Mol Biosyst.* 2017 Aug;13(9):1898-1911.
61. Jung U, Choi M-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2014 Apr;15(4):6184-223.
62. Memorial W. Fatty Liver. *StatPearls.* 2017; p. 1–13.
63. Petta S, Wong VW, Cammà C, et al. Serial combination of non-invasive tools improves the diagnostic accuracy of severe liver fibrosis in patients with NAFLD. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Sep;46(6):617-627.
64. Bjorntorp, P. Metabolic abnormalities in visceral obesity. 1992 Feb;24(1):3-5.
65. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr;257(1):79-83.
66. Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition.* 2001 Nov-Dec;17(11-12):953-66.

67. Wood IS, de Heredia FP, Wang B, et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc.* 2009 Nov;68(4):370-7.
68. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 2007 Apr;56(4):901-11.
69. Chen B, Lam KS, Wang Y, et al. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar;341(2):549-56.
70. Hirosumi J. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002 Nov;420(6913):333-6.
71. Hotamisligil GS. Adipose expression of tumor necrosis factor alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan;259(5091):87-91
72. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS protein, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Apr;296(4):E581-91
73. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004 Oct;306(5695):457-61.
74. Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000 Jan;287(5453):664-6.
75. Deng J, Lu PD, Zhang Y, et al. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(23):10161-8.
76. Hu P, Han Z, Couvillon AD, et al. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol.* 2006 Apr;26(8):3071-84.
77. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1793-801.
78. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.* 2007 Apr;56(4):1010-3.

79. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J*. 2010 Feb;74(2):213-20.
80. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2548-56.
81. Park H, Jung Yul Park J, Yuc R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005 Jul;69(1):29-35.
82. Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Olszanecka-Glinianowicz M, et al. Serum concentrations of TNF- α and soluble TNF- α receptors in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Nov;24(11):1392-5.
83. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*. 2010 Jul;2010:802078.
84. Hotamisligil, G.S. Tumor necrosis factor- α inhibits signalling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May;91(11):4854-8.
85. Zhang, H.H. Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):2929-35.
86. Zhang B. Negative regulation of peroxisome proliferator activated receptor- γ gene expression contributes to the anti-adipogenic effects of tumor necrosis factor- α . *Mol. Endocrinol*. 1996 Nov;10(11):1457-66.
87. Guilherme A. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 May;9(5):367-77.
88. Pape ME. Effect of tumor necrosis factor on acetyl-coenzyme A carboxylase gene expression and preadipocyte differentiation. *Mol Endocrinol*. 1988 May;2(5):395-403.
89. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1796-808.
90. Anderson EK, Gutierrez DA, Hasty AH. Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr Opin Lipidol*. 2010 Jun;21(3):172-7.

91. Sell H, Eckel J. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Jul;13(4):366-70.
92. Lumeng CN, Jennifer LB, Alan RS. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):175-84.
93. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005 Nov;46(11):2347-55.
94. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res*. 2008 Jul;49(7):1562-8.
95. Gerber PA, Nikolic D, Rizzo M. Small, dense LDL. *Curr Opin Cardiol*. 2017 Jul;32(4):454-459.
96. Nikolic D, Katsiki N, Montalto G, et al. Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: Clinical significance and therapeutic approaches. *Nutrients*. 2013 Mar;5(3):928-48.
97. Garcia-Rios A, Nikolic D, Perez-Martinez P, et al. LDL and HDL Subfractions, Dysfunctional HDL: Treatment Options. *Curr Pharm Des*. 2014;20(40):6249-55.
98. Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, et al. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2017 May;2017:1273042.
99. Gentile M, Panico S, Jossa F, et al. Small dense LDL particles and metabolic syndrome in a sample of middle-aged women. Findings from Progetto Atena. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2007 Nov;388(1-2):179-183
100. Michele Liscio. Lo spessore medio-intimale come marker di rischio cardiovascolare. Qual è il suo significato clinico e come si misura. http://www.mediciniretebusnago.org/index_8_75960802.pdf
101. Società Italiana di Diagnostica Vascolare SIDV-GIUV: Procedure operative per indagini diagnostiche e vascolare. Revisione 2007.

102. Fried LP, Borhani NO, Enright P, et al. The Cardiovascular Health Study: Design and Rationale. *Ann Epidemiol.* 1991 Feb;1(3):263-76.
103. Hofman A, Brusselle GGO, Darwish Murad S et al. The Rotterdam Study: 2016 objectives and design update. *Eur J Epidemiol.* 2015 Aug;30(8):661-708.
104. No authors listed. The ARIC Investigators. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: design and objectives. *Am J Epidemiol.* 1989 Apr;129(4):687-702.
105. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. Linee guida 2013 ESH/ESC per la diagnosi ed il trattamento dell'ipertensione arteriosa. Supplemento ipertensione e prevenzione cardiovascolare. 2013 Apr-Sett | vol. 20 | n. 2-3.
106. Eikendal AL, Groenewegen KA, Anderson TJ et al. Common carotid intima-media thickness relates to cardiovascular events in adults aged <45 years. Hypertension. *Hypertension.* 2015 Apr;65(4):707-13.
107. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, et al. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2007 Jan;115(4):459-67.
108. Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001 Nov;38 Suppl 2:S3-6.
109. Fonte: Erikson et al., 2015.
110. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE jr, et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990 Jul;323(1):22-7.
111. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986 Oct;315(17):1046-51.
112. Oliviero U, Apuzzi V, Bosso G, Valvano A, "Non-invasive assessment of endothelial function: the Flow-mediated dilation". *Cardiologia ambulatoriale* 2007 Feb;2-3:68-75.
113. Harris RA, Nishiyama SK et al. Ultrasound assessment of Flow-mediated dilation: a tutorial". *Hypertension,* 2010 May;55(5):1075–1085.

114. Byström S, Jensen B, Jensen-Urstad M, et al. Ultrasound-Doppler technique for monitoring blood flow in the brachial artery compared with occlusion plethysmography of the forearm. *Scand J Clin Lab Invest*. 1998 Nov;58(7):569-76.
115. González AS1, Kostine A, Gómez-Flores JR, et al. Non-invasive assessment of endothelial function. Intra and inter-observer variability. *Arch Cardiol Mex*. 2006 Oct-Dec;76(4):397-400.
116. Després JP, Lemieux I, Bergeron J, et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Jun;28(6):1039-49.
117. Sharma AM. Adipose tissue: a mediator of cardiovascular risk. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Dec;26 Suppl 4:S5-7.
118. Smith JD, Borel AL, Nazare JA, et al. Visceral adipose tissue indicates the severity of cardiometabolic risk in patients with and without type 2 diabetes: results from the INSPIRE ME IAA study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 May;97(5):1517-25.
119. Bays HE. Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jun;57(25):2461-73.
120. Klein S, Allison DB, Heymsfield SB, et al. Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; American Society for Nutrition; American Diabetes Association. Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Am J Clin Nutr*. 2007 May;85(5):1197-202.
121. Balkau B, Deanfield JE, Després JP, et al. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation*. 2007 Oct;116(17):1942-51.
122. Siren R, Eriksson JG, Vanhanen H. Waist circumference a good indicator of future risk for type 2 diabetes and cardiovascular disease. *BMC Public Health*. 2012 Aug;12:631.

123. Kim SK, Park SW, Kim SH, et al. Visceral fat amount is associated with carotid atherosclerosis even in type 2 diabetic men with a normal waist circumference. *Int J Obes (Lond)*. 2009 Jan;33(1):131-5.
124. Shuster A, Patlas M, Pinthus JH, et al. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br J Radiol*. 2012 Jan;85(1009):1-10.
125. Bayliss WM, Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol*. 1902 Sep;28(5):325-53.
126. La Barre J, Still EU. Studies on the physiology of secretin. *Am J Physiol*. 1930;91:649-53.
127. La Barre J. Sur les possibilites d'un traitement du diabète par l'incrétine. *Bull Acad R Med Belg*. 1932;12:620–634.
128. Loew ER, Gray JS, Ivy AC. Loew ER, Gray JS, Ivy AC. Is a duodenal hormone involved in carbohydrate metabolism? *Am J Physiol*. 1940;270:659-63.
129. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986 Aug;63(2):492-8.
130. Fonte: M. L. Hribal et al, 2008.
131. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006 Nov;368(9548):1696-705.
132. Pfeifer MA, Halter JB, Porte D Jr. Insulin secretion in diabetes mellitus. *Am J Med*. 1981 Mar;70(3):579-88.
133. Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B, et al. Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1984 Oct;74(4):1318-28.
134. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Apr;284(4):E671-8.
135. Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia*. 1985 Aug;28(8):574-8.

136. Lefebvre PJ, Luyckx AS. Glucagon and diabetes: a reappraisal. *Diabetologia*. 1979 Jun;16(6):347-54.
137. Unger RH, Orci L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet*. 1975 Jan;1(7897):14-6.
138. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, et al. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2001 Mar;50(3):609-13.
139. Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, et al. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia*. 2002 Aug;45(8):1111-9.
140. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, et al. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Oct;81(10):3717-21.
141. Grieve DJ, Cassidy RS, Green BD, et al. Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control?. *Br J Pharmacol*. 2009 Aug;157(8):1340-51.
142. Rizzo M, Rizvi AA, Spinass GA, et al. Glucose lowering and anti-atherogenic effects of incretin-based therapies: GLP-1 analogues and DPP-4-inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Oct;18(10):1495-503.
143. Rizzo M, Nikolic D, Banach M, et al. The effects of liraglutide on glucose, inflammatory markers and lipoprotein metabolism: current knowledge and future perspectives. *Clin Lipidol*. 2013;8:173–181.
144. Tate M, Chong A, Robinson E, et al. Selective targeting of glucagon-like peptide-1 signalling as a novel therapeutic approach for cardiovascular disease in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2015 Feb;172(3):721-36.
145. Cernea S, Raz I. Therapy in the early stage: incretins. *Diabetes Care*. 2011 May;34 Suppl 2:S264-71.
146. Robinson E, Tate M, Lockhart S, et al. Metabolically-inactive glucagon-like peptide-1(9-36)amide confers selective protective actions against post-myocardial infarction remodelling. *Cardiovasc Diabetol*. 2016 Apr;15:65.

147. Rizzo M, Nikolic D, Banach M, et al. Incretin-based therapies, glucometabolic health and endovascular inflammation. *Curr Pharm Des.* 2014;20(31):4953-60.
148. Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, et al. A study of two glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes: liraglutide once daily compared with exenatide twice daily in a randomised, 26-week, openlabeltrial (LEAD-6). *Lancet.* 2009 Jul;374(9683):39-47.
149. Buse JB, Nauck M, Forst T, et al. Exenatide once weekly versus liraglutide once daily in patients with type 2 diabetes (DURATION-6): a randomised, open-label study. *Lancet.* 2013 Jan;381(9861):117-24.
150. Aulinger BA, Vahl TP, Prigeon RL, et al. The incretin effect in obese adolescents with and without type 2 diabetes: impaired or intact?. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 May; 310(9): E774–E781.
151. US Food and Drug Administration. Guidance for industry: diabetes mellitus: evaluating cardiovascular risk in new antidiabetic therapies to treat type 2 diabetes. US Department of Health and Human Services, FDA and Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Dec 2008. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm071627.pdf>
152. Rizzo M, Chandalia M, Patti AM, et al. Liraglutide decreases carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes: 8-month prospective pilot study. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Feb;13:49.
153. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet.* 2016 Feb;387(10019):679-90.
154. Rizvi AA, Patti AM, Giglio RV, et al. Liraglutide improves carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: an 8-month prospective pilot study. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Jul;15(10):1391-7.
155. Rizzo M, Rizvi AA, Patti AM, et al. Liraglutide improves metabolic parameters and carotid intima-media thickness in diabetic patients with the metabolic syndrome: an 18-month prospective study. *Cardiovasc Diabetol.* 2016 Dec;15(1):162.

156. Rizzo M, Abate N, Chandalia M, et al. Liraglutide reduces oxidative stress and restores heme oxygenase-1 and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes: a prospective pilot study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Feb;100(2):603-6.
157. DeYoung MB, MacConell L, Sarin V, et al. Encapsulation of exenatide in poly-(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres produced an investigational long-acting once-weekly formulation for type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2011 Nov;13(11):1145–1154.
158. Fineman M, Flanagan S, Taylor K et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of exenatide extended-release after single and multiple dosing. *Clin Pharmacokinet.* 2011 Jan;50(1):65–74.
159. Kayaniyil S, Lozano-Ortega G, Bennett HA, et al. A Network Meta-analysis Comparing Exenatide Once Weekly with Other GLP-1 Receptor Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Ther.* 2016 Mar;7(1):27-43.
160. Drucker DJ, Buse JB, Taylor K, et al. DURATION-1 Study Group. Exenatide once weekly versus twice daily for the treatment of type 2 diabetes: a randomised, open-label, non-inferiority study. *Lancet.* 2008 Oct;372(9645):1240–1250.
161. Blevins T, Pullman J, Malloy J, et al. DURATION-5: exenatide once weekly resulted in greater improvements in glycemic control compared with exenatide twice daily in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 May;96(5):1301–1310.
162. Bergenstal RM, Wysham C, Macconell L, et al. DURATION-2 Study Group. Efficacy and safety of exenatide once weekly versus sitagliptin or pioglitazone as an adjunct to metformin for treatment of type 2 diabetes (DURATION-2): a randomised trial. *Lancet.* 2010 Aug;376(9739): 431–439.
163. Diamant M, Van Gaal L, Guerci B, et al. Exenatide once weekly versus insulin glargine for type 2 diabetes (DURATION-3): 3-year results of an open-label randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 Jun;2(6):464–473.
164. Taylor K, Gurney K, Han J, et al. Exenatide once weekly treatment maintained improvements in glycemic control and weight loss over 2 years. *BMC Endocr Disord.* 2011 Apr;11:9.

165. Diamant M, Van Gaal L, Stranks S, et al. Safety and efficacy of once-weekly exenatide compared with insulin glargine titrated to target in patients with type 2 diabetes over 84 weeks. *Diabetes Care*. 2012 Apr;35(4):683-9.
166. Amori RE, Lau J, Pittas AG. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes. Systematic review and metaanalysis. *JAMA*. 2007 Jul;298(2):194-206.
167. Mannucci E, Rotella CM. Future perspectives on glucagon-like peptide-1, diabetes and cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008 Nov;18(9):639-45.
168. Katout M, Zhu H, Rutsky J, et al. Effect of GLP-1 mimetics on blood pressure and relationship to weight loss and glycemia lowering: results of a systematic meta-analysis and meta-regression. *Am J Hypertens*. 2014 Jan;27(1):130-9.
169. Yoo BK, Triller DM, Yoo DJ. Exenatide: a new option for the treatment of type 2 diabetes. *Ann Pharmacother*. 2006 Oct;40(10):1777–1784.
170. Klonoff DC, Buse JB, Nielsen LL, et al. Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years. *Curr Med Res Opin*. 2008 Jan;24(1):275-86.
171. Chiquette E, Toth PP, Ramirez G, et al. Treatment with exenatide once weekly or twice daily for 30 weeks is associated with changes in several cardiovascular risk markers. *Vasc Health Risk Manag*. 2012 Nov;8:621–629.
172. Bergenstal RM, Li Y, Porter TK, et al. Exenatide once weekly improved glycaemic control, cardiometabolic risk factors and a composite index of an HbA1c 7%, without weight gain or hypoglycaemia, over 52 weeks. *Diabetes Obes Metab*. 2013 Mar;15(3):264-71.
173. Robinson LE, Holt TA, Rees K, et al. Effects of exenatide and liraglutide on heart rate, blood pressure and body weight: systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2013 Mar;15(3):264-71.
174. Gallwitz B, Guzman J, Dotta F et al. Exenatide twice daily versus glimepiride for prevention of glycaemic deterioration in patients with type 2 diabetes with metformin failure (EUREXA): an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*, 16 June 2012; volume 379, No. 9833:2270–2278.

175. Zhou Y, He X, Chen Y, et al. Exendin-4 attenuates cardiac hypertrophy via AMPK/mTOR signaling pathway activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Dec;468(1-2):394-9.
176. Wang Y, Parlevliet ET, Geerling JJ, et al. Exendin-4 decreases liver inflammation and atherosclerosis development simultaneously by reducing macrophage infiltration. *Br J Pharmacol*. 2014 Feb;171(3):723-34.
177. Guo X, Yang Q, Dong J, et al. Tumour risk with once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes mellitus patients: a systematic review. *Clin Drug Investig*. 2016 Jun;36(6):433-41.
178. Debora Bianchi. *Cibo: alchimia del corpo del cuore e della mente*. <http://www.associazioneconse.com/wp-content/uploads/2017/02/Cibo-alchimia-del-corpo-del-cuore-e-della-mente.pdf>
179. <http://www.fimdefelice.org/p2385.html>
180. Patti AM, Katsiki N, Nikolic D, et al. Nutraceutical in Lipid-Lowering Treatment: A Narrative Review on the Role of Chitosan. *Angiology*. 2015 May;66(5):416-21.
181. Mollace V, Sacco I, Janda E, et al. Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: From animal models to human studies. *Fitoterapia*. 2011 Apr;82(3):309-16.
182. Toth PP, Patti AM, Nikolic D, et al. Bergamot Reduces Plasma Lipids, Atherogenic Small Dense LDL, and Subclinical Atherosclerosis in Subjects with Moderate Hypercholesterolemia: A 6 Months Prospective Study. *Front Pharmacol*. 2016 Jan;6:299.
183. Di Donna L, Iacopetta D, Cappello AR, et al. Hypocholesterolaemic activity of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl flavanones enriched fraction from bergamot fruit (*Citrus bergamia*): “In vivo” studies. *Journal of functional food* Volume 7, March 2014, pp. 558–568.
184. Patti AM, Al-Rasadi K, Katsiki N, et al. Effect of a Natural Supplement Containing Curcuma Longa, Guggul, and Chlorogenic Acid in Patients With Metabolic Syndrome. *Angiology*. 2015 Oct;66(9):856-61.

185. Lercker G, Caramia GM. Composizione ed aspetti salutistici dell'olio d'oliva. La rivista italiana delle sostanze grasse-Vol LXXXVII (2010)- p. 147.
186. Boskou D. Olive Oil Chemistry and Technology, AOCS Press, Champaign, IL, USA, 1996, pp. 52–83.
187. Shahidi F. Natural antioxidants Chemistry, health effect and applications. AOCS Press, Champaign, IL (USA) 1996, pp.97-149.
188. Rovellini P., Azzolini M., Cortesi N. Tocoferoli e tocotrienoli in oli e grassi vegetali. Riv. Ital. Sostanze 199, pp 1-5.
189. Alarcón de la Lastra C, Barranco MD, Motilva V, et al. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. Curr Pharm Des. 2001 Jul;7(10):933-50.
190. Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, et al. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. Lipids. 2000 Jan;35(1):45-54.
191. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. Lancet Oncol. 2000 Oct;1:107-12.
192. Aguilera CM, Mesa MD, Ramirez-Tortosa MC, et al. Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease. Clin Nutr. 2004 Aug;23(4):673-81.
193. Caramia G. L'olio extra vergine d'oliva. Dalla leggenda al razionale scientifico degli aspetti nutraceutici. Pediatr Med Chir. 28 (1-3), 9-23, (2006).
194. Caramia G. L'alimentazione del bambino, la patologia cronica-degenerative dell'adulto e la nutri genomica. Ped. Med. Chir. 29, 309-320, (2007).
195. Caramia G. Gli acidi grassi essenziali omega-6 e omega-3: dalla loro scoperta al loro impiego in terapia. Minerva Pediatr. 60(2), 219-33, (2008).
196. Caramia G. Gli acidi grassi essenziali omega-3. Influenza sull'organismo e nuove prospettive terapeutiche. Le Giornate Nazionali di Nutrizione Pratica 2009. Atti, 100-115.

197. Nagyova A, Haban P, Klvanova J, et al. Effects of dietary extra virgin olive oil on serum lipid resistance to oxidation and fatty acid composition in elderly lipidemic patients. *Bratisl Lek Listy*. 2003;104(7-8):218-21.
198. Cicerale S, Lucas LJ, Keast RS. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol*. 2012 Apr;23(2):129-35.
199. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Oct;1(4):a000034.
200. Bragazzi NL. Situating Nutri-Ethics at the Junction of Nutrigenomics and Nutriproteomics in Postgenomics Medicine. *Curr Pharmacogenomics Person Med*. 2013 Jun;11(2):162-166.
201. Virruso C, Accardi G, Colonna-Romano G, et al. Nutraceutical properties of extra-virgin olive oil: a natural remedy for age-related disease? *Rejuvenation Res*. 2014 Apr;17(2):217-20.
202. Montedoro G, Servili M, Baldioli M, et al. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil, 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem*. 1993;41(11): 2228–2234.
203. Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, et al. Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*. 2005 Sep;437(7055):45-6.
204. Cicerale S, Breslin PA, Beauchamp GK, et al. Sensory characterization of the irritant properties of oleocanthal, a natural anti-inflammatory agent in extra virgin olive oils. *Chem Senses*. 2009 May;34(4):333-9.
205. Breslin PA, Gingrich TN, Green BG. Ibuprofen as a chemesthetic stimulus: evidence of a novel mechanism of throat irritation. *Chem Senses*. 2001 Jan;26(1):55-65.
206. Peyrot des Gachons C, Uchida K, Bryant B, et al. Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *J Neurosci*. 2011 Jan;31(3):999-1009.
207. Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci*. 2010 Feb;11(2):458-79.

208. Lu X, Xie W, Reed D, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug;92(17):7961-5.
209. Patrono C, Patrignani P, García Rodríguez LA. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J Clin Invest*. 2001 Jul;108(1):7-13.
210. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct;99(21):13926-31.
211. Narumiya S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Oct;87(10):1015-22.
212. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*. 1994 Jan;367(6460):243-9.
213. Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep*. 2007 May-Jun;59(3):247-58.
214. Corona G, Deiana M, Incani A, et al. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct;362(3):606-11.
215. Iacono A, Gómez R, Sperry J, et al. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis Rheum*. 2010 Jun;62(6):1675-82.
216. Lucas L, Russell A, Keast R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr Pharm Des*. 2011;17(8):754-68.
217. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest*. 2001 Jan;107(2):135-42.
218. Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, et al. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 2007 Apr;117(4):889-901.

219. Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio L, et al. The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Atherosclerosis*. 2007 Oct;194(2):e141-6.
220. Scotece M, Gómez R, Conde J, Lopez V, et al. Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life Sci*. 2012 Dec;91(23-24):1229-35.
221. Hodge AM, English DR, McCredie MR, et al. Foods, nutrients and prostate cancer. *Cancer Causes Control*. 2004 Feb;15(1):11-20.
222. Stoneham M, Goldacre M, Seagroatt V, et al. Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J Epidemiol Community Health*. 2000 Oct;54(10):756-60.
223. Margarucci L, Monti MC, Cassiano C, et al. Chemical proteomics-driven discovery of oleocanthal as an Hsp90 inhibitor. *Chem Commun (Camb)*. 2013 Jul;49(52):5844-6.
224. Li W, Sperry JB, Crowe A, et al. Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau. *J Neurochem*. 2009 Aug;110(4):1339-51.
225. Cicerale S, Conlan XA, Barnett NW, et al. Influence of heat on biological activity and concentration of oleocanthal--a natural anti-inflammatory agent in virgin olive oil. *J Agric Food Chem*. 2009 Feb;57(4):1326-30.
226. Butera D1, Tesoriere L, Di Gaudio F, et al. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J Agric Food Chem*. 2002 Nov;50(23):6895-901.
227. Valente L, Scheinvar L, da Silva G, et al. Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. *Pharmacogn*. 2007 Mag;3:167-172.
228. Stintzing FC, Schieber A, Carle R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur. Food Res. Technol*. March 2001, Volume 212, Issue 4, pp 396-407.

229. Zou DM, Brewer M, Garcia F, et al. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutr J*. 2005 Sep;4:25.
230. Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, et al. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-Methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res*. 2003 Mar;965(1-2):130-6.
231. Galati EM, Mondello MR, Lauriano ER, et al. *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice protects liver from carbon tetrachloride-induced injury. *Phytother Res*. 2005 Sep;19(9):796-800.
232. Sreekanth D, Arunasree MK, Roy KR, et al. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine*. 2007 Nov;14(11):739-46.
233. Galati EM, Mondello MR, Monforte MT, et al. Effect of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cladodes in the wound-healing process. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev*. 2003 Jul;5:1–16.
234. <https://www.cactuspro.com/photos/Cactaceae/Opuntia/ficus-indica/1268.html>
235. Ammar I, Ennouri M, Khemakhem B, et al. Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Ind. Crop. Prod*. 2012 May;37:34–40.
236. Fernández-López JA, Almela L, Obón JM, et al. Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. *Plant Foods Hum Nutr*. 2010 Sep;65(3):253-9.
237. Salim N, Abdelwaheb C, Rabah C, et al. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *Afr. J. Biotechnol*. 2009 Apr;8(8):1623–1624.
238. Chougui N, Tamendjari A, Hamidj W, et al. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. *Food Chem*. 2013 Aug;139(1-4):796-803.
239. Jorge AJ, de La Garza TH, Alejandro ZC, et al. The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013 Jun;3(6):436-42.

240. Khan NS, Ahmad A, Hadi SM. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem Biol Interact.* 2000 Mar;125(3):177-89.
241. Yen GC, Duh PD, Tsai HL. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* 2002 Nov;79:307–313.
242. Li R, Guo M, Zhang G, et al. Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells. *J Ethnopharmacol.* 2006 Aug;107(1):143-50.
243. Nakayama M, Aihara M, Chen YN, et al. Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress–induced retinal ganglion cell death. *Mol Vis.* 2011 Jul;17:1784-93.
244. Abidi S, Ben Salem H, Vasta V, et al. Supplementation with barley or spineless cactus (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cladodes on digestion, growth and intramuscular fatty acid composition in sheep and goats receiving oaten hay. *Small Rumin. Res.* 2009;87:9–16.
245. Soel SM, Choi OS, Bang MH, et al. Influence of conjugated linoleic acid isomers on the metastasis of colon cancer cells in vitro and in vivo. *J Nutr Biochem.* 2007 Oct;18(10):650-7.
246. Cayupán YSC, Ochoa MJ, Nazareno MA. Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chem.* 2011;126:514–519.
247. www.elicriso.it/it/dizionario_botanico/cladodi/
248. Hernández-Urbiola MI, Contreras-Padilla M, Pérez-Torrero E, et al. Study of nutritional composition of nopal (*Opuntia ficus-indica* cv. Redonda) at different maturity stages. *Open Nutr J.* 2011;4:1–6 .
249. Panico AM, Cardile V, Garufi F, et al. Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the metabolism of human chondrocyte cultures. *J Ethnopharmacol.* 2007 May;111(2):315-21.
250. Abd El-Razek FH, Hassan AA. Nutritional value and hypoglycemic effect of prickly cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit juice in Alloxan-induced diabetic rats. *Aust J Basic. Appl. Sci.* 2011;5:356–377.

251. Filannino P, Cavoski I, Thlien N, et al. Lactic Acid Fermentation of Cactus Cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) Generates Flavonoid Derivatives with Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *PLoS One*. 2016 Mar;11(3):e0152575.
252. Allegra M, Ianaro A, Tersigni M, et al. Indicaxanthin from cactus pear fruit exerts anti-inflammatory effects in carrageenin-induced rat pleurisy. *J Nutr*. 2014 Feb;144(2):185-92.
253. Guevara-Arauz JC, Órnelas-Paz JJ, Rosales S, et al. Biofunctional activity of tortillas and bars enhanced with nopal. Preliminary assessment of functional effect after intake on the oxidative status in healthy volunteers. *Chem Cent J*. 2011 Mar;5(1):10
254. Reynoso-Camacho R, de Mejia EG. Nopal (*Opuntia* spp.) and other traditional Mexican plants. *Nutraceuticals, Glycemic Health & Type Diabete*, V.K. Pasupuleti and J.W. Anderson, Eds., pp.379–399, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 2008.
255. Tiss A, Miled N, Verger I, et al. Digestive lipases inhibition: an in vitro study. *Lipases and Phospholipases in Drug Development: from Biochemistry to Molecular Pharmacology*, G. Muller and S. Petry, Eds., pp. 155–194, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2004.
256. Sreerama YN, Takahashi Y, Yamaki K. Phenolic antioxidants in some *Vigna* species of legumes and their distinct inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase activities. *Journal of Food Science*, vol.77, no.9, pp.C927–C933,2012.
257. Han LK, Kimura Y, Kawashima M et al. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *International Journal of Obesity*, vol.25, no.10, pp.1459–1464,2001.
258. Sugiyama K, Ikarashi N, Takeda R, et al. The inhibition of lipase and glucosidase activities by acacia polyphenol. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, Article ID 272075, 8 pages, 2011.
259. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011 Jun;332(6037):1519-23.

260. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1784-92.
261. Guevara-Cruz M, Tovar AR, Aguilar-Salinas CA, et al. A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *J Nutr.* 2012 Jan;142(1):64-9.
262. Keller J, Camaré C, Bernis C, et al. Antiatherogenic and antitumoral properties of *Opuntia cladodes*: inhibition of low density lipoprotein oxidation by vascular cells, and protection against the cytotoxicity of lipid oxidation product 4-hydroxynonenal in a colorectal cancer cellular model. *J Physiol Biochem.* 2015 Sep;71(3):577-87.
263. Farag YM, Gaballa MR. Diabetes: an overview of a rising epidemic. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Jan;26(1):28-35.
264. Arroyo K, Kini SU, Harvey JE, et al. Surgical therapy for diabetes. *Mt Sinai J Med.* 2010 Sep-Oct;77(5):418-30.
265. Shukla AP, Ahn SM, Patel RT, et al. Surgical treatment of type 2 diabetes: the surgeon perspective. *Endocrine.* 2011 Oct;40(2):151-61.
266. Pories WJ, Mehoff JH, Staton KM. The surgical treatment of type two diabetes mellitus. *Surg Clin North Am.* 2011 Aug;91(4):821-36, viii.
267. Busetto L, Sbraccia P, Frittitta L, et al. The growing role of bariatric surgery in the management of type 2 diabetes: evidences and open questions. *Obes Surg.* 2011 Sep;21(9):1451-7.
268. Kashyap SR, Louis ES, Kirwan JP. Weight Loss as a Cure for Type 2 Diabetes? Fact or Fantasy. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2011 Jul;6(4):557-561.
269. Ballestri S, Nascimbeni F, Baldelli E, et al. Ultrasonographic fatty liver indicator detects mild steatosis and correlates with metabolic/histological parameters in various liver diseases. *Metabolism.* 2017 Jul;72:57-65.
270. Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974 Apr;20(4):470-5.

271. Nagele U, Hagele EO, Sauer G, et al. Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1984 Feb;22(2):165-74.
272. Warnick GR, Nguyen T, Albers JJ. Comparison of improved precipitation methods for quantification of high density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem.* 1985 Feb;31(2):217-22.
273. Corrado E, Rizzo M, Tantillo R, et al. Markers of inflammation and infection influence the outcome of patients with baseline asymptomatic carotid lesions: a 5-year follow-up study. *Stroke.* 2006 Feb;37(2):482-6.
274. Peretz A, Leotta DF, Sullivan JH, et al. Flow mediated dilation of the brachial artery: an investigation of methods requiring further standardization. *BMC Cardiovasc Disord.* 2007 Mar;7:11.
275. Grimm M, Han J, Weaver C, et al. Efficacy, safety, and tolerability of Exenatide once weekly in patients with type 2 diabetes mellitus an integrated analysis of the DURATION trials. *Postgraduate Medicine, Volume 125, Issue 3, May 2013.*
276. Henry RR, Klein EJ, Han J, et al. Efficacy and Tolerability of Exenatide Once Weekly Over 6 Years in Patients with Type 2 Diabetes: An Uncontrolled Open-Label Extension of the DURATION-1 Study. *Diabetes Technol Ther.* 2016 Nov;18(11):677-686.
277. Giorgino F, Natalicchio A, Leonardini A, et al. Exploiting the pleiotropic actions of GLP-1 for the management of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;78(Suppl): S59-67.
278. Sethi BK, Viswanathan V, Kumar A et al. Liraglutide in clinical practice: insights from LEAD programme. *Supplement to JAPI, June 2010, vol. 58.*
279. Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, et al. Exenatide (a GLP-1 agonist) improves the antioxidative potential of in vitro cultured human monocytes/macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015 Sep;388(9):905-19.
280. Scalzo RL, Moreau KL, Ozemek C, et al. Exenatide improves diastolic function and attenuates arterial stiffness but does not alter exercise capacity in individuals with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2017 Feb;31(2):449-455.

281. Vila Petroff MG, Egan JM, Wang X, et al. Glucagon-like peptide-1 increases cAMP but fails to augment contraction in adult rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 2001 Aug;89(5):445-52.
282. Luque MA, González N, Márquez L, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes. *J Endocrinol*. 2002 Jun;173(3):465-73.
283. Nikolaidis LA, Elahi D, Shen YT, et al. Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Dec;289(6):H2401-8.
284. Zhao T, Parikh P, Bhashyam S, et al. Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Jun;317(3):1106-13.
285. Timmers L, Henriques JP, de Kleijn DP, et al. Exenatide reduces infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Feb;53(6):501-10.
286. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01394952>.
287. Sahin Y, Unluhizarci K, Yilmazsoy A, et al. The effects of metformin on metabolic and cardiovascular risk factors in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Dec;67(6):904-8.
288. Katakami N, Yamasaki Y, Hayaishi-Okano R, et al. Metformin or gliclazide, rather than glibenclamide, attenuate progression of carotid intima-media thickness in subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2004 Nov;47(11):1906-13.
289. Esteghamati A, Ghasemiesfe M, Mousavizadeh M, et al. Pioglitazone and metformin are equally effective in reduction of chemerin in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*. 2014 May;5(3):327-32.
290. Lim SS, Norman RJ, Clifton PM, et al. The effect of comprehensive lifestyle intervention or metformin on obesity in young women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011 Apr;21(4):261-8.

291. Sena CM, Matafome P, Louro T, et al. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 2011 May;163(2):424-37.
292. Ke J, Liu Y, Yang J, et al. Synergistic effects of metformin with liraglutide against endothelial dysfunction through GLP-1 receptor and PKA signalling pathway. *Sci Rep*. 2017 Feb;7:41085.
293. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct;120(16):1640-5.
294. Riboli E, Kaaks R. The EPIC Project: rationale and study design. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *Int J Epidemiol*. 1997;26 Suppl 1:S6-14.
295. Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Jan;292(6512):13-5.
296. Soresi M, Giannitrapani L, Florena AM, et al. Reliability of the bright liver echo pattern in diagnosing steatosis in patients with cryptogenic and HCV-related hypertransaminasaemia. *Clin Radiol*. 2009 Dec;64(12):1181-7.
297. Armellini F, Zamboni M, Rigo L, et al. The contribution of sonography to the measurement of intra-abdominal fat. *J Clin Ultrasound*. 1990 Sep;18(7):563-7.
298. Suzuki R, Watanabe S, Hirai Y, et al. Abdominal wall fat index, estimated by ultrasonography, for assessment of the ratio of visceral fat to subcutaneous fat in the abdomen. *Am J Med*. 1993 Sep;95(3):309-14.
299. Ginter E, Simko V. Recent data on Mediterranean diet, cardiovascular disease, cancer, diabetes and life expectancy. *Bratisl Lek Listy*. 2015;116(6):346-8.
300. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, et al. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur J Cancer Prev*. 2013 Jan;22(1):90-5.

301. Cicero AFG, Colletti A, Bajraktari G, et al. Lipid lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel. *Arch Med Sci*. 2017 Aug;13(5):965-1005.
302. Covas MI, Konstantinidou V, Fito M. Olive oil and cardiovascular health. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009 Dec;54(6):477-82.
303. Masala G, Bendinelli B, Versari D, et al. Anthropometric and dietary determinants of blood pressure in over 7000 Mediterranean women: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Florence cohort. *J Hypertens*. 2008 Nov;26(11):2112-20.
304. Salvini S, Sera F, Caruso D, et al. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr*. 2006 Apr;95(4):742-51.
305. Violi F, Loffredo L, Pignatelli P, et al. Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. *Nutr Diabetes*. 2015 Jul;5:e172.
306. Aguilera CM, Ramirez-Tortosa MC, Mesa MD, Ramirez-Tortosa CL, Gil A. Sunflower, virgin-olive and fish oils differentially affect the progression of aortic lesions in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002 Jun;162(2):335-44.
307. Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev*. 2007 Dec;12(4):331-42.
308. Bendinelli B, Masala G, Saieva C, et al. Fruit, vegetables, and olive oil and risk of coronary heart disease in Italian women: the EPICOR Study. *Am J Clin Nutr*. 2011 Feb;93(2):275-83.
309. Carnevale R, Pignatelli P, Nocella C, et al. Extra virgin olive oil blunt post-prandial oxidative stress via NOX2 down-regulation. *Atherosclerosis*. 2014 Aug;235(2):649-58.
310. Salas-Salvado J, Bullo M, Estruch R, et al. Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2014 Jan;160(1):1-10.

311. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013 Apr;368(14):1279-90.
312. Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care*. 2005 Jul;28(7):1769-78.
313. Piers LS, Walker KZ, Stoney RM, et al. The influence of the type of dietary fat on postprandial fat oxidation rates: monounsaturated (olive oil) vs saturated fat (cream). *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Jun;26(6):814-21.
314. Rozati M, Barnett J, Wu D, et al. Cardio-metabolic and immunological impacts of extra virgin olive oil consumption in overweight and obese older adults: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)*. 2015 Aug;12:28.
315. Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006 Sep;145(5):333-41.
316. Cruz MA, Cruz JF, Macena LB, et al. Association of the Nonalcoholic Hepatic Steatosis and Its Degrees With the Values of Liver Enzymes and Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance Index. *Gastroenterology Res*. 2015 Oct;8(5):260-4.
317. Al-Seeni MN, El Rabey HA, Zamzami MA, et al. The hepatoprotective activity of olive oil and *Nigella sativa* oil against CCl₄ induced hepatotoxicity in male rats. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Nov;16(1):438.
318. Despres JP. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation*. 2012 Sep;126(10):1301-13.
319. Elnagar AY, Sylvester PW, El Sayed KA. (-)-Oleocanthal as a c-Met inhibitor for the control of metastatic breast and prostate cancers. *Planta Med*. 2011 Jul;77(10):1013-9.
320. Monti MC, Margarucci L, Tosco A, et al. New insights on the interaction mechanism between tau protein and oleocanthal, an extra-virgin olive-oil bioactive component. *Food Funct*. 2011 Jul;2(7):423-8.

321. Pitt J, Roth W, Lacor P, et al. Alzheimer's-associated Abeta oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Oct;240(2):189-97.
322. Garcia-Bonilla L, Benakis C, Moore J, et al. Immune mechanisms in cerebral ischemic tolerance. *Front Neurosci*. 2014 Mar;8:44.
323. Décary S, Dumont G, Lamarche B, Hogue JC, et al. Assessment of the validity of the frequently used lipid indices for predicting LDL peak particle diameter in a large cohort of 1955 normal and dyslipidemic subjects. *Clin Biochem*. 2010 Mar;43(4-5):401-6.
324. <http://www.polymed.it/diagnosi-cardiovascolare/sistema-lipoprint>
325. Padilla-Camberos E, Flores-Fernandez JM, Fernandez-Flores O, et al. Hypocholesterolemic Effect and In Vitro Pancreatic Lipase Inhibitory Activity of an *Opuntia ficus-indica* Extract. *Biomed Res Int*. 2015;2015:837452.
326. Galati EM, Mondello MR, Giuffrida D, et al. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *J Agric Food Chem*. 2003 Aug;51(17):4903-8.
327. Tesoriere L, Allegra M, Butera D, et al. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *Am J Clin Nutr*. 2004 Oct;80(4):941-5.
328. Bensadón S, Hervert-Hernández D, Sáyago-Ayerdi SG, et al. By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant Foods Hum Nutr*. 2010 Sep;65(3):210-6.
329. El Kossori RL, Villaume C, El Boustani E, et al. Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). *Plant Foods Hum Nutr*. 1998;52(3):263-70.
330. Ammar I, Ennouri M, Bouaziz M, et al. Phenolic Profiles, Phytochemicals and Mineral Content of Decoction and Infusion of *Opuntia ficus-indica* Flowers. *Plant Foods Hum Nutr*. 2015 Dec;70(4):388-94.

331. Osuna-Martínez U, Reyes-Esparza J, Rodríguez- Fragoso L. Cactus (*Opuntia ficus-indica*): a review on its antioxidants properties and potential pharmacological use in chronic diseases. *Nat Prod Chem Res.* 2014;2:6
332. Wolfram RM, Kritz H, Efthimiou Y, et al. Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose- and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia-- a pilot study. *Wien Klin Wochenschr.* 2002 Oct;114(19-20):840-6.
333. Garcia-Diez F, Garcia-Mediavilla V, Bayon JE, et al. Pectin feeding influences fecal bile acid excretion, hepatic bile acid and cholesterol synthesis and serum cholesterol in rats. *J Nutr.* 1996 Jul;126(7):1766-71.
334. Gunness P, Gidley MJ. Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food Funct.* 2010 Nov;1(2):149-55.
335. Tesoriere L, Butera D, Pintaudi AM, et al. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am J Clin Nutr.* 2004 Aug;80(2):391-5.
336. Garoby-Salom S, Guéraud F, Camaré C, et al. Dietary cladode powder from wild type and domesticated *Opuntia* species reduces atherogenesis in apoE knock-out mice. *J Physiol Biochem.* 2016 Mar;72(1):59-70.
337. Budinsky A, Wolfram R, Oguogho A, et al. Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2001 Jul;65(1):45-50.
338. Linares E, Thimonier C, Degre M. The effect of *NeOpuntia* on blood lipid parameters--risk factors for the metabolic syndrome (syndrome X). *Adv Ther.* 2007 Sep-Oct;24(5):1115-25.
339. Vachharajani V, Granger DN. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB Life.* 2009 Apr;61(4):424-30.
340. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, et al. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Aug;27(8):875-88.
341. Zoico E, Rossi A, Zamboni M. Adipochine e complicanze metaboliche dell'obesità. *Biochim Clin.* 2011;35:10-9.6

342. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004 Sep;92:347-55.
343. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112:1785-8.
344. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 1999 Dec;282:2131-5.
345. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, et al. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin- 6 the link? *Atherosclerosis.* 2000 Feb;148:209-14.20-22.

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo percorso vorrei ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione di questo progetto di ricerca.

Ringrazio il Prof. Giuseppe Montalto per avermi dato la possibilità di raggiungere questo importante traguardo accademico, trasmettendomi parte della sua esperienza clinica e scientifica nella gestione dei pazienti.

Ringrazio il Prof. Manfredi Rizzo, maestro di vita e di cultura scientifica, grazie al quale ho potuto apprendere il metodo scientifico, la passione per la ricerca e la forza di combattere per raggiungere gli obiettivi; lo ringrazio inoltre per la realizzazione di questo progetto di ricerca e per essersi sempre prodigato a far sì che potessi fare esperienze costruttive per la mia crescita come Dottore di Ricerca.

Un sentito ringraziamento va a tutti i componenti dell'Ambulatorio di Diabetologia e Prevenzione Cardiovascolare (Resp. Prof. Manfredi Rizzo) del Policlinico Universitario di Palermo, di cui faccio parte e con cui ho condiviso questa crescita umana, scientifica e professionale.

Devo altresì ringraziare il Dr. Melchiorre Cervello del Centro Nazionale delle Ricerche di Palermo ed il Prof. Giovanni Li Volti dell'Università degli Studi di Catania per la loro guida sapiente e per aver condotto parte degli esami previsti nel progetto di ricerca.

Ringrazio il Dr. Giuseppe Carruba dell'ARNAS Civico di Palermo e responsabile scientifico del Progetto DIMESA per l'ideazione di parte del progetto ed il Dr. Nicola Locorotondo del Laboratorio "Locorotondo" di Palermo per l'esecuzione degli esami ematochimici per il Progetto DIMESA.

Ringrazio Il Prof. Gianni Pantuso e tutto lo staff della U.O.C. di Chirurgia Oncologica del Policlinico Universitario di Palermo per la preziosa collaborazione.

Ringrazio la mia famiglia per non avermi mai fatto mancare il proprio sostegno morale e purtroppo spesso anche materiale e senza la quale nulla sarebbe stato possibile.

Un ringraziamento speciale va ad Enza, persona unica e speciale nella mia vita. Abbiamo affrontato insieme questo cammino, passo dopo passo, superando tutte le difficoltà, festeggiando insieme ogni vittoria e rialzandoci più forti di prima dopo ogni sconfitta. Grazie per essere stata sempre al mio fianco e per arricchire tutti i giorni della mia vita.

Infine desidero ringraziare tutti i pazienti ed i loro familiari per l'affetto e la fiducia incondizionata che mi hanno dimostrato durante lo svolgimento di questo progetto.