



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Medicina del benessere, nutrogenomica e malattie degenerative
Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S.)
MED/09 – Medicina Interna

EFFETTI DELLA DIETA MEDITERRANEA SUGLI INDICI DI DISFUNZIONE ENDOTELIALE, SULL'ESPRESSIONE SIERICA DEI MARKERS ADIPO-INFIAMMATORI E DEL PATTERN CERAMIDICO E SULLA MODULAZIONE EPIGENOMICA DEI POLIMORFISMI TARGET

IL DOTTORE
DR. FRANCESCA CORPORA

IL COORDINATORE
PROF. ANTONIO PINTO

IL TUTOR
PROF. ANTONINO TUTTOLOMONDO

CICLO XXXIII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2021

INDICE

CAPITOLO I	2
1.1 INTRODUZIONE	2
1.2 DIETA MEDITERRANEA E RISCHIO CARDIOVASCOLARE	6
1.3 DIETA MEDITERRANEA E INFIAMMAZIONE	9
1.4 DIETA MEDITERRANEA E STRESS OSSIDATIVO.....	10
1.5 DIETA MEDITERRANEA ED ATEROSCLEROSI	12
CAPITOLO II	15
DIETA MEDITERRANEA E DISFUNZIONE ENDOTELIALE	15
2.1 INTRODUZIONE	15
2.2 PATOGENESI DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE.....	16
2.3 DISFUNZIONE ENDOTELIALE E FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARI	19
2.5 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE COME FATTORE PROGNOSTICO.....	28
2.6 TRATTAMENTO DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE	30
CAPITOLO III	33
DIETA MEDITERRANEA E ADIPOCHINE INFIAMMATORIE	33
3.1 INTRODUZIONE	33
3.2 VISFATINA	34
3.3 RESISTINA	39
3.4 ADIPONECTINA.....	45
CAPITOLO IV	47
DIETA MEDITERRANEA E CERAMIDI	47
CAPITOLO V	52
RUOLO DELL’EPIGENETICA	52
5.1 RUOLO DELLA GENOMICA	52

5.2 RUOLO DELL'EPIGENETICA.....	54
CAPITOLO VI.....	57
EFFETTI DELLA DIETA MEDITERRANEA SUGLI INDICI DI DISFUNZIONE ENDOTELIALE, SULL'ESPRESSIONE SIERICA DEI MARKERS ADIPOINFIAMMATORI E DEL PATTERN CERAMIDICO E SULLA MODULAZIONE EPIGENOMICA DEI POLIMORFISMI TARGET.....	57
6.1 OBIETTIVI DEL PROGETTO DI RICERCA.....	57
6.2 MATERIALI E METODI.....	58
6.3 DEFINIZIONE DEI FATTORI DI RISCHIO	58
6.4 CRITERI DI ESCLUSIONE.....	59
6.5 VALUTAZIONE DELLA ADERENZA ALLA DIETA MEDITERRANEA.....	59
6.6 VALUTAZIONE NON INVASIVA DELLA FUNZIONE ENDOTELIALE MEDIANTE ENDOPAT-2000	60
6.7 RANDOMIZZAZIONE.....	64
6.8 ENDPOINT DEL PROGETTO DI RICERCA	64
6.9 VALUTAZIONE DI TIPO BIOCHIMICO	65
6.10 ANALISI GENETICA.....	65
6.11 RISULTATI	67
6.12 DISCUSSIONE.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	81

CAPITOLO I

1.1 INTRODUZIONE

«What is the Mediterranean Diet? One definition might be that it is what Mediterranean natives eat. But as we know and think of it now, it is a relatively new invention. Tomatoes, potatoes, and beans, for example, came from America long after Christopher Columbus discovered the New World. I noticed that the heart of what was considered the Mediterranean Diet is mainly vegetarian: pasta in many forms, leaves sprinkled with olive oil, all kinds of vegetables in season, and often cheese, all finished off with fruit, and frequently washed with wine» (Angel Keys, 1995)

Ancel Keys (1904 – 2004), fisiologo di fama internazionale, è stato il primo della storia, nonché il più noto in Italia, ad avere codificato la dieta mediterranea: *«How to Eat well and Stay Well: the Mediterranean Way»*, fu la famosa opera scritta nel 1975 dallo stesso Keys e dalla moglie Margaret.

Avendo notato come nell'Italia meridionale la frequenza della malattia coronarica fosse sorprendentemente bassa, Angel Keys progettò, in collaborazione con il padre della cardiologia modera, Paul White, uno studio epidemiologico sulla mortalità cardiovascolare in sette Paesi (Stati Uniti, Olanda, Finlandia, Italia, Grecia, Dalmazia, Giappone): il *Seven Country Study*. [1]. Vennero arruolati circa 12770 uomini, aventi un'età compresa tra i 40 e i 59 anni, provenienti dai sette Paesi sopra citati. In tutte le coorti risultò che il rischio dell'insorgenza di coronaropatia aumentava con l'età, la pressione sanguigna, le concentrazioni sieriche di colesterolo ed il fumo di sigaretta, ritenuti fattori di rischio universali. I confronti tra le varie coorti di soggetti afferenti allo studio rivelarono marcate differenze relativamente all'incidenza di coronaropatie, tuttavia l'unico fattore di rischio che sembrava avesse un ruolo statisticamente significativo era il colesterolo ematico. Il tasso di incidenza di gravi malattie cardiache tra gli uomini americani fu quasi il doppio di quello degli italiani, quattro volte quello dei greci, dei giapponesi e dei iugoslavi. La propensione agli eventi maggiori cardiovascolari dei finlandesi e degli olandesi risultò sovrapponibile a quella degli americani. Tale studio mostrò, dunque, come l'elevata frequenza di malattia coronarica fosse correlata, in buona misura, ad un'alimenta-

zione ricca in acidi grassi saturi e al corrispondente incremento della colesterolemia. La recente conoscenza delle complesse interazioni sinergiche tra nutrienti e altri costituenti alimentari ha portato ad un crescente interesse per gli schemi dietetici totali. Il concetto di "schema dietetico" è stato sviluppato per esprimere un'analisi sempre più ampia del consumo di alimenti e nutrienti. Tra la complessa rete di interazioni esistenti tra il genoma e i fattori epigenetici, l'applicazione di schemi dietetici potrebbe quindi offrire informazioni più utili sul rischio di sviluppare alcune patologie, in particolare malattie cardiovascolari o cerebrovascolari, rispetto al singolo alimento o nutriente. In relazione a ciò, diversi studi hanno indicato come i modelli dietetici ottenuti dall'analisi dei cluster nutrizionali siano stati in grado di prevedere il rischio di malattia o la mortalità [2] [3].

La dieta mediterranea è entrata a far parte del patrimonio culturale immateriale dell'UNESCO nel 2010 e, ad oggi, rappresenta un modello dietetico sano ben noto e ben studiato, la cui attuazione permette il controllo dei fattori di rischio cardiovascolare, quali ipercolesterolemia, diabete, ipertensione [4].

Tale schema dietetico enfatizza il consumo di frutta, ortaggi a radice, cereali (per lo più interi), legumi, noci, semi e olio extravergine d'oliva, i quali forniscono un notevole contenuto di acidi grassi monoinsaturi e una ridotta assunzione di acidi grassi saturi; tale schema dietetico è caratterizzato, inoltre, da una moderata assunzione di vino rosso durante i pasti, da una moderata assunzione di frutti di mare, pollame, latticini e basso consumo di carni rosse e dolci. Due aspetti tipici di uno stile di vita mediterraneo includono l'attività fisica quotidiana e un'adeguata idratazione [4] [5].

Sebbene il prototipo alimentare proposto della dieta mediterranea sia sempre lo stesso, vi sono delle lievi differenze tra i 16 Paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo (Figura 1). Ogni paese ha le sue abitudini alimentari influenzate da fattori socio-culturali, religiosi ed economici. Ad esempio il maiale, uno dei tipi più frequenti di carne consumata nei paesi europei del bacino del Mediterraneo [6], non viene mangiato nei paesi musulmani per motivi religiosi. Le bevande fermentate tipiche mediterranee, come il vino, sono escluse nei paesi musulmani, che hanno un consumo maggiore di tè e succhi di frutta. Anche il consumo di olio extravergine

d'oliva è differente, essendo minore nei paesi del Medio Oriente e del Nord Africa rispetto alla Spagna, all'Italia o alla Grecia.

Giant baked beans with spinach



Greek Salad



Braised peas and escarole



Spanish (Valentian) Paella



Palermitan pasta and "tenerumi"



Italian pasta and beans



Figura 1. Piatti tipici mediterranei.

La pasta, che è uno dei principali alimenti della dieta mediterranea, è più diffusa in Italia, dove è sempre presente nei pasti principali. Un altro alimento importante è il pane, che viene spesso servito dopo la pasta in Italia. I greci servono spesso una ciotola con olio d'oliva e pane.

Piatti misti di riso, verdure, carne, pollame o pesce sono combinazioni che distinguono la Spagna dalla Francia, dove questi alimenti vengono generalmente serviti singolarmente. La popolazione greca, invece, preferisce stufati di verdure e carne senza l'aggiunta di riso o patate, di solito serviti separatamente.

Le uova sono molto diffuse nei principali pasti spagnoli, una tradizione che li distingue dalle altre popolazioni mediterranee. In Francia, nella maggior parte dei casi, alimenti come il paté o altre salse lavorate vengono serviti all'inizio del pasto.

Le popolazioni greche e spagnole consumano entrambe meno formaggi rispetto alle altre due popolazioni mediterranee, tuttavia la quantità di feta presente nell'insalata verde, un piatto tipicamente greco che include anche olive e olio d'oliva, rende questo piatto un piatto unico.

Nelle popolazioni mediterranee, le insalate sono piatti molto comuni, abbastanza semplici perché non molto ricchi di ingredienti e spesso conditi con olio d'oliva e aceto. Un'abitudine tipica della Provenza e della Spagna è di servirli all'inizio del pasto prima del piatto principale, a differenza di altri paesi del Mediterraneo. Un'insalata comune, dallo stretto di Gibilterra alla Grecia orientale, è caratterizzata da qualsiasi tipo di lattuga condita con un po' di sale, qualche goccia di aceto e abbondante olio d'oliva [7].

Nonostante non sia un Paese che si affaccia sul bacino del Mediterraneo, in Portogallo la dieta mediterranea è parte integrante del patrimonio culturale della popolazione: ciò è principalmente dovuto alle influenze ancestrali dei vicini del Mediterraneo e dei migranti. La dieta portoghese è anche influenzata da fattori culturali, dal contesto socio-economico, dal background genetico e dalla maggiore disponibilità di pesci grazie alla sua ampia costa atlantica. Tuttavia, diversi fattori hanno contribuito ad allontanare la popolazione portoghese dalle tradizionali abitudini alimentari, ad esempio le politiche agricole dell'Unione Europea e la capacità finanziaria di offrire alimenti di qualità propri del territorio portoghese. Secondo recenti studi ecologici, negli ultimi decenni il Portogallo ha registrato una significativa riduzione dell'adesione alla dieta mediterranea. Una conseguenza di tale tendenza è l'inesorabile aumento dell'obesità, come è stato osservato nelle donne in età fertile e nelle donne in gravidanza [8].

I paesi nordafricani che si affacciano sul Mar Mediterraneo condividono le abitudini alimentari tipiche dei paesi del Mediterraneo europeo. Tali abitudini, tuttavia, sono influenzate da cambiamenti sociali ed economici. Nella popolazione marocchina è stato descritto un consumo maggiore di acqua in bottiglia, infusi e succhi di frutta [9].

La dieta mediterranea non deve essere intesa solo ed esclusivamente come uno schema dietetico fine a sé stesso, ma in senso più ampio come un *modus vivendi* che vede alla base della piramide le relazioni sociali, l'attività fisica e l'abolizione di qualsiasi forma di sedentarietà (Figura 2).

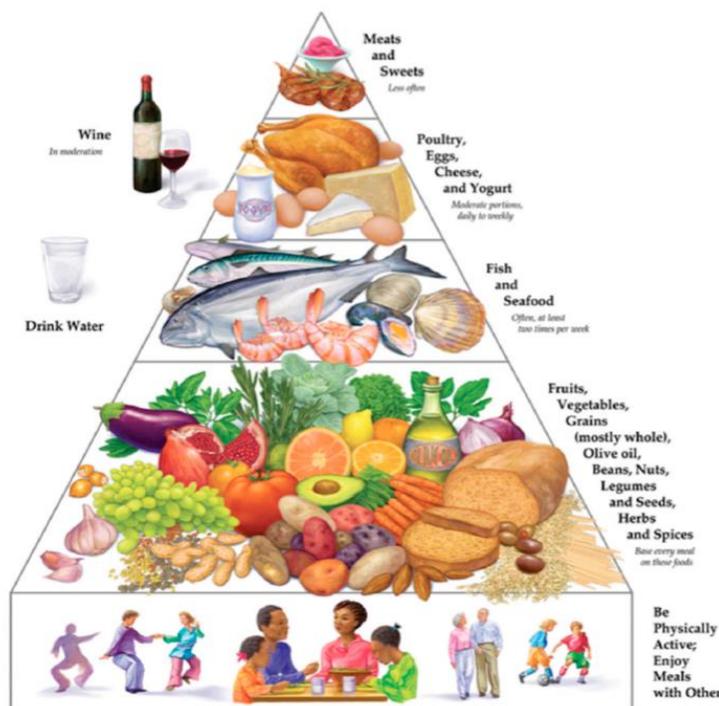


Figura 2. Piramide alimentare Dieta Mediterranea.

1.2 DIETA MEDITERRANEA E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte in Italia, essendo responsabili del 44% di tutti i decessi. In particolare la cardiopatia ischemica è la prima causa di morte nel nostro Paese, rendendo conto del 28% di tutte le morti, mentre gli accidenti cerebrovascolari sono al terzo posto con il 13%, dopo i tumori.

Chi sopravvive a un evento cardiovascolare maggiore diventa un malato cronico. La malattia modifica la qualità della vita e comporta notevoli costi economici. In Italia la prevalenza di cittadini affetti da invalidità cardiovascolare è pari al 4.4 per mille (dati Istat). Il 23.5% della spesa farmaceutica italiana, è destinata a farmaci per il sistema cardiovascolare [10].

L'analisi statistica, standardizzata per età e sesso, della distribuzione dei fattori di rischio e della frequenza delle condizioni a rischio ha permesso di valutare la prevalenza degli eventi cardiovascolari maggiori nel nostro Paese. La *Figura 3* mostra i dati ottenuti dall'Istituto Superiore di Sanità, Progetto Cuore, relativi al rischio

cardiovascolare globale assoluto diversificato per uomini e donne, in Italia dal 2008 al 2012. [11]

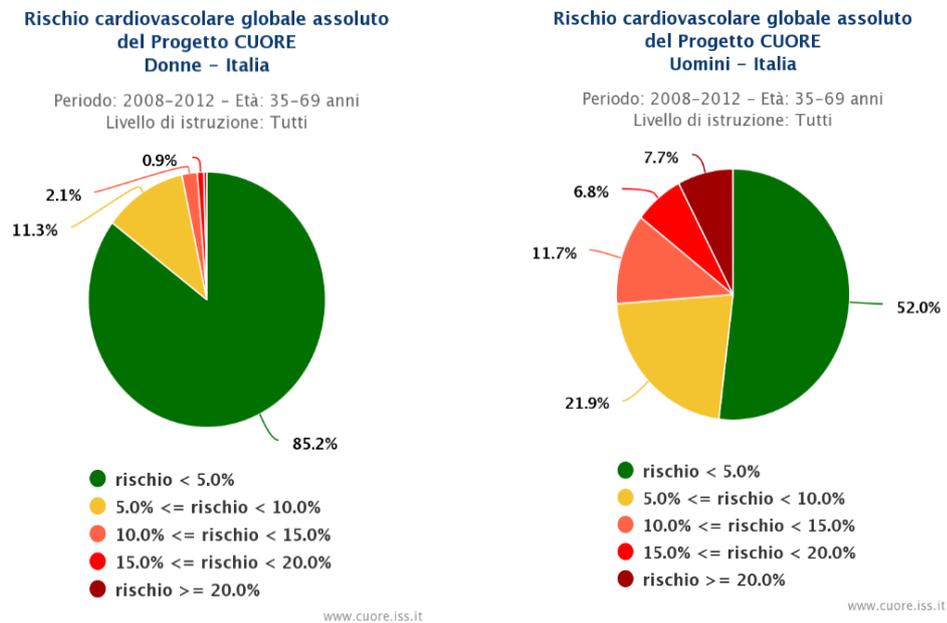


Figura 3. Rischio Cardiovascolare Globale Assoluto

Le Figura 4 e 5 mostrano la prevalenza, in Italia, dei principali fattori di rischio, diversificati per sesso. [11]

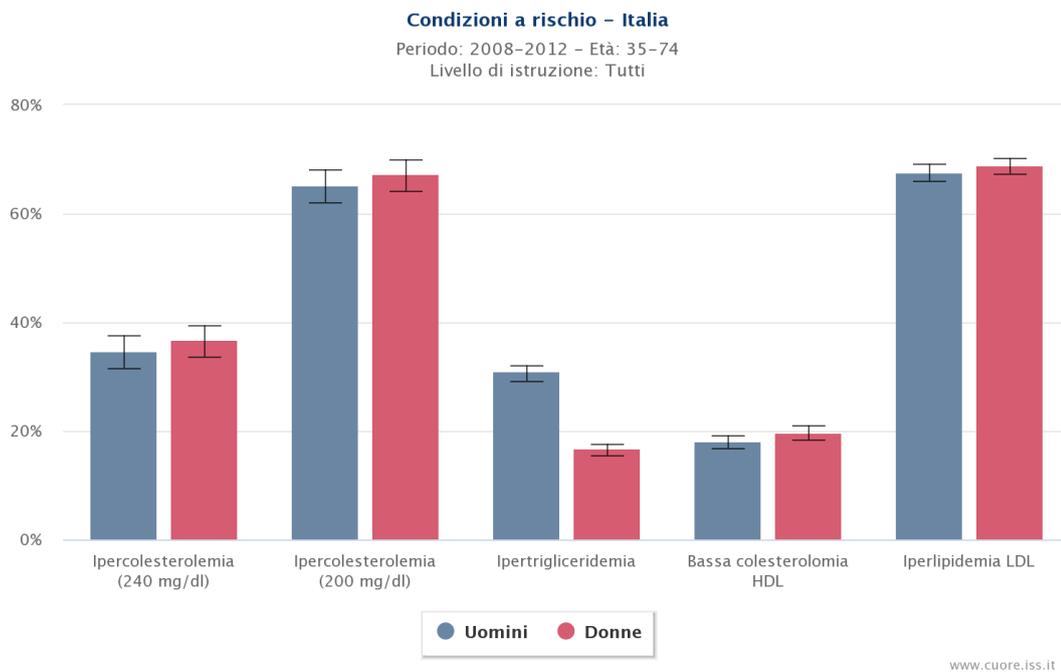


Figura 4. Prevalenza Fattori di Rischio.

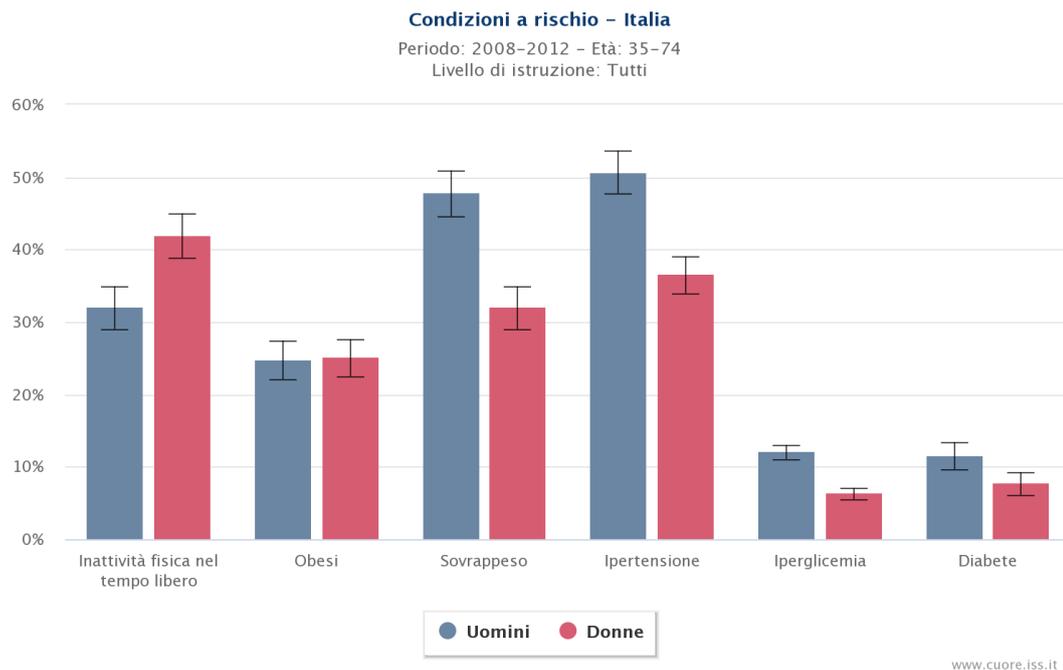


Figura 5. Prevalenza Fattori di Rischio.

Nel corso degli anni sono stati condotti numerosi studi volti a valutare gli effetti biologici della dieta mediterranea, alcuni dei quali hanno permesso di scoprire i meccanismi che potrebbero spiegare il suo ruolo potenzialmente benefico nella prevenzione delle malattie cardiovascolari.

In questo contesto, i meccanismi biomolecolari che sembrano promuovere gli effetti a lungo termine sulla salute determinati dalla dieta mediterranea sono i seguenti: effetto ipolipemizzante, protezione da stress ossidativo, dall'infiammazione e dall'aggregazione piastrinica, inibizione delle vie di sensibilizzazione dei nutrienti attraverso la specifica restrizione degli aminoacidi e la produzione di metaboliti intestinali mediati dal microbiota (aumento della stabilit  del genoma).

Le attuali conoscenze evidenziano il ruolo chiave della dieta mediterranea nella prevenzione delle malattie cardiovascolari. A questo proposito, negli ultimi decenni, diversi studi e alcuni trial randomizzati di intervento dietetico, come il *Lyon diet heart study*, hanno riportato gli effetti benefici dello stile mediterraneo sulla prevenzione secondaria delle malattie cardiovascolari.

Lo studio PREDIMED costituisce il primo trial randomizzato controllato e su larga scala che mostra l'impatto significativo della dieta mediterranea come strumento di prevenzione primario contro eventi cardiovascolari, quali ictus, fibrillazione atriale, malattia vascolare periferica e infarto del miocardio [12] [13].

Tale studio ha mostrato che l'adesione alla dieta mediterranea, supplementata con olio extravergine di oliva o noci, fosse associata ad una riduzione del 30% degli eventi cardiovascolari rispetto ai risultati ottenuti dall'analisi dei dati relativi al gruppo di controllo al quale era stata somministrata una dieta ipocalorica a basso contenuto di lipidi.[14].

1.3 DIETA MEDITERRANEA E INFIAMMAZIONE

L'infiammazione è un elemento cruciale nella patogenesi della disfunzione endoteliale e dell'aterosclerosi [15]. Gli elementi strettamente infiammatori, come le citochine e le molecole di adesione espresse a livello delle cellule endoteliali, così come i globuli bianchi, svolgono un ruolo importante sin dalle prime fasi dell'aterosclerosi, in quanto promuovono il richiamo delle cellule infiammatorie presenti nella circolazione, contribuendo così allo sviluppo della placca ateromatosa [16].

In questo contesto, sono stati condotti numerosi studi clinici ed epidemiologici che suggeriscono come il ruolo benefico della dieta mediterranea nel controllo dei principali fattori di rischio per lo sviluppo dell'arteriosclerosi possa essere spiegato in parte attraverso un effetto antinfiammatorio a livello endoteliale, come dimostrato da un miglioramento della funzione endoteliale associato ad una riduzione dello stato di infiammazione in seguito all'adozione di un modello dietetico mediterraneo [17] [18] [19] [20].

Risultati altrettanto importanti sono stati riportati da Estruch, che ha mostrato, in un sotto-studio dello studio PREDIMED [21], gli effetti della dieta mediterranea arricchita con olio di oliva vergine (VOO) o noci su 106 soggetti con un alto rischio cardiovascolare [18]. I risultati hanno suggerito che, contrariamente a quanto era evidente dopo l'adozione di una dieta a basso contenuto di grassi, la dieta mediterranea (MD) con integratore di VOO potrebbe svolgere il suo ruolo modificando i

livelli plasmatici di proteina C e della molecola di adesione cellulare vascolare solubile (VCAM-1), come mostrato dai risultati ottenuti. Inoltre, lo stesso autore ha mostrato che MD arricchito con VOO o noci era, in entrambe le situazioni, associato a una riduzione significativa, dopo tre mesi di osservazione, dei livelli plasmatici di IL-6, del ligando CD40, nonché dell'espressione di CD49d, una molecola di adesione che è espressa da cellule infiammatorie circolanti nel sangue periferico, che è essenziale per il loro reclutamento.

Altri studi sperimentali e clinici hanno riscontrato una riduzione nell'espressione cellulare di VCAM-1 e della molecola di adesione intercellulare-1 (ICAM-1) associata a una diminuzione dell'espressione di E-selectina da parte delle cellule endoteliali, conseguente al consumo di olio d'oliva [22]; risultati simili sono stati mostrati per la molecola 1 di adesione intercellulare solubile al plasma (sICAM-1), E-selectina, IL-6 e infine CRP [17] [19].

Come suggerito da Estruch, questi risultati supportano l'ipotesi che i benefici ottenuti dalla dieta mediterranea arricchita con VOO o noci siano in parte associati ai suoi effetti anti-infiammatori, come dimostrato dalla riduzione dei livelli di molecole infiammatorie cellulari e circolanti che hanno sempre giocato un ruolo chiave nello sviluppo di uno dei più importanti fattori di rischio, come l'aterosclerosi. Per tali motivazioni, i cambiamenti nello stile di vita che includono l'adozione di un modello dietetico, come il MD, possono svolgere un ruolo chiave nella prevenzione della CVD.

1.4 DIETA MEDITERRANEA E STRESS OSSIDATIVO

Nella patogenesi delle malattie cardiovascolari, lo stress ossidativo svolge un ruolo centrale, con la conseguente formazione di placche aterosclerotiche a causa dell'aumento delle concentrazioni di colesterolo LDL ossidato. Il basso apporto di antiossidanti nella dieta può aumentare indirettamente il rischio di malattie cardiache acute in persone apparentemente sane.

L'assunzione di β -carotene, vitamina C, vitamina E, folati naturali, flavonoidi e minerali (come il selenio), sembrerebbero contribuire alla riduzione di questo rischio [14].

Una significativa riduzione dei livelli sierici di colesterolo LDL ossidato e dei marker di infiammazione è stata ottenuta grazie alla dieta mediterranea, come mostrato da recenti trial clinici randomizzati [23] [24].

Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono entrambi punti cruciali nella patogenesi della disfunzione endoteliale, che contribuisce alla patogenesi dell'aterosclerosi. Gli acidi grassi Omega 3 esercitano il loro effetto antinfiammatorio legandosi al recettore accoppiato a proteine G e inibendo NLRP3 [25] [26].

Alcuni prodotti fitochimici contenuti nei cereali integrali e nell'olio extra vergine di oliva hanno un'azione antinfiammatoria. Molti fitoprotettori, come acido ferulico, lignani e acido fitico, sono contenuti nello strato aleuronico di crusca di frumento e hanno proprietà antiossidanti e antinfiammatorie [27] [28].

Il grano intero contiene una spermidina (poliammina) che sembra prolungare la vita delle cellule umane [29]. L'istone acetiltransferasi è inibito da questa poliammina e ciò provoca una riduzione dell'infiammazione, dei processi di necrosi cellulare tipici dell'invecchiamento e, infine, una maggiore resistenza allo stress ossidativo.

I composti antiossidanti sono ampiamente rappresentati negli alimenti mediterranei e sembrano mediare i principali effetti benefici della dieta mediterranea.

Altri meccanismi salienti attraverso i quali la dieta mediterranea esercita il suo ruolo centrale nel contesto della prevenzione cardiovascolare sono gli effetti antinfiammatori, la modifica del microbiota, la modulazione del gene e l'espressione proteica [4].

Lo studio condotto da Kouli GM et al. [30] ha mostrato che l'idrossitirosole esercita un meccanismo di riparazione sul danno ossidativo e determina un miglioramento dei valori di lipidi circolanti. Tale molecola è contenuta in frutta, noci, legumi e olio extravergine di oliva.

Alcuni ricercatori hanno osservato una riduzione dei livelli dell'8-idrossi-2-deossiguanosina circolante (8-OHdG) negli individui a dieta mediterranea rispetto a quelli a dieta ricca di SFA; questo studio di Urquiaga non ha permesso di definire l'esatto contributo di una moderata assunzione di vino rosso perché entrambe le

diete lo includono [31]. 8-OHdG è un nucleoside ossidato del DNA. È frequentemente rilevato nel DNA nucleare e mitocondriale; a seguito della riparazione del DNA, l'8-OHdG viene escreto nelle urine. Numerosi risultati hanno riportato che l'8-OHdG urinario non solo è un biomarcatore di stress ossidativo cellulare generalizzato, ma potrebbe anche essere considerato un fattore di rischio per l'aterosclerosi, il diabete e il cancro. Alcuni studi sull'uomo hanno descritto un aumento delle quantità di DNA modificato ossidativamente e 8-OHdG nelle placche aterosclerotiche umane. Elevati 8-OHdG urinari sono stati rilevati anche in pazienti diabetici con iperglicemia; inoltre, è stato osservato che le sue concentrazioni urinarie nel diabete erano correlate alla gravità delle complicanze diabetiche (nefropatia, retinopatia) [32].

1.5 DIETA MEDITERRANEA ED ATEROSCLEROSI

Le malattie cardiovascolari, che comprendono la malattia coronarica, le malattie cerebrovascolari, le malattie delle arterie periferiche e l'insufficienza cardiaca, costituiscono la principale causa di mortalità in tutto il mondo. L'aterosclerosi è la principale causa di malattie cardiovascolari, in particolare di coronaropatia e ictus; i suoi fattori di rischio includono fattori metabolici, predisposizione genetica, fattori ambientali e abitudini comportamentali [5]. L'aterosclerosi rappresenta la causa di quasi il 90% dei casi di sindrome coronarica acuta, il 60% degli ictus, la maggior parte dei casi di insufficienza cardiaca cronica, arteriopatia periferica e demenza vascolare.

L'ipercolesterolemia costituisce uno dei fattori di rischio fondamentali dell'aterosclerosi. Numerosi studi hanno riportato che una ridotta assunzione di grassi saturi è associata a livelli più bassi di colesterolo plasmatico e minore incidenza di malattia coronarica; questa relazione è stata osservata, in particolare, quando il grasso saturo è sostituito con grasso polinsaturo e monoinsaturo. La sostituzione del 5% dell'apporto energetico dato da acidi grassi saturi con la stessa quantità di energia data da grassi polinsaturi, grassi monoinsaturi o carboidrati da cereali integrali, è correlata rispettivamente al 25%, al 15% e al 9% di riduzione del rischio di coronaropatia; invece, la sostituzione di grassi saturi con carboidrati contenuti nei cereali raffinati è legata all'aumento del rischio di malattia coronarica. Queste osservazioni

sono state confermate da vari studi clinici controllati randomizzati che hanno mostrato una riduzione di circa il 30% dell'incidenza di malattie cardiovascolari quando la quota di acidi grassi saturi nella dieta viene sostituita con grassi polinsaturi vegetali. Questa riduzione percentuale è paragonabile a quella indotta dalla terapia con statine.

La tradizionale dieta mediterranea è caratterizzata da un basso consumo di carne, latte e burro, quindi l'assunzione di grassi saturi è quasi pari all'8% dell'apporto energetico richiesto, d'altra parte, una maggiore assunzione di grassi totali deriva da olio extra vergine di oliva, noci, semi, cereali integrali, che costituiscono dal 25% al 35% di calorie.

Studi prospettici hanno riportato che il consumo di cinque porzioni di frutta a guscio alla settimana determina una riduzione del 40-60% degli eventi di malattia coronarica. Un grande contributo nella riduzione del colesterolo LDL e del rischio cardiovascolare è dato dalle noci, in particolare mandorle, nocciole, noci e pinoli, che sono una ricca fonte di acidi grassi omega-6 e omega-3.

Un elevato apporto di fibre solubili in acqua, di cui una dieta mediterranea tradizionale è ricca e che si trovano in fagioli e frutta, è associato, come riportato in alcuni trial clinici randomizzati controllati, ad un rilevante abbassamento del colesterolo plasmatico; secondo alcune ipotesi la fibra solubile in acqua provoca un ridotto riassorbimento del colesterolo e degli acidi biliari nell'intestino tenue, portando ad un aumento dell'assorbimento di LDL da parte del fegato [33]. La dieta mediterranea tradizionale include una quantità bassa di acidi grassi trans parzialmente idrogenati coinvolti nella patogenesi della coronaropatia. La sostituzione in termini di calorie da grassi mono o polinsaturi con acidi grassi trans è associata ad un aumento dei livelli di colesterolo LDL, apolipoproteina B, trigliceridi, lipoproteine e livelli plasmatici ridotti di colesterolo HDL e apolipoproteina A 1.

Un recente studio condotto da Shafqat et al ha valutato gli effetti del modello dietetico mediterraneo su una popolazione di donne statunitensi sane con follow-up a lungo termine, in particolare sono stati analizzati 40 biomarcatori coinvolti nel metabolismo del glucosio, nel metabolismo lipidico, nell'infiammazione, negli ami-

noacidi a catena ramificata, e le apolipoproteine. Inoltre, gli autori miravano a caratterizzare nuovi fattori che avrebbero potuto contribuire alla relazione tra dieta mediterranea e riduzione del rischio negli eventi cardiovascolari; i risultati di questo studio supportano il ruolo preventivo della dieta mediterranea nell'ambito delle malattie cardiovascolari. Gli effetti positivi della dieta mediterranea descritti in tale studio potrebbero essere parzialmente spiegati da fattori di rischio tradizionali e nuovi fattori di rischio. Il principale contributo di questa riduzione è dovuto agli effetti sull'infiammazione, seguiti dagli effetti sul metabolismo del glucosio, sull'insulino-resistenza, sulla pressione sanguigna, sulla concentrazione di colesterolo HDL, sul metabolismo delle VLDL, sebbene sia stato riportato un contributo minore sulla dimensione e sulle particelle di LDL. Tuttavia, ulteriori fattori non valutati potrebbero partecipare a questa associazione [34].

Anche la formazione delle cellule schiumose, caratteristiche delle strie lipidiche (fatty streaks), è influenzata dalla dieta mediterranea. Florez et al. hanno condotto uno studio che ha mostrato come l'olio extra vergine di oliva ricco di acido linoleico abbia indotto una maggiore interiorizzazione del triacilglicerolo nei macrofagi del THP-1, rispetto all'olio extra vergine di oliva ricco di acido oleico [35]. I risultati ottenuti da questo studio hanno evidenziato che la diversa composizione di acidi grassi dell'olio extra vergine di oliva ha svolto un ruolo importante nella formazione delle cellule schiumose. In effetti, studi condotti sui macrofagi del THP-1 hanno dimostrato che gli acidi grassi ricchi di acido oleico hanno ridotto l'accumulo di lipidi nelle cellule dei macrofagi. Ciò sembrerebbe essere dovuto a una down-regolazione del recettore dell'apolipoproteina B48 [36]. D'altra parte, l'acido linoleico sembrerebbe stimolare il recettore CD36, portando ad un accumulo di triacilglicerolo nelle cellule [37]. CD36 è un importante recettore scavenger di macrofagi che lega il LDL ossidato [38]. La sovraregolazione del recettore CD36 sembra essere dovuta sia alla maggiore stimolazione dei meccanismi trascrizionali che post-trascrizionali. Inoltre, sembra che i PPAR svolgano un ruolo in questa eccessiva regolamentazione promuovendo la trascrizione di questo recettore, poiché gli acidi grassi sono ligandi di PPAR α e PPAR γ [39] [40]. Di conseguenza, l'espressione di questo recettore sembra avere un ruolo nella formazione di cellule espanse e acidi grassi determinerebbe la regolazione dell'espressione genica [37].

CAPITOLO II

DIETA MEDITERRANEA E DISFUNZIONE ENDOTELIALE

2.1 INTRODUZIONE

Fino a non molti anni fa l'endotelio era considerato un semplice rivestimento monocellulare che separava il sangue circolante dalla parete vascolare.

Le attuali conoscenze hanno riscoperto le diverse funzioni svolte dall'endotelio, dalla mitogenesi, all'angiogenesi, alla regolazione dell'infiammazione e dell'attivazione piastrinica.

Oggi infatti l'endotelio è considerato un organo autocrino-paracrino che gioca un ruolo chiave nella regolazione del tono e della struttura vascolare, agendo in risposta a stimoli umorali, nervosi e meccanici. In condizioni fisiologiche l'endotelio esercita un ruolo attivo nell'interscambio cellulare, essendo capace di adattarsi funzionalmente e strutturalmente alle variazioni del microambiente [41].

La più importante sostanza vasodilatatrice prodotta dalle cellule endoteliali è l'ossido nitrico (NO) che origina dal catabolismo della L-arginina ad opera di un enzima costitutivo chiamato NO-sintetasi (eNOS) [42].

Altre sostanze vasodilatatrici che contribuiscono allo svolgimento della funzione omeostatica dell'endotelio sono la prostaciclina, alcuni fattori iperpolarizzanti endoteliali e il peptide natriuretico di tipo C.

Il monossido d'azoto e le molecole d'adesione dell'endotelio, quali ICAM-1, VCAM-1 ed E-selectina sono considerati anche modulatori dell'infiammazione.

L'endotelio è anche in grado di produrre sostanze vasocostrittrici tra cui l'endotelina-1 (ET-1), che rappresenta il più potente vasocostrittore, l'angiotensina II, il trombossano A2 e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) [43] [44].

Altri fattori di produzione endoteliale implicati nel controllo dell'equilibrio omeostatico vasale sono i regolatori dell'emostasi tra cui l'attivatore del plasminogeno,

il tissue factor inhibitor, il fattore di Von Willebrand, NO, la prostaciclina, il trombossano A2, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1, il fibrinogeno.

La normale funzione fisiologica di regolatore omeostatico dell'endotelio dipende sia dalla continuità anatomica del monostrato cellulare ma soprattutto dalla sua integrità funzionale.

La disfunzione endoteliale è stata descritta per la prima volta nell'uomo nel 1990 a livello dell'arteria brachiale di soggetti ipertesi [45] [46] ed è stata successivamente associata al diabete di tipo 1 [47] [48], alla presenza di malattia coronarica [49] ed allo scompenso cardiaco [50], in particolare si è visto che la disfunzione endoteliale può precedere nel tempo le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi coronarica [51].

2.2 PATOGENESI DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE

La patogenesi della disfunzione endoteliale rappresenta un fenomeno complesso ed articolato, coinvolgente diversi meccanismi. Essa è caratterizzata dalla promozione sia dei meccanismi precoci che tardivi dell'aterosclerosi, includendo fra questi: l'up-regulation delle molecole di adesione dei leucociti, l'aumentata secrezione di chemochine come MCP-1 (macrophage chemoattractant peptide-1), l'aumento della permeabilità vasale, l'eccessiva ossidazione a carico delle LDL, l'accumulo di dimetilarginina asimmetrica, la notevole vasocostrizione, l'iperaggregazione piastrinica, la proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce.

Nel background della disfunzione endoteliale vi è dunque una ridotta produzione o biodisponibilità di NO, associata a una sperequazione fra sostanze con azione vasodilatante e vasocostrittrice secrete dall'endotelio, che conduce a un eccesso ossidativo e un'aumentata azione svolta dall'ET-1 [52]. In presenza di fattori di rischio cardiovascolare, il ruolo protettivo dell'endotelio sembra alterarsi, configurando il quadro della cosiddetta disfunzione endoteliale, caratterizzata da una compromissione della risposta vasomotoria ai principali stimoli vasodilatatori endotelio-dipendenti e da un'attività pro-flogistica e pro-coagulante dell'endotelio. Quando i fattori di rischio sono trattati, la disfunzione endoteliale regredisce ed essa rappresenta un fattore indipendente predittivo di eventi cardiovascolari.

Sia i fattori di rischio scoperti più recentemente, ma anche quelli più tradizionali tra cui fumo, età, ipercolesterolemia, ipertensione, iperglicemia e una storia familiare di precoce malattia aterosclerotica sono tutti associati ad alterazione della funzione endoteliale [53] [54] [55].

L'NO è una delle sostanze più importanti prodotte dall'endotelio; è un potente vasodilatatore, un inibitore della crescita cellulare e dell'infiammazione, ha effetti antiaggreganti sulle piastrine, per cui risulta la molecola chiave della normale funzione endoteliale. Una ridotta disponibilità di NO è stata descritta in presenza di disfunzione endoteliale ed è stata associata ad una diminuita attività dell'isoforma endoteliale della NO-sintetasi (eNOS), enzima in grado di ottenere NO a partire dall'L-arginina, per ossidazione del suo nitrogruppo terminale guanidinico.

La eNOS è in grado di sintetizzare grandi quantità di NO in pochi secondi, in risposta ad agonisti recettoriali quali l'acetilcolina, la bradichinina, la sostanza P, la serotonina e altre sostanze che agiscono su recettori specifici, oppure in risposta allo shear stress di parete che attiva rapidamente i canali ionici del potassio calcio-dipendenti presenti sulla superficie endoteliale e sensibili alla forza tangenziale del flusso ematico sulla parete vasale ad azione agonista sull'endotelio. Il NO diffonde quindi rapidamente verso le sottostanti cellule muscolari lisce determinando rilassamento attraverso l'aumento intracellulare di cGMP e la conseguente riduzione del calcio intracellulare. L'endotelio produce anche altre sostanze vasodilatrici, quali la prostaciclina (che però è una sostanza non prodotta in modo specifico dalle cellule endoteliali) e un fattore iperpolarizzante (EDHF). Quest'ultima sostanza sembra rappresentare un meccanismo vasodilatante di compenso ad una ridotta bio-disponibilità di NO [56].

Un recente e affascinante meccanismo che potrebbe spiegare la riduzione di NO è l'accumulo di dimetilarginina asimmetrica (ADMA), un inibitore endogeno competitivo di eNOS che è stato recentemente collegato alla disfunzione endoteliale. È stato constatato che l'accumulo di questo inibitore endogeno porta a una riduzione effettiva del flusso glomerulare e ad un'umentata resistenza renovascolare con aumento dei valori tensivi [57]. L'ADMA è un prodotto che deriva dal turnover proteico ed è eliminata attraverso l'escrezione renale o il metabolismo della citrullina,

mediante l'enzima dimetilarginina dimetilaminoidrolasi (DDAH). Recentemente, l'overespressione di DDAH in topi transgenici ha mostrato che esso diminuiva i livelli sierici di ADMA, aumentava l'attività eNOS, e riduceva la pressione sanguigna [58]. L'attenzione si sta focalizzando non soltanto sulla eliminazione, ma anche sulla produzione di ADMA; infatti, si è osservato che la proteina arginina metiltransferasi 1, che produce arginina metilata, ha dimostrato essere up-regolata dallo shear stress, e questa upregulation è stata associata a una marcata produzione di ADMA [59].

Altri studi sono concordi nel dimostrare che l'omocisteina riduce la biodisponibilità di NO, infatti ci sono numerose evidenze che l'omocisteina può causare un accumulo di ADMA attraverso l'inibizione dell'enzima DDAH. Queste alterazioni potrebbero spiegare la presenza di disfunzione endoteliale e di un aumento del rischio cardiovascolare nei pazienti con iperomocistinemia.

Un ruolo preminente nella disfunzione endoteliale va assegnato all'inattivazione dell'NO da parte dei radicali liberi dell'ossigeno. Le specie reattive dell'ossigeno reagiscono con l'NO producendo perossinitriti, molecole cito-ossidanti, che, tramite la nitratura delle proteine cellulari endoteliali, ne alterano la funzione.

I perossinitriti sono anche coinvolti nell'ossidazione delle LDL, che aumentano così il loro effetto pro-aterogeno [60] e riducono a loro volta la biodisponibilità di NO, inibendone la via biosintetica tramite una alterazione della conformazione dei recettori Gi-dipendenti, con conseguente mancata attivazione della eNOS, oppure inattivando direttamente lo NO per un eccesso di anione superossido. In modelli animali di ipertensione, un eccesso ossidativo caratterizzato da produzione di elevate quantità di radicali liberi sotto forma di anione superossido, perossido di idrogeno e radicale ossidrilico, è associato a disfunzione endoteliale, come dimostrato da un miglioramento della vasodilatazione endotelio-dipendente dopo l'uso di antiossidanti [61].

L'eccesso ossidativo si associa, inoltre, ad aumento dei processi infiammatori e della formazione di trombi e la sua entità correla con il grado di riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente e con lo sviluppo di eventi cardiovascolari [62].

Lo stress ossidativo aumenta la permeabilità vascolare e promuove l'adesione leucocitaria, che è associata ad alterazioni nella trasduzione del segnale endoteliale e dei fattori che regolano la trascrizione [63].

L'endotelina -1 è la più potente sostanza vasocostrittrice di produzione endoteliale ed agisce su recettori specifici denominati ETA ed ETB. I recettori ETA sono presenti solo sulle cellule muscolari lisce e causano vasocostrizione e crescita cellulare, mentre i recettori ETB sono presenti sia sulle cellule muscolari lisce, dove inducono vasocostrizione, che sull'endotelio, dove determinano dilatazione stimolando la produzione di NO, che agisce da feedback negativo inibendo l'ulteriore produzione di ET-1. In caso di ridotta biodisponibilità di NO, questo meccanismo di feedback negativo è compromesso e, di conseguenza, diviene preponderante l'effetto vasocostrittore di ET-1.

2.3 DISFUNZIONE ENDOTELIALE E FATTORI DI RISCHIO CARDIO-VASCOLARI

2.3.1 LE BASI MOLECOLARI DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE NEL DIABETE

L'iperglicemia può causare cambiamenti nello stato redox intracellulare dovuti all'esaurimento del pool di NADPH cellulare. L'iperglicemia cronica è causa di glicazione non enzimatica delle proteine e delle macromolecole per cui il diabete è caratterizzato da una maggiore tendenza allo stress ossidativo e ad alti livelli di lipoproteine ossidate, in particolare LDL. Gli alti livelli di acidi grassi e l'iperglicemia sono corresponsabili di un aumento del livello di ossidazione dei fosfolipidi e delle proteine; ciò è associato a un'umentata tendenza protrombotica nonché un'umentata aggregabilità piastrinica. Numerosi studi prospettici, che hanno valutato la disfunzione endoteliale nei pazienti diabetici, indicano che essa è strettamente associata alla microangiopatia e alla malattia aterosclerotica [64].

2.3.2 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE NEI PAZIENTI CON DIABETE INSULINO-DIPENDENTE

L'associazione tra il diabete e disfunzione endoteliale è particolarmente evidente nei pazienti con diabete di tipo 1 che hanno nefropatia di lieve entità (microalbuminuria) o modesta-severa (macroalbuminuria). Una grande varietà di marcatori indicano disfunzione endoteliale: scarsa vasodilatazione dipendente dalle cellule endoteliali e aumento dei livelli ematici di fattore di von Willebrand (vWF), trombomodulina, selectina, inibitore dell'attivatore del plasminogeno, collagene di tipo IV, e attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) sono stati dimostrati in questa popolazione di pazienti [65] [66] [67].

2.3.3 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE NEI PAZIENTI CON DIABETE NON INSULINO-DIPENDENTE

Il ruolo della disfunzione endoteliale nel diabete di tipo 2 è più complicato rispetto a quello svolto nel diabete di tipo 1. Gli effetti dell'invecchiamento, la dislipidemia, l'ipertensione, ed altri fattori aumentano la complessità del problema. Contrariamente al diabete di tipo 1, la disfunzione endoteliale qui può verificarsi anche quando i pazienti hanno normale escrezione urinaria di albumina [68] [69].

Ci sono sempre più evidenze che suggeriscono la coesistenza di insulino-resistenza e disfunzione endoteliale. La vasodilatazione indotta dall'insulina, che è parzialmente MEDIATA dal rilascio di NO, è ridotta in individui obesi che non hanno il diabete di tipo 2, ma che mostrano resistenza all'insulina [70] [71].

Inoltre, l'obesità, che rappresenta il modello di insulino-resistenza umana, è associata ad alti livelli di endotelina-1 nel plasma. Le risposte all'acetilcolina hanno dimostrato determinare vasodilatazioni di entità ridotta in individui sani normoglicemici con una storia di diabete di tipo 2 in uno o entrambi i genitori (parenti), in soggetti con alterata tolleranza al glucosio, e nei pazienti con diabete di tipo 2 senza complicanze vascolari. I livelli plasmatici di endotelina-1 erano significativamente più alti in questi tre gruppi. Questi risultati suggeriscono che le anomalie nella reattività vascolare e le alterazioni legate ai marcatori biochimici di attivazione delle cellule endoteliali sono presenti precocemente in individui a rischio di sviluppare il diabete di tipo 2 [72].

2.3.4 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE NELL'IPERTESO

La presenza di disfunzione endoteliale è stata documentata sia nell'avambraccio che nelle coronarie dei pazienti con ipertensione essenziale. Si è osservato che le risposte all'acetilcolina e all'adenosina erano significativamente ridotte nei pazienti con ipertrofia ventricolare sinistra (LVH) [73], dimostrando che la vasodilatazione endotelio e non endotelio-dipendente era insufficiente nei pazienti con ipertensione e ipertrofia ventricolare sinistra. È stato dimostrato che vi è una compromissione della vasodilatazione endotelio-dipendente (EDV) nei pazienti con ipertensione renovascolare o con iperaldosteronismo primitivo e che vi è un meccanismo vasocostrittore ciclo-ossigenasi dipendente responsabile della ridotta risposta agli stimoli vasodilatatori endoteliali nei pazienti con ipertensione essenziale [74].

2.3.5 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE E L'INVECCHIAMENTO

Le cellule endoteliali hanno una vita limitata quando coltivate in vitro e con il tempo entrano in una fase di arresto della crescita irreversibile chiamata "senescenza cellulare". Recentemente, cellule endoteliali senescenti sono state individuate in lesioni aterosclerotiche umane, ma non nelle lesioni non aterosclerotiche. Queste cellule esprimono un aumento dei livelli di molecole pro-infiammatorie e una diminuzione dei livelli di eNOS, suggerendo che la senescenza cellulare in vivo contribuisce alla patogenesi dell'aterosclerosi umana [75]. Una teoria ampiamente discussa sulla senescenza è l'ipotesi dei telomeri: l'inizio del malfunzionamento dei telomeri legato a un loro progressivo accorciamento ha dimostrato condurre a disfunzioni vascolari proaterogenetiche, tenendo conto che al contrario il loro allungamento estende la vita delle cellule e protegge dalla disfunzione endoteliale associata alla senescenza. Prove più recenti suggeriscono che anche meccanismi telomero-indipendenti sono implicati nella senescenza cellulare, per esempio l'attivazione di Ras, un importante molecola di segnalazione coinvolta in stimoli che promuovono l'aterogenesi, induce senescenza delle cellule vascolari e, quindi, promuove la vasculite in vitro e in vivo [76].

Le prove presentate sembrano suggerire, inoltre, che l'invecchiamento è associato a disfunzione endoteliale e ridotta elasticità delle arterie; infatti sembra che l'elasticità arteriosa ridotta può essere utilizzata come misura non invasiva per la determinazione della funzione endoteliale. Un altro studio ha concluso che vi è una risposta

ridotta all'acetilcolina con l'avanzare dell'età in entrambi i controlli normotesi ed in pazienti ipertesi essenziali, ciò suggerisce che l'invecchiamento è associato ad una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente [77].

2.3.6 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE E L'IPERCOLESTEROLEMIA

L'ipercolesterolemia e gli alti livelli di colesterolo totale e di lipoproteine a bassa densità (LDL) determinano un'alterata funzione endoteliale sia nella circolazione periferica che in quella coronarica. Studi hanno concluso che i livelli di colesterolo, anche nel range di normalità possono essere inversamente proporzionali alla vasodilatazione endotelio-dipendente, e questo risultato ha importanti implicazioni cliniche. Ciò suggerisce che l'abbassamento dei livelli di colesterolo anche quando essi sono all'interno del range di normalità può migliorare la produzione e il rilascio di NO e quindi migliorare la funzione endoteliale [78]. Questa idea è supportata da recenti evidenze: abbassando i livelli di colesterolo vi è un'aumentata vasodilatazione endotelio-dipendente, non solo nei soggetti con livelli di colesterolo elevati in maniera massiccia, ma anche in quelli con livelli di colesterolo normali. Vale la pena notare che l'abbassamento dei livelli di colesterolo medi nei pazienti con documentata malattia coronarica porta ad una diminuzione dei tassi di infarto del miocardio, e questo effetto protettivo può essere in parte dovuto al miglioramento della funzione endoteliale [79].

2.3.7 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE E L'OBESITÀ

Numerose evidenze sperimentali nell'uomo dimostrano che l'obesità è caratterizzata da disfunzione endoteliale [80]. L'obesità può indurre disfunzione endoteliale con meccanismi indiretti attraverso le condizioni patologiche frequentemente associate ad essa, come l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito e la dislipidemia, l'insulino resistenza, tutte condizioni caratterizzate di per sé da una ridotta funzione endoteliale. Meccanismi diretti sono rappresentati da ormoni, citochine e prodotti del metabolismo dei lipidi. Le adipochine prodotte dagli adipociti potrebbero essere direttamente responsabili della disfunzione endoteliale associata all'obesità. Le principali adipochine coinvolte sono la leptina, la resistina e l'adiponectina.

La leptina è una proteina prodotta dagli adipociti e rilasciata nel torrente circolatorio in maniera direttamente proporzionale al volume di tessuto adiposo. A livello del sistema nervoso centrale la leptina svolge numerose azioni quali l'induzione della perdita di peso attraverso la riduzione del senso dell'appetito (iporessia) e l'incremento della spesa energetica. Il ruolo della leptina sulla funzione endoteliale, sebbene recentemente ipotizzato, non è ancora definitivamente chiarito ed i risultati sono discordanti. Infatti, alcuni studi in vitro hanno dimostrato che la leptina induce un aumento dello stress ossidativo a livello delle cellule endoteliali [81]. Inoltre, è stato anche osservato che la leptina sarebbe in grado di stimolare la secrezione di numerose citochine proinfiammatorie, quali il fattore di necrosi tumorale (TNF- α) e l'interleuchina (IL-6), le quali, a loro volta, inducono disfunzione endoteliale.

La resistina è un'adipochina prodotta durante l'adipogenesi e inibisce l'uptake di glucosio nelle cellule muscolari scheletriche. È stato dimostrato che nelle cellule endoteliali incubate con la resistina ricombinante umana si ha un'aumentata produzione di endotelina-1 ed espressione di molecole di adesione VCAM-1 e MCP-1 [82].

Decisamente più consistenti sono i dati relativi al ruolo dell'adiponectina sulla parete vascolare. Questa adipochina, specificamente espressa negli adipociti differenziati, svolge un'azione antagonista nei riguardi delle altre succitate molecole. L'adiponectina stimola la sensibilità insulinica favorendo la traduzione del segnale intracellulare per l'insulina. Studi sperimentali hanno dimostrato che l'adiponectina stimola la produzione di NO attraverso un processo di fosforilazione dell'enzima NOS endoteliale [83]. A conferma di ciò, a livello del microcircolo dell'avambraccio di pazienti ipertesi è stata osservata una significativa correlazione diretta tra i livelli plasmatici di adiponectina e vasodilatazione endotelio-dipendente. Questa adipochina, inoltre, inibisce l'adesione monocitaria riducendo l'espressione delle molecole di adesione sulla parete vascolare, inibisce la trasformazione macrofagica e riduce la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce. Questi risultati indicano le importanti proprietà antiaterosclerotiche e protettive della parete vascolare svolte da questa adipochina. Poiché nell'obesità/insulino-resistenza la produzione e l'attività dell'adiponectina sono notevolmente ridotte, è intuitivo comprendere come in queste condizioni si osservi uno sbilanciamento dei meccanismi che

regolano l'omeostasi vascolare a favore di tutti quei fattori che favoriscono e promuovono la disfunzione endoteliale e, quindi, il processo aterosclerotico. Tra i meccanismi responsabili di tale alterazione, il principale sembra essere la produzione di stress ossidativo, il quale a sua volta, come è noto, riduce la biodisponibilità di NO. In particolare, il TNF è in grado di indurre la produzione di stress ossidativo sia attraverso l'attivazione dell'enzima NADPH ossidasi, una delle principali fonti di radicali liberi dell'ossigeno, che attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B. L'IL-6 è l'altra citochina proinfiammatoria associata all'obesità e alla quale è stato attribuito un effetto negativo sulla funzione endoteliale. Infatti, questa citochina è in grado di aumentare la produzione di stress ossidativo attraverso l'attivazione di due importanti fonti, quali la xantina ossidasi e l'NADPH ossidasi. Inoltre, le elevate concentrazioni plasmatiche di IL-6 sono in grado di stimolare la sintesi epatica della proteina C reattiva, la quale a sua volta induce disfunzione endoteliale riducendo l'espressione dell'enzima NOS endoteliale e quindi la produzione di NO. Un altro importante fattore che può contribuire alla disfunzione endoteliale associata all'obesità e all'insulino-resistenza è rappresentato dagli acidi grassi liberi (FFA). Studi sperimentali hanno dimostrato che l'aumentato turnover degli FFA che si riscontra nell'obesità stimola la produzione di stress ossidativo a causa dell'inibizione a livello mitocondriale della traslocazione di adenosina con conseguente sovrapproduzione di radicali liberi dell'ossigeno come il superossido, riducendo la biodisponibilità di NO [84].

2.3.8 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE E IL FUMO DI SIGARETTA

Il fumo determina disfunzione endoteliale e il fumo passivo è associato a riduzione dose-dipendente della dilatazione endotelio-dipendente in giovani adulti sani. La dilatazione flusso-mediata è significativamente compromessa nei fumatori sia passivi che attivi rispetto ai non fumatori. Nei fumatori passivi, vi è una relazione inversa tra l'intensità di esposizione al fumo di tabacco e la dilatazione flusso-mediata. Il fumo di sigaretta è associato ad un aumento della formazione di trombi piastrinici. Piccole aree di denudazione e deposizione di trombi sono comunemente riscontrati sulla superficie delle placche ateromatose a carattere solitamente subclinico. In presenza di uno squilibrio nei sistemi di coagulazione o fibrinolitici, tali microtrombi possono propagarsi, portando in definitiva a occlusione arteriosa [85].

2.4 LA VALUTAZIONE DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Il parametro tradizionalmente usato per misurare il grado di funzione dell'endotelio è la capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente, ovvero indotta da agonisti (acetilcolina, bradichinina o lo shear stress sulla parete vasale durante flusso iperemico) che stimolano la produzione endoteliale di sostanze vasodilatatrici. I primi studi eseguiti a livello del circolo coronarico hanno utilizzato l'infusione di acetilcolina durante coronarografia. La modificazione del diametro vascolare durante infusione intracoronarica di acetilcolina, misurata con angiografia quantitativa, è stata utilizzata come indice di produzione locale di NO. È stato dimostrato che l'acetilcolina induce una vasodilatazione nelle arterie coronariche epicardiche normali, mentre è possibile osservare una vasocostrizione paradossa nelle arterie con disfunzione endoteliale [41].

Oggi è possibile utilizzare, sempre durante studio coronarografico, sostanze vasodilatatrici quali la papaverina che permettono di misurare la dilatazione coronarica dovuta allo shear stress indotto dal farmaco. È, inoltre, possibile quantificare l'entità della risposta ai mediatori sin qui esposti, oltre che con l'angiografia quantitativa, anche mediante tecniche più sensibili quali l'ultrasonografia ed il doppler intracoronarico. L'impiego di queste tecniche, sebbene valido in quanto utilizza agonisti endoteliali selettivi e modulabili, presenta tuttavia limitazioni dovute all'invasività della tecnica; la loro applicazione è ristretta ai pazienti che hanno una indicazione clinica alla esecuzione di una coronarografia e, pertanto, sono state sviluppate metodiche per valutare la vasodilatazione endotelio-dipendente in altri distretti vascolari ed in modo meno invasivo. La pletismografia venosa viene utilizzata per valutare le variazioni di flusso a livello dell'avambraccio in risposta all'infusione diretta – mediante incannulazione dell'arteria brachiale – di sostanze vasodilatatrici ad azione endotelio-dipendente, quali l'acetilcolina, la sostanza P o la bradichinina. La metodica attualmente più utilizzata, poiché non invasiva, è quella dello studio della dilatazione flussomediata (FMD); tale metodica sfrutta l'aumento della forza tangenziale sulla parete vascolare in corso di iperemia (shear stress), che determina rilascio endoteliale di NO e conseguente vasodilatazione [86]. La tecnica prevede la visualizzazione dell'arteria brachiale in un tratto rettilineo del vaso circa 2 cm al di sopra della piega del gomito mediante ultrasonografia, con una sonda vascolare

di 7,5 MHz; la misura del diametro vasale viene eseguita in condizioni di base e dopo un minuto di flusso iperemico, al picco della vasodilatazione mediata dallo shear stress. L'iperemia viene indotta tramite occlusione meccanica dell'arteria brachiale mediante gonfiaggio di un manometro a pressioni maggiori di quelle arteriose sistemiche e successivo rilascio, dopo cinque minuti di collasso del vaso. L'esame viene svolto in regime ambulatoriale, con controllo della temperatura ambientale e dello stress emotivo del paziente.

Vengono sospesi per almeno 48 ore prima del test tutti i farmaci vasoattivi, l'assunzione di caffeina ed il fumo di sigaretta, che possono inficiare la risposta del vaso allo stimolo. I maggiori vantaggi di questa tecnica consistono nella non invasività, nella facile riproducibilità e ripetibilità del test, nel basso costo e nel minor rischio rispetto ad uno studio invasivo angiografico selettivo. È stata dimostrata una buona correlazione tra la funzione endoteliale studiata a livello periferico con la FMD e quella misurata invasivamente a livello coronarico durante coronarografia [87], ciò ha permesso l'applicazione estensiva dello studio della funzione endoteliale mediante FMD in pazienti affetti da aterosclerosi coronarica o con fattori di rischio cardiovascolare. Poiché la presenza di disfunzione endoteliale correla con lo stato infiammatorio delle pareti arteriose, sono marker di disfunzione endoteliale anche le forme solubili di mediatori dell'infiammazione, quali ICAM-1, VCAM-1 ed E-selectina, che possono essere dosate a livello plasmatico. In caso di alterata funzione endoteliale, è possibile caratterizzare i meccanismi implicati in tale disfunzione valutando sia la via L-arginina-NO mediante la sua inibizione con la NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), un antagonista selettivo per l'enzima NOS, ed attivazione con la L-arginina (il substrato per l'enzima NOS), mentre per valutare la presenza di stress ossidativo, si può utilizzare la vitamina C, un potente antiossidante.

Tuttavia, la misurazione della FMD ha anche dimostrato numerose problematiche per la stratificazione del rischio negli individui. Il metodo è tecnicamente impegnativo, richiede una formazione specifica e inoltre, la FMD è molto sensibile a tutta una serie di fattori che possono influenzare la funzione endoteliale transitoriamente, ma non possono avere una grande importanza per il rischio di aterosclerosi a lungo termine. Ad esempio, la FMD può essere acutamente abbassata da una malattia virale intercorrente, può essere transitoriamente ridotta dopo un pasto, e varia con il

ritmo circadiano. Per questo motivo un certo numero di nuove tecniche sono state recentemente proposte come strumenti di screening potenzialmente applicabili per la valutazione della disfunzione endoteliale negli esseri umani. Ogni nuovo test proposto deve rispondere a vari criteri, se deve essere utile per valutare il rischio cardiovascolare in soggetti individuali. Il test dovrebbe:

- essere semplice, non invasivo e applicabile a gran parte della popolazione;
- essere riproducibile
- essere operatore indipendente;
- essere standardizzabile tra laboratori;
- essere in grado di predire il rischio;
- essere in grado di dimostrare che il miglioramento con il nuovo test predice una riduzione conseguente del rischio cardiovascolare.

I candidati per i test vascolari non invasivi proposti negli ultimi anni includono l'analisi dell'onda di polso, la misurazione della velocità dell'onda di polso e la tonometria arteriosa periferica (PAT). L'interesse è recentemente cresciuto soprattutto per la valutazione della funzione endoteliale dopo iperemia reattiva (reactive hyperemia) attraverso la PAT (RH-PAT) misurata sulla punta delle dita [88].

Anche se nessuno dei metodi attualmente disponibili per la misurazione della vasodilatazione endotelio-dipendente ha tutte le caratteristiche per la stratificazione del rischio cardiovascolare, diverse tecnologie innovative promettenti, tra cui l'RH-PAT, sono in fase di studio attivamente. La misurazione della funzione endoteliale, come marker della salute arteriosa in risposta agli effetti dei fattori di rischio sulla parete del vaso, mostra grandi prospettive.

Di recente nuovi studi stanno valutando le cellule progenitrici endoteliali (EPC) come possibili markers di disfunzione endoteliale. Raramente le EPC si trovano nel sangue periferico di individui sani; esse sono cellule di riparazione/rigenerazione, il cui ruolo è riparare o eventualmente sostituire le aree danneggiate dell'intima vasale [89]. Inoltre, le EPC possiedono la caratteristica di essere in grado di aumentare la rivascolarizzazione e la rigenerazione endoteliale [90], infatti possono

essere coinvolte anche nella rigenerazione di miocardio ischemico attraverso la modulazione di angiogenesi e la miogenesi, l'apoptosi dei cardiomiociti, e il rimodellamento del tessuto cardiaco ischemico. Le EPC, inoltre, partecipano alla neovascolarizzazione cerebrale dopo l'ictus ischemico. L'importanza del ruolo di EPC in un detrimto vascolare precoce e la successiva riparazione è stata sottolineata da un rapporto che dimostra una correlazione significativa tra il numero, la funzione di EPC e la funzione endoteliale periferica [91]. La valutazione del numero e la funzione di EPC può servire come un importante marker aggiuntivo della funzione endoteliale e di conseguenza può servire come utile strumento per la terapia. Così, non è semplicemente il numero di EPC circolanti trovato, ma anche il tipo e la posizione di queste EPC che potrebbero avere un impatto sulla malattia e sulle potenziali terapie [92]. Il rilascio di EPC, indotto da citochine infiammatorie come NFκB e IL-8, è stato documentato nel sito di lesione endoteliale in modelli animali. Studi sulla citometria a flusso nell'uomo hanno constatato una tendenza epidemiologica verso un aumento del numero di EPC in pazienti ad alto rischio di eventi cardiovascolari [93] [94].

2.5 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE COME FATTORE PROGNO- STICO

La disfunzione endoteliale sembrerebbe rappresentare l'evento più precoce nell'ambito del processo di formazione della placca aterosclerotica, manifestandosi quando non è ancora dimostrabile una lesione strutturale della parete vasale; per tale motivo la valutazione della funzione endoteliale potrebbe essere un utile strumento per la stratificazione precoce dei pazienti a rischio di eventi cardiovascolari.

Quando però si manifestano quelle condizioni cliniche (cioè la presenza dei fattori di rischio cardiovascolare) caratterizzate da disfunzione endoteliale e, quindi, dalla riduzione della biodisponibilità di NO, si ha la prevalenza di sostanze quali gli endoperossidi, l'endotelina-1, l'angiotensina II e altre che, oltre ad essere potenti vasocontrittori, favoriscono anche tutti quei meccanismi che incentivano e sostengono l'aterosclerosi e la trombosi. Inoltre, l'alterazione della vasomotilità endotelio-dipendente può contribuire alla genesi degli eventi cardiovascolari modulando la stabilità di placca e il vasospasmo coronarico e riducendo la riserva coronarica [95].

La disfunzione endoteliale è, pertanto, un meccanismo che influenza profondamente la funzione e la struttura vascolare, determinando alterazioni della vasomotricità e promozione dell'aterosclerosi e della trombosi, contribuendo così agli eventi cardiovascolari. La presenza di disfunzione endoteliale è stata associata all'incidenza di eventi cardiovascolari in studi longitudinali.

Lerman e Zeiher hanno analizzato l'insieme di questi studi, eseguiti in pazienti con malattia coronarica lieve o ad elevato rischio cardiovascolare. In questa analisi sono stati inclusi circa 2500 pazienti, con un ampio range di follow-up (da 1 a 92 mesi). Il tipo di eventi includeva eventi cardiovascolari maggiori come la morte cardiaca, l'infarto acuto del miocardio e la necessità di rivascolarizzazione. Gli autori hanno osservato che la disfunzione endoteliale, valutata sia a livello coronarico che periferico, risulta significativamente predittiva degli eventi cardiovascolari in questi pazienti, indipendentemente dalla presenza dei tradizionali fattori di rischio cardiovascolare. Questi studi supportano l'ipotesi che la disfunzione endoteliale possa rappresentare una valutazione integrata dell'effetto dei vari fattori di rischio e possa essere utilizzata come un marker sensibile per il loro significato funzionale.

Sicuramente ulteriori studi condotti in popolazioni su larga scala e l'accumularsi di risultati concordanti ottenuti con metodiche diverse e con stimoli differenti potranno portare ad una sostanziale certezza e solidità dei dati. Possiamo ad oggi solo affermare che la disfunzione endoteliale si associa al rischio cardiovascolare, rappresentando il meccanismo patogenetico di base attraverso il quale i vari fattori di rischio predispongono al danno aterotrombotico e agli eventi cardiovascolari. Un altro aspetto molto importante che è necessario stabilire riguarda la vera importanza della disfunzione endoteliale non solo come meccanismo promotore degli eventi cardiovascolari, ma anche come reale bersaglio della terapia. Infatti, è cruciale sapere se l'effetto benefico di un trattamento in termini di riduzione degli eventi cardiovascolari sia direttamente correlato con il ripristino della funzione endoteliale. Un importante studio ha valutato questa possibilità, è stato svolto in Italia e condotto in donne ipertese in post-menopausa [96]. In questo studio è stato valutato se un trattamento antipertensivo ottimale fosse in grado di modificare la funzione endoteliale, valutata con la tecnica della FMD in arteria omerale, e quindi valutare se tale miglioramento potesse essere predittivo di una migliore prognosi.

A questo scopo sono state studiate circa 400 donne in fase post-menopausale con ipertensione arteriosa lieve-moderata e con una ridotta FMD. La funzione endoteliale è stata valutata in condizioni basali e dopo 6 mesi di trattamento con una terapia antipertensiva che controllasse la pressione arteriosa in maniera ottimale. Al termine del periodo di trattamento, in un gruppo di 150 donne (37.5%) la FMD non si modificava (gruppo 1), mentre nelle rimanenti 250 donne (62.5%), la funzione endoteliale veniva significativamente migliorata di almeno il 10% (gruppo 2). Le pazienti sono state quindi seguite per un più lungo periodo di tempo e, dopo 67 mesi di follow-up, gli autori hanno osservato la comparsa di un numero significativamente inferiore di eventi nel gruppo che aveva mostrato un miglioramento della FMD con il trattamento antipertensivo. Questo studio suggerisce che il miglioramento della funzione endoteliale possa essere un marker della risposta al trattamento farmacologico.

2.6 TRATTAMENTO DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Essendo una patologia di tipo funzionale, la disfunzione endoteliale è per lo più un processo reversibile ed il trattamento delle condizioni predisponenti può almeno in parte ripristinare un endotelio integro e funzionante [97] [98].

Lo stress ossidativo è considerato uno dei meccanismi patogenetici fondamentali della disfunzione endoteliale e dell'aterosclerosi; esiste, per questo motivo, una crescente attenzione sugli effetti di terapie antiossidanti sulla funzione dell'endotelio. Le terapie con sostanze antiossidanti sono a base di farmaci che agiscono sugli ossidanti lipidici circolanti (per esempio statine e Probucol) o di farmaci che agiscono direttamente sugli anioni superossido (vitamina C).

L'uso di inibitori della HMG CoA reduttasi (statine) riduce il rischio cardiovascolare e ristabilisce un normale equilibrio dell'endotelio; oltre all'effetto ottenuto attraverso la diminuzione dei lipidi circolanti, le statine hanno mostrato un'azione benefica diretta sull'endotelio, mediata da meccanismi pleiotropici ed antinfiammatori. Le statine, infatti, aumentano l'espressione e l'attivazione della eNOS, oltre

ad agire come antiossidanti, e riducono i livelli sistemici di proteina C reattiva, molecola che riverbera lo stato infiammatorio vascolare ed è in grado di inibire l'espressione di eNOS.

La somministrazione per via intra-arteriosa di vitamina C in pazienti con fattori di rischio cardiovascolare è stata associata ad una normalizzazione della FMD locale, ma tali effetti sono stati ottenuti con dosi molto elevate di farmaco, difficilmente raggiungibili per via sistemica. Negli studi eseguiti con somministrazione sistemica di vitamina C alle dosi di 2 g/die, la FMD a livello dell'arteria omerale è migliorata nei pazienti con malattia coronarica, ma non in quelli affetti da ipertensione arteriosa; con risultati, quindi, difficilmente interpretabili.

Gli studi che hanno usato combinazioni di antiossidanti, quali vitamina C, vitamina B e beta-carotene, hanno dato esiti discordanti; altre evidenze dimostrano, invece, che l'aspirina migliora la disfunzione endoteliale nei pazienti con aterosclerosi nota, probabilmente attraverso l'inibizione di vasocostrittori ciclossigenasi-dipendente come la prostaciclina [99]. La riduzione delle fonti di stress ossidativo, più che le sole terapie con sostanze antiossidanti, probabilmente potrà dare dei risultati applicabili alla popolazione generale.

Anche l'iperomocisteinemia è stata associata ad uno stato di disfunzione endoteliale, che può migliorare con la somministrazione di acido folico.

Nell'ipertensione arteriosa, la semplice riduzione dei valori tensivi non è sufficiente ad indurre una involuzione del processo di disfunzione endoteliale; tuttavia farmaci anti-ipertensivi, quali gli ACE-inibitori ed i sartani, hanno mostrato un effetto benefico su tale reintegro. I meccanismi attraverso i quali il blocco del sistema renina-angiotensina riduce il grado di disfunzione endoteliale sono probabilmente legati alla riduzione dello stress ossidativo e dell'infiammazione. Gli ACE-inibitori aumentano le concentrazioni plasmatiche di bradichinina, un vasodilatatore endotelio-dipendente e migliorano la funzione endoteliale anche attraverso la riduzione di Ang II, una molecola che incrementa l'attività della NADPH ossidasi, con conseguente aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno ed inattivazione di

NO. Le evidenze sperimentali dimostrano, inoltre, una stretta associazione tra profilo lipidico e disfunzione endoteliale, per cui una riduzione dei lipidi corporei è in grado di per sé di migliorare la funzione dell'endotelio [100].

La terapia con fibrati migliora la funzione endoteliale sia a digiuno che post-prandiale nei pazienti con diabete di tipo 2, così come gli acidi grassi omega-3, il meccanismo può essere legato ad un aumento delle lipoproteine ad alta densità (HDL) e una riduzione della lipidemia postprandiale e dello stress ossidativo associato [101]. Un'attività fisica adeguata e regolare riduce il rischio cardiovascolare e migliora la funzione vasomotoria endotelio-dipendente in soggetti sani ed in individui con ipertensione arteriosa, malattia coronarica o scompenso cardiaco; tale effetto sembra essere legato in larga parte ad una maggiore biodisponibilità di NO.

Una vita sedentaria, viceversa, si associa ad un aumentato stress ossidativo e ad un incremento dello stato infiammatorio sistemico, per cui presenta una maggiore probabilità di associarsi a disfunzione endoteliale. Un ulteriore effetto benefico sull'endotelio è stato inoltre dimostrato dai farmaci che riducono l'insulino-resistenza nei diabetici e dalla cessazione del fumo di sigaretta. Una dieta povera di grassi e ricca di frutta e verdura è raccomandata dalla American Heart Association per diminuire il rischio cardiovascolare e, in particolare, il vino rosso, il tè ed il succo d'uva sembrano ridurre la disfunzione endoteliale, grazie all'elevato contenuto di flavonoidi.

CAPITOLO III

DIETA MEDITERRANEA E ADIPOCHINE INFIAMMATORIE

3.1 INTRODUZIONE

In letteratura è ormai noto come il tessuto adiposo rappresenti un vero e proprio organo endocrino che determina il rilascio in circolo di sostanze note come adipochine. Tali molecole giocano un ruolo importante nella regolazione dei processi metabolici correlati all'obesità e all'insulino-resistenza e nell'induzione dei processi pro e anti infiammatori. [102] [103].

Le adipochine derivate dal tessuto adiposo sono citochine pro-infiammatorie coinvolte in malattie metaboliche e possono essere influenzate dalla dieta e dall'esercizio fisico [104].

La dieta mediterranea tradizionale è il modello dietetico che è stato collegato a una serie di benefici metabolici e per la salute, tra cui una riduzione del rischio di mortalità e una minore incidenza di malattie cardiovascolari [105] [106], nonché ad una riduzione dell'infiammazione delle vie aeree in patologie quali quella asmatica [107]. I benefici ottenuti anche da brevi periodi di aderenza alla dieta mediterranea relativamente ai marker infiammatori sono stati ampiamente dimostrati [108] e la risposta infiammatoria del tessuto adiposo, misurata dall'espressione genica di IL-6, MCP-1, leptina e adiponectina [109], può essere modulata anche da un breve challenge dietetico.

La concentrazione del tessuto adiposo modula l'infiammazione e l'equilibrio metabolico sia attraverso le adipochine, come l'adiponectina, sia mediante le citochine prodotte all'interno della frazione di tessuto non adipocita, in particolare la resistina [110]. Questi biomarcatori potrebbero mediare l'effetto dell'obesità su altre malattie infiammatorie [111].

Nell'organismo le adipochine modulano e regolano diversi processi biologici in organi target, inclusi cervello, fegato, muscolo, vasi, cuore e cellule beta pancreatiche. [112] [113] [114]. Quando si sviluppa l'infiammazione e la disfunzione del tessuto

adiposo, la secrezione di adipochine è significativamente indirizzata verso un pattern pro-infiammatorio, diabetogeno, e aterogeno. [112] [115] [113]

Tra le oltre 600 molecole di adipochine [116], ci sono molecole che hanno un ruolo nella risposta immunitaria (adipsina, ASP; SAA3, IL-17D, CSFs) e infiammatoria (IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, CrP, MCP-1, osteopontina, progranulina, chemerina) metabolismo del glucosio (leptina, adiponectina, DPP-4, resistina, vaspina), nella sensibilità all'insulina (leptina, adiponectina, chemerina), nell'ipertensione (angiotensinogeno), nella modulazione dell'espressione di molecole di adesione (PAI-1), nella crescita e nella funzione vascolare (VEGF), nell'adipogenesi e nella morfogenesi ossea (BMP-7), nella crescita (IGF-1, TGF-beta, fibronectina), nel metabolismo lipidico (CD36), nella regolazione dell'appetito e del senso di sazietà (leptina, vaspina) e in altri processi biologici. [112] [113].

Alcune adipochine sono considerate come biomarkers innovativi per lo screening, la diagnosi, il monitoraggio terapeutico nei soggetti obesi, nei pazienti con insufficienza renale e diabete, come predittori della ricorrenza della patologia [117]. Poiché le adipochine rappresentano un link tra l'obesità e il diabete mellito di tipo 2 (leptina, adiponectina), emostasi (fibrinogeno), infiammazione cronica (TNF-alfa, IL-6, IL-1 beta, MCP-1, progranulina, chemerina), hanno un grande potenziale per essere clinicamente rilevanti come biomarkers e composti terapeutici. [114]

Le adipochine hanno un potenziale potere predittivo del successo individuale al trattamento e della progressione di malattia, possono essere impiegato per monitorare la risposta clinica agli interventi terapeutici e lo stile di vita. Potrebbero essere, inoltre, utilizzate per identificare precocemente i non responders a interventi specifici e a monitorare l'aderenza al trattamento.

3.2 VISFATINA

La visfatina, anche nota come fattore stimolante le colonie delle cellule pre-B o nicotinamide fosforibosiltrasferasi, è stata recentemente identificata come una nuova adipocitochina. [118]

L'attività enzimatica di NAMPT è in gran parte dovuta alla sua forma dimerica [119] [120] presente nel citosol e nel nucleo; controversa rimane la sua possibile presenza nei mitocondri [121] [122].

La visfatina è una delle principali adipochine secrete dal tessuto adiposo. Il livello di visfatina aumenta significativamente nelle persone con obesità a causa dell'aumento dell'indice di massa corporea (BMI). Durante l'obesità, gli adipociti, che popolano il tessuto adiposo, vanno incontro ad ipertrofia e iperplasia e secernono un numero di adipocitochine, tra cui la visfatina.

La visfatina, che funge anche da enzima nicotinamide fosforibosil transferasi, è una delle adipochine importanti che influenzano l'omeostasi metabolica nel corpo.

La visfatina esiste in due forme, extracellulare e intracellulare, e mette in atto una moltitudine di azioni. Le prove dirette e indirette raccolte da studi in vitro, in vivo e clinici, indicano che la visfatina modula le attività pato-fisiologiche correlate all'obesità e alla sindrome metabolica, tra cui infiammazione 'potenziata', angiogenesi, sintesi del mononucleotide NAD e up-regulation delle proteine antiapoptotiche in un numero ampio di cellule. È stato implicato in una serie di alterazioni legate all'obesità e in disordini metabolici come diabete, complicanze cardiovascolari e alcune forme di cancro.

NAMPT non è presente solo intracellulare (NAMPT intracellulare, iNAMPT), ma è anche espresso nell'ambiente extracellulare. Originariamente identificato nel midollo osseo, si pensava che NAMPT extracellulare (eNAMPT) fosse una citochina per il suo ruolo di co-fattore nella generazione di cellule pre-B mediate dall'interleuchina (IL) -7/SCF e quindi chiamata colonyenhancing delle cellule pre-B fattore [123]. Studi successivi hanno dimostrato che eNAMPT è altamente espresso nel tessuto adiposo [124] e che promuove la secrezione di insulina [125].

In uno studio, condotto da Kumari et al., è stata proposta una nuova ipotesi sul ruolo della visfatina nella diabetosità che implica recenti progressi negli studi sui ruoli fisiopatologici della stessa durante l'obesità e l'alta concentrazione di glucosio cronica presente a livello ematico. La visfatina ad alta concentrazione attira le cellule

immunitarie e produce infiammazione cronica negli adipociti. Inoltre, induce resistenza all'insulina in molti tessuti e provoca disfunzione delle cellule beta del pancreas nelle fasi successive [126].

Il rilascio di eNAMPT è stato, altresì, rilevato nel grasso perivascolare e in diversi sottogruppi cellulari coinvolti nell'aterosclerosi, suggerendo così una potenziale azione paracrina nello sviluppo e nella progressione della placca [127] [128].

eNAMPT può promuovere direttamente l'infiammazione vascolare attivando le cellule endoteliali (EC). Nello specifico, eNAMPT ha promosso l'espressione di molecole di adesione (molecola di adesione cellulare intercellulare [ICAM-1], molecola di adesione cellulare vascolare [VCAM-1] ed E-selectina) e il rilascio di citochine proinfiammatorie e chemochine (IL-6, IL-8, proteina chemocettrice dei monociti [MCP-1] e relativo recettore per le chemochine di tipo 2) [129] [130].

Inoltre, eNAMPT ha innescato l'assemblaggio e l'attivazione della NADPH ossidasi, un generatore di anione superossido e un enzima proinfiammatorio, che contribuisce ulteriormente alla disfunzione endoteliale [131].

Per quanto riguarda le EC, è stato scoperto che eNAMPT attiva il fattore di trascrizione NF- κ B e promuove l'attivazione di monociti/macrofagi [132].

Sono stati riportati un aumento della sintesi e del rilascio di TNF- α e IL-8 nei monociti circolanti stimolati con eNAMPT [133], mentre l'espressione e l'attività di MMP-2 e -9 sono state dimostrate sia nei monociti che nelle EC trattate con eNAMPT [134] [133].

eNAMPT ha anche indotto la differenziazione dei monociti in macrofagi [135] ed ha esercitato effetti antiapoptotici, che consentono di perpetuare i processi infiammatori [133] [136].

Oltre a promuovere l'infiammazione, eNAMPT ha contribuito alla vulnerabilità della placca aterosclerotica sostenendo la degradazione della matrice extracellulare e l'angiogenesi. Da un lato, l'espressione up-regolata degli MMP-2 e -9 era associata alla soppressione dei loro inibitori (inibitore dei tessuti della metalloproteinasi [TIMP-1] e -2) in EC e monociti [134]. D'altro canto, eNAMPT può agire come fattore di crescita con effetti proliferativi su EC e cellule muscolari lisce (SMC). In

effetti, eNAMPT è stato indicato come molecola proangiogenica aumentando la sopravvivenza, la proliferazione, la migrazione e la formazione di tubi capillari in vitro nella CE, mentre la somministrazione esogena di eNAMPT in vivo ha stimolato la formazione di neo-vasi funzionali [129]. Tali effetti proliferativi di eNAMPT sono stati principalmente mediati dall'aumentata sintesi endoteliale e dalla secrezione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e dal suo recettore correlato (VEGFR-2) [134] [129] [137]. Ulteriori fattori pro-angiogenici comprendono l'MCP-1 e il fattore di crescita dei fibroblasti-2 [134] [138]. Allo stesso modo, eNAMPT ha mostrato la capacità di indurre la motilità e la proliferazione di SMC attraverso la sua attività enzimatica diretta e potenzialmente comportando l'azione della telomerasi. [139] [128] [140]. Inoltre, l'attivazione di NF- κ B nelle SMC ha dimostrato di sovraregolare l'espressione di ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS), migliorando ulteriormente lo stress ossidativo/nitrosativo nella placca aterosclerotica [141] [129]. Coerentemente con queste prove sperimentali, è stato dimostrato che la trasfezione con un lentivirus che consente la sovraespressione di NAMPT aumenta la vulnerabilità della placca sovraregolando l'espressione di MMP-8 e -9 [142]. Al contrario, la stabilizzazione della placca è stata osservata nei topi ApoE - / - trattati con l'inibitore NAMPT FK866 [143]. Sopprimendo l'espressione del ligando 1 delle chemochine (C-X-C) mediante EC, FK866 ha ridotto l'infiltrazione di neutrofili e il contenuto di MMP-9 e aumentato i livelli di collagene nelle placche aterosclerotiche [143].

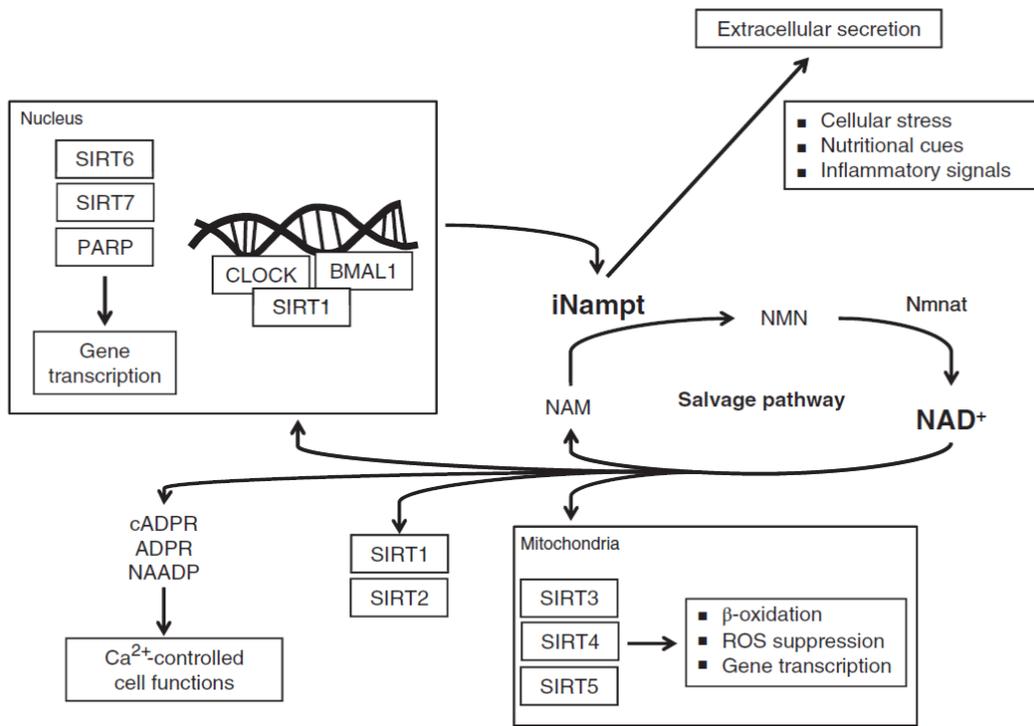


Figura 6. Attività fisiologica della NAMPT intracellulare [144]

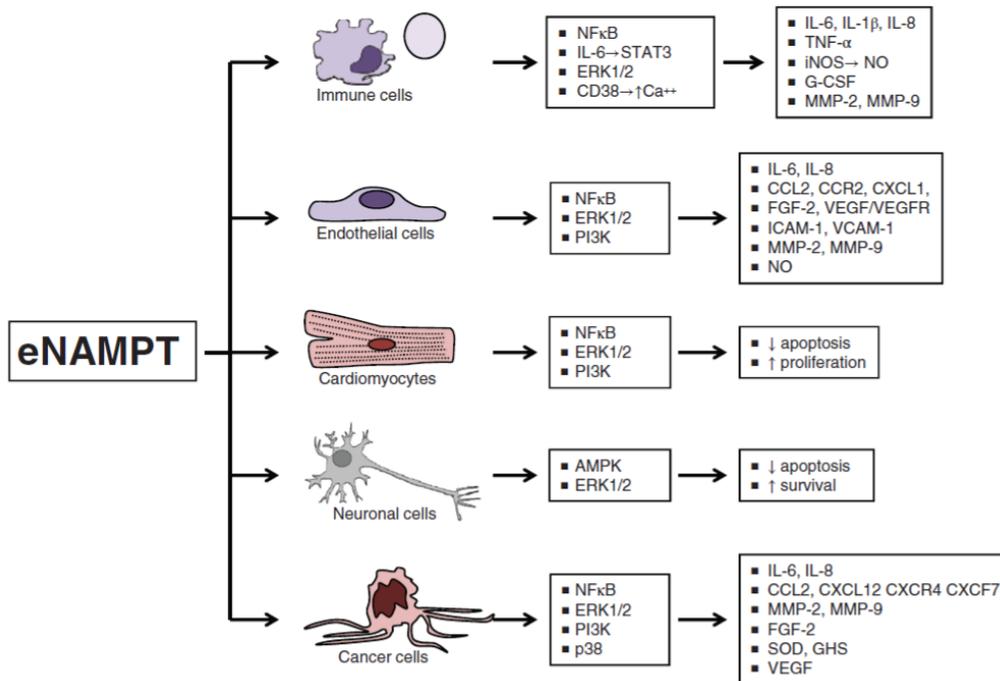


Figura 7. Attività fisiologica della NAMPT extracellulare [144]

3.3 RESISTINA

La resistina era inizialmente conosciuta come un ormone secreto dagli adipociti (adipochine), caratterizzato dalla presenza di 10 a 11 residui di cisteina [145], legato all'obesità e all'insulino-resistenza nei roditori [146]. Studi recenti hanno invece mostrato come essa sia principalmente espressa e secreta dai macrofagi nell'uomo [147]. La mancanza di espressione della resistina negli adipociti umani può essere dovuta all'assenza di un sito di legame genomico per il recettore γ , che normalmente controlla l'espressione del gene della resistina (*retn*) negli adipociti del topo [148].

Come nei roditori, il trattamento con tiazolidinedione sottoregola l'espressione della resistina umana nei macrofagi e riduce i livelli sierici di resistina. Nei topi, la resistina circolante esiste in un esamero legato al disolfuro o in un trimero più piccolo che mostra una maggiore bioattività in condizioni di sensibilità all'insulina epatica ridotta. Nell'uomo, la resistina circola in forme trimeriche e oligomeriche di cui la forma oligomerica sembra avere un effetto più potente sulla stimolazione delle citochine proinfiammatorie [149]. È interessante notare che la bioattività della resistina è aumentata da un'interazione fisica tra resistina ed eparinasi [150].

Studi epidemiologici e genetici indicano che un aumento dei livelli di resistina è associato allo sviluppo di insulino-resistenza, diabete e malattie cardiovascolari.

La resistina sembra anche mediare la patogenesi dell'aterosclerosi promuovendo la disfunzione endoteliale, la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari, l'infiammazione arteriosa e la formazione di cellule schiumose. Pertanto, la resistina è predittiva di aterosclerosi e di scarsi risultati clinici in pazienti con malattie cardiovascolari e insufficienza cardiaca.

Inoltre, recenti prove suggeriscono che la resistina sia associata a dislipidemia aterogena e ipertensione.

3.2.1 RUOLO DELLA RESISTINA NELL'INSULINO RESISTENZA

La resistina è un mediatore della resistenza all'insulina nei roditori. Ad esempio, i livelli circolanti di resistina sono elevati nei topi obesi e la somministrazione di resistina ricombinante compromette l'azione dell'insulina nei topi normali. La somministrazione centrale e periferica della resistina ricombinante e la sovraespressione

transgenica della resistina inducono insulino-resistenza epatica nei topi e, allo stesso modo, una varietà di cellule e tessuti nei roditori rispondono alla resistina.

Il trattamento di adipociti 3T3-L1, cardiomiociti murini e cellule muscolari scheletriche coltivate con resistina murina riduce l'assorbimento di glucosio stimolato dall'insulina nelle cellule [151] e la resistina induce insulino resistenza epatica negli epatociti di ratto primario e un modello murino con un'elevata espressione epatica di resistina [152]. Al contrario, la neutralizzazione della resistina con anticorpi anti-resistina migliora la sensibilità all'insulina nei topi obesi e il knockdown o la delezione della resistina aumentano la sensibilità epatica all'insulina nei topi sottoposti ad una dieta ricca di grassi [153].

I meccanismi precisi con cui la resistina murina esercita i suoi effetti biologici non sono ancora completamente compresi perché il recettore della resistina deve ancora essere caratterizzato. Tuttavia, studi recenti hanno fornito diversi potenziali candidati per il recettore della resistina murina, tra cui un'isoforma di decorina nota come recettore-1 orfano simile alla tirosina chinasi (ROR1). Allo stesso modo, è stato proposto che un prodotto di scissione della decorina, noto come δ -decorina e privo di un sito di glicanizzazione, sia un recettore funzionale della resistina murina nelle cellule progenitrici adipose [154]. In effetti, la δ -decorina, come recettore funzionale della resistina, può regolare l'espansione del WAT modulando la proliferazione e la migrazione cellulare nonché la differenziazione degli adipociti nei topi. Inoltre, è stato dimostrato che l'interazione della resistina di topo con ROR1 provoca l'inibizione della fosforilazione di ROR1, che modula la fosforilazione delle chinasi extracellulari, nonché la regolazione del segnale (ERK) 1/2 e l'espressione del soppressore della segnalazione di citochine 3 (SOCS3) e del trasportatore di glucosio 4 in preadipociti 3T3-L1 [155].

Data l'associazione tra resistina murina e insulino-resistenza, numerosi studi clinici hanno esaminato la relazione tra i livelli circolanti di resistina e l'insulino-resistenza nelle persone obese con e senza diabete [149]. Mentre alcuni studi hanno mostrato correlazioni positive tra resistina e insulino-resistenza, altri studi non sono riusciti a identificare cambiamenti significativi nei livelli di resistina in pazienti con insu-

lino-resistenza e/o diabete mellito di tipo 2 [151] [156]. Tuttavia, queste discrepanze possono essere attribuite a piccole dimensioni del campione, differenze di popolazione, stato della malattia e uso di saggi non standardizzati per misurare la resistina [157].

Per studiare l'ipotesi che la resistina umana contribuisca all'insulino-resistenza, Qatanani et al. [158] hanno prodotto un modello murino transgenico di "resistina umanizzata" in cui la resistina umana si esprime principalmente in PBMC e macrofagi, ma manca la resistina murina. Dopo aver nutrito i topi transgenici con una dieta ricca di grassi, si è visto come questi sviluppassero infiammazione e resistenza all'insulina nei muscoli e nei tessuti adiposi, il che suggerisce che la resistina umana possa fungere da link tra l'ambiente infiammatorio e la resistenza all'insulina [158]. Tuttavia, in questo modello di topo transgenico, l'espressione della resistina umana nei macrofagi era costitutiva e non indotta da stimoli infiammatori. Pertanto, non è chiaro se la resistina indotta da segnali infiammatori possa portare all'insulino-resistenza nell'uomo. Per rispondere a questa domanda, il laboratorio Lazar ha generato un topo transgenico, privo di resistina murina ma che esprimeva resistina umana, che è stato definito topo Hum-Retn [159]. I topi Hum-Retn mostrano livelli sierici di resistina simili all'intervallo normale per l'uomo. Inoltre, a differenza dei topi transgenici della resistina guidata dai macrofagi, i livelli di resistina umana nei topi Hum-Retn mostrano un marcato aumento della risposta al trattamento con LPS, che è anche simile a quanto riscontrato negli essere umani [159]. Inoltre, in condizioni di endotossiemia cronica, i topi Hum-Retn sviluppano insulino-resistenza epatica accompagnata da infiammazione nel fegato e nei muscoli scheletrici, il che supporta l'idea che la resistina sia coinvolta nella fisiopatologia della resistenza all'insulina indotta da infiammazione nell'uomo [159].

In linea con questa osservazione, è stato dimostrato che la resistina umana inibisce l'assorbimento del glucosio stimolato dall'insulina nei cardiomiociti di topo isolati [160].

La resistina inoltre attenua la segnalazione di insulina nei miociti attraverso la soppressione della miogenesi e la stimolazione della proliferazione dei mioblasti nei

miotubuli C1C12 [161] e induce, inoltre, la resistenza all'insulina attraverso meccanismi AMPK-dipendenti e indipendenti dall'AMPK negli epatociti HepG2 [162]. Recentemente, studi prospettici caso-controllo hanno scoperto che gli individui con elevati livelli basali di resistina hanno un rischio significativamente più elevato di sviluppare diabete mellito di tipo 2, anche dopo aggiustamento per altri fattori di rischio [153] [163].

3.2.2 RUOLO DELLA RESISTINA NELL'INFIAMMAZIONE

La resistina umana svolge un ruolo regolatorio importante nella risposta infiammatoria [164] durante la quale i macrofagi, il PBMC e le cellule vascolari sono gli obiettivi primari della resistina [165]. La resistina sovraregola l'espressione delle citochine proinfiammatorie come TNF- α , IL-6, IL-12 e le proteine chemoattattive monocitarie (MCP) -1 in PBMC, macrofagi e cellule stellate epatiche attraverso il fattore nucleare- κ B (NF- κ B) [166]. L'espressione della resistina è stata identificata anche nella frazione vascolare stromale non adipocitaria di WAT, fegati fibrotici e lesioni aterosclerotiche [167]. Inoltre, i livelli circolanti di resistina sono correlati a marcatori infiammatori e fibrinolitici, come proteina C-reattiva (CRP), TNF- α e IL-6 nella popolazione generale e in individui con diabete mellito di tipo 2, aterosclerosi coronarica, malattia renale cronica, artrite reumatoide e/o sepsi [149]. I livelli plasmatici di resistina sono anche correlati alla gravità della malattia nei pazienti con sepsi grave o pancreatite acuta e sono predittivi di esiti peggiori nei pazienti non settici ma in condizioni critiche [153].

3.2.3 RUOLO DELLA RESISTINA NELL'ATEROSCLEROSI

Nelle cellule endoteliali, la resistina umana aumenta l'espressione di vari fattori proinfiammatori, tra cui MCP-1, endotelina-1 e metalloproteinasi di matrice, nonché molecole di adesione, come molecola di adesione intercellulare-1, molecola di adesione delle cellule vascolari-1 e P-selectina [168] [169]. La resistina umana aumenta anche la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali umane e delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) e aumenta la permeabilità endoteliale, che a sua volta promuove l'adesione e l'infiltrazione delle cellule endoteliali/monocitarie [170]; queste azioni sono mediate dalle vie di segnalazione della proteina chinasi attivata dal mitogeno ERK e p38 [168].

Inoltre, la resistina inibisce la proteina che media la sintesi dell'ossido nitrico endoteliale attraverso lo stress ossidativo nelle cellule endoteliali umane [171], promuove la formazione di macrofagi umani, induce un fenotipo protrombotico nelle cellule endoteliali umane [165] e induce l'attivazione piastrinica aumentando l'espressione di P-selectina [172]. Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che la resistina umana potrebbe svolgere un importante ruolo regolatorio nella modulazione delle interazioni tra cellule endoteliali, monociti/macrofagi e VSMC nella patogenesi e nella progressione dell'aterosclerosi [156].

Un ampio studio di popolazione ha trovato una forte correlazione positiva tra i livelli circolanti di resistina e le concentrazioni sieriche di trigliceridi a digiuno [173].

Al contrario, altri studi hanno dimostrato che la resistina è inversamente correlata ai livelli di colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (LDL) [174] [175].

È stato suggerito che la resistina sia positivamente correlata con le sottoclassi di LDL più piccole e più dense, ossia quelle aterogeniche, in soggetti con diabete mellito di tipo 2 [176] e un recente studio ha dimostrato che il trattamento degli epatociti umani con resistina ha stimolato potentemente la secrezione di apolipoproteina B (apoB) nelle VLDL [177]. Al contrario, la rimozione della resistina sierica tramite immunoprecipitazione riduce la produzione di apoB di epatociti [177].

I meccanismi alla base dell'aumento della concentrazione di VLDL includono la stimolazione della sintesi di apoB100, l'attività delle proteine di trasferimento dei trigliceridi microsomiali, l'induzione della lipogenesi de novo attraverso le vie SREBP1 e SREBP2 e il miglioramento della stabilità di apoB100 [178].

La resistina aumenta la PCSK9 negli epatociti umani che, a loro volta, sottoregolano il recettore LDL [179] inducendone il degrado [180]. Resistina e PCSK9 condividono un'omologia strutturale nella porzione ricca di cisteina all'interno del dominio C-terminale e, quindi, è possibile che la resistina e il PCSK9 formino complessi di aggregazione aventi come target il recettore LDL [181]. In uno studio condotto su una coorte di soggetti cinese, i livelli plasmatici di resistina erano significativamente correlati ai livelli di PCSK9 in pazienti con CAD con peso corporeo normale [182].

Nel loro insieme, questi risultati indicano che la resistina stimola la produzione epatica di VLDL, aumenta la lipogenesi epatica e sopprime i livelli del recettore LDL attraverso l'incremento della concentrazione epatica di PCSK9.

Pertanto, la resistina può essere un potenziale bersaglio per il trattamento della dislipidemia aterogena in soggetti obesi con insulino-resistenza.

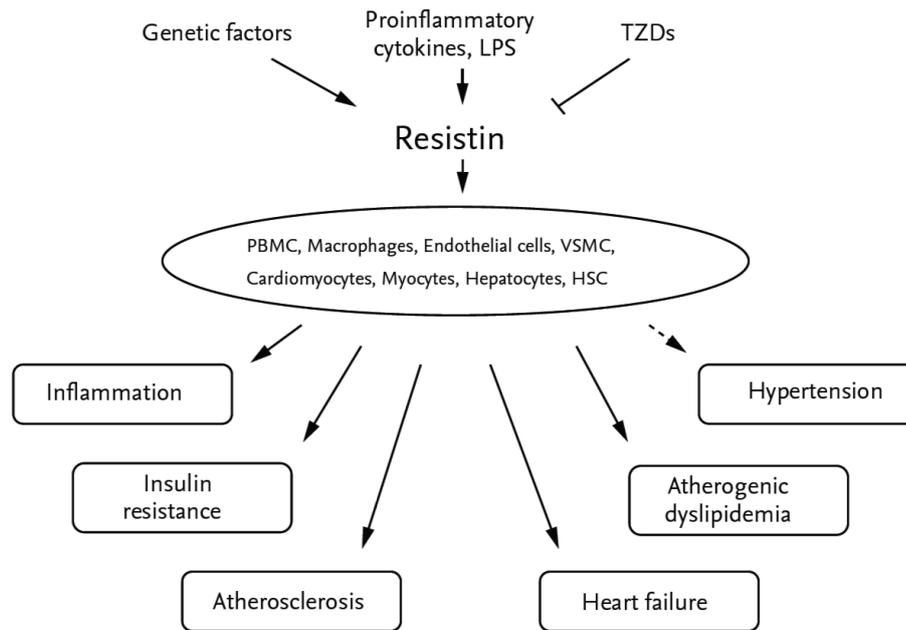


Figura 8. Ruoli della resistina umana in condizioni patofisiologiche. [183]

3.4 ADIPONECTINA

L'adiponectina è una proteina nota per regolare la sensibilità all'insulina e il metabolismo del glucosio. Questa adipochina è legata alla sindrome metabolica e all'obesità [184]. L'adiponectina è codificata dal gene adiponectina C1Q, contenente il dominio del collagene (ADIPOQ), che si trova sul cromosoma 3q27. Un comune polimorfismo a singolo nucleotide (SNP), rs266729 (-11.377C> G), nella regione del promotore prossimale del gene ADIPOQ ha attirato molta attenzione. I dati in letteratura indicano che il polimorfismo di ADIPOQ rs266729 regola funzionalmente l'attività del promotore dell'adiponectina e i suoi livelli proteici [185]. Inoltre, è stato scoperto che ADIPOQ rs266729 è correlato ai livelli circolanti di adiponectina nell'obesità e nel diabete [186] [187]. Questa variante di ADIPOQ è stata identificata per essere associata ad alto indice di massa corporea, resistenza all'insulina e nefropatia diabetica [188] [189] [190].

Uno studio recente ha valutato se la variante ADIPOQ rs266729 fosse significativamente associata alla riduzione di peso, alla modifica dei fattori di rischio cardiovascolare e ai livelli di adiponectina dopo una moderata restrizione calorica con un pattern mediterraneo tra i soggetti obesi.

I portatori di alleli non G hanno mostrato una risposta migliore dei livelli di glucosio, HOMA-IR, insulina, colesterolo totale, colesterolo LDL e adiponectina rispetto ai portatori di alleli G dopo l'intervento. Inoltre, anche i portatori non G presentavano livelli di adiponectina più elevati rispetto ai portatori G.

Esistono alcune metanalisi che valutano l'associazione tra questo SNP sul gene ADIPOQ e il diabete mellito, l'obesità e la sindrome metabolica [191] [192], ma mancano informazioni relative all'influenza della perdita di peso.

In una recente analisi del finlandese Diabetes Prevention Study [193], uno studio multicentrico randomizzato e controllato, basato su un intervento dietetico di riduzione dell'assunzione di grassi totali <30%, grassi saturi a <10% dell'energia giornaliera e aumento delle fibre alimentari ad almeno 15 g per 1000 kcal, gli autori hanno mostrato che l'allele G rs266729 era associato ad un peso maggiore dopo un follow-up di 4 anni e l'allele C era associato ad un aumentato rischio di sviluppare

il diabete mellito di tipo 2. L'allele G, associato ad un peso corporeo successivo al trattamento più elevato e un'incidenza di diabete mellito più bassa, sembra avere effetto sui parametri metabolici.

L'adiponectina potrebbe essere l'esempio più prominente dell'uso potenziale di un adipochina nel trattamento dell'obesità e delle malattie metaboliche associate ad essa.

Generalmente determina azioni insulino-sensibilizzanti, anti-infiammatorie ed anti-apoptotiche su un numero di citotipi differenti [194]. L'adiponectina rilasciata dagli adipociti è down regolata da condizioni metaboliche avverse, risultanti in una ridotta concentrazione sierica di adiponectina [194]. Vari ormoni associati con insulino-resistenza e obesità, incluse catecolamine, insulina, glucocorticoidi, TNF alfa e IL-6 downregolano l'espressione e la secrezione dell'adiponectina negli adipociti in vitro [195]. Oltre agli effetti periferici, l'adiponectina agisce a livello cerebrale incrementando la spesa energetica e inducendo calo ponderale. [194]

CAPITOLO IV

DIETA MEDITERRANEA E CERAMIDI

Ceramide e sfingosina-1 fosfato (S1P) sono lipidi bioattivi del percorso sfingolipidico e svolgono un ruolo essenziale nella segnalazione cellulare. In condizioni fisiologiche, svolgono ruoli contrastanti all'interno del metabolismo cellulare. La ceramide ha dimostrato di essere coinvolta nelle risposte cellulari e nell'apoptosi correlate allo stress, mentre S1P stimola la sopravvivenza cellulare, la proliferazione e la rigenerazione dei tessuti [196] [197] [198] [199]. Quindi, mantenere l'equilibrio tra ceramide e S1P è cruciale per le cellule, in quanto questi lipidi bioattivi contribuiscono sostanzialmente alle decisioni sul destino cellulare [200] [201]. A causa delle loro implicazioni per i meccanismi cellulari, le alterazioni dei livelli di ceramide sono state riconosciute in condizioni patologiche come il diabete di tipo 2, le malattie cardiovascolari [202], la malattia infiammatoria intestinale [203].

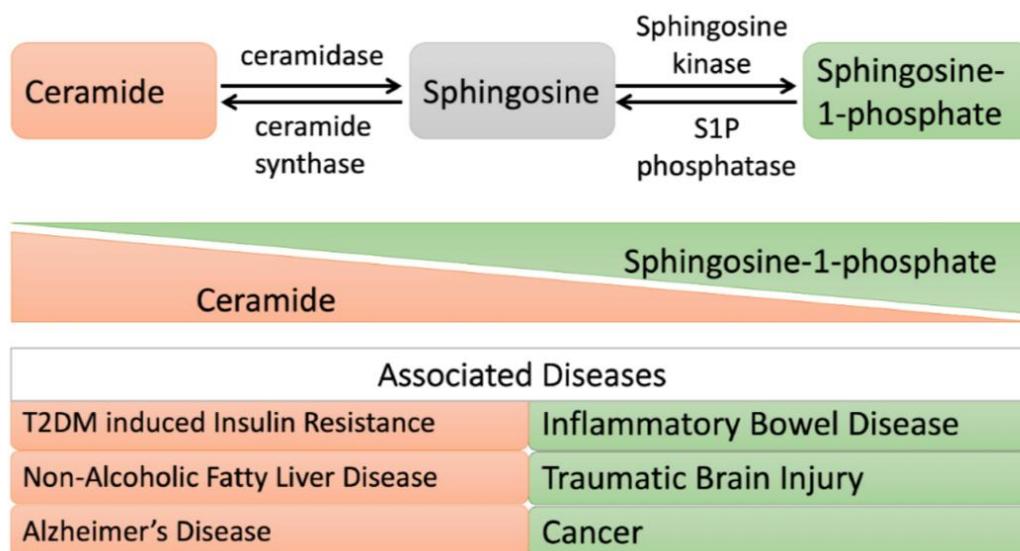


Figura 9. Correlazione tra alterato rapporto ceramide/S1P e patologie metaboliche [204]

La ceramide cellulare può essere generata attraverso tre principali vie metaboliche: attraverso l'idrolisi della sfingomieline mediante le azioni delle sfingomielinasi (note anche come vie idrolitiche o SMase), attraverso la sintesi di diidroceraide desaturasi in un percorso de novo o attraverso la ceramide sintasi in un recupero percorso [205].

Il catabolismo della ceramide è controllato dalle ceramidasi che la degradano in acidi grassi liberi e sfingosina, che possono essere ulteriormente fosforilati dalla sfingosina chinasi e che possono produrre sfingosina-1 fosfato (S1P).

Nei topi alimentati con dieta ricca di grassi (HFD), i livelli di ceramide erano patologicamente elevati. Con l'espressione transgenica della ceramidasi nel tessuto epatico e adiposo, i topi alimentati con HFD hanno mostrato livelli ridotti di ceramide sistemica, con miglioramento della sensibilità all'insulina e steatosi epatica [206]. In un altro studio, la sovraespressione della sfingosina chinasi 1 ha migliorato la resistenza all'insulina nei topi alimentati con HFD [207]. Questi studi implicano che la riduzione del livello di ceramide o l'aumento del livello di S1P nei topi HFD migliora la sensibilità all'insulina.

La ceramide è idrolizzata da tre tipi di ceramidasi, che sono localizzati in modo differenziato e classificati in base al loro ottimale pH catalitico: (i) ceramidasi acida, (ii) ceramidasi neutra e (iii) ceramidasi alcalina.

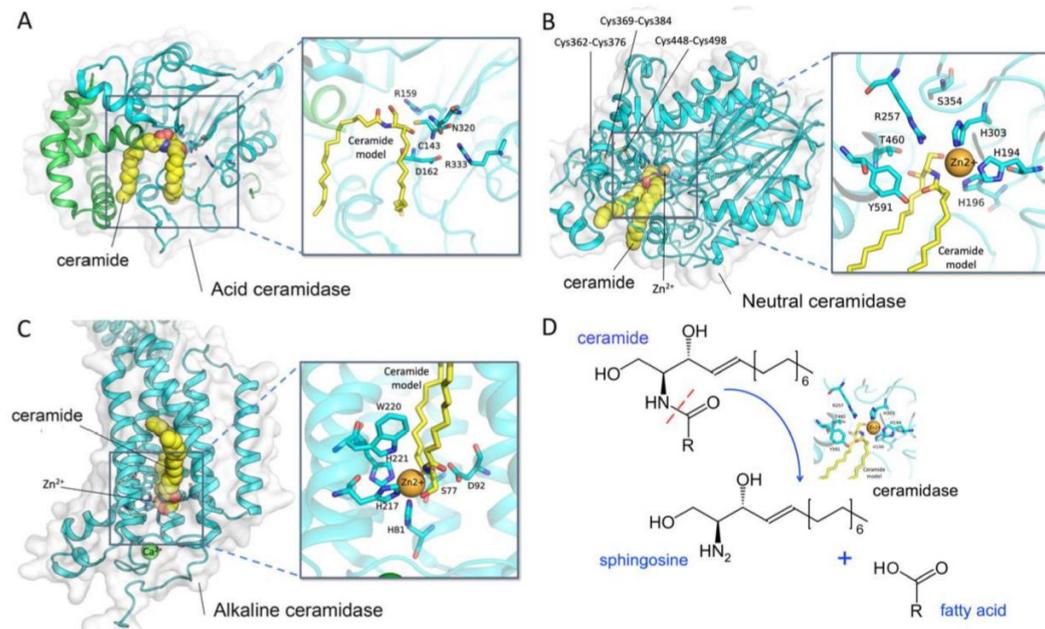


Figura 10. Struttura cristallina e sito catalitico delle ceramidasi [204]

Le ceramidi sono, dunque, precursori di sfingolipidi complessi.

Alcuni modelli cellulari e animali hanno riportato il ruolo patogenetico dell'accumulo di ceramidi nell'attivazione di numerosi bersagli di segnalazione che compromettono le normali funzioni cellulari che coinvolgono anche l'azione dell'insulina. Ciò sembra essere, anche, correlato ad un aumento della biosintesi della ceramide de novo in risposta a stimoli indotti da stress cellulare, come l'esposizione ad acidi grassi liberi saturi (FFA) [208].

La ceramide e i suoi metaboliti sono stati segnalati come punto intermedio tra alimentazione eccessiva e anomalie metaboliche, causando il rischio di malattie cardiometaboliche, come l'insulino-resistenza e l'infiammazione [209] [210].

Tuttavia, ad oggi, le prove disponibili relative al ruolo delle ceramidi sulla salute provengono principalmente da esperimenti in vitro e studi sugli animali.

Pochi studi hanno valutato prospetticamente l'associazione tra ceramidi e l'incidenza di eventi cardiovascolari e cerebrovascolari.

Un recente studio [211] ha analizzato la relazione tra ceramidi ed eventi cardiovascolari maggiori (MACE) tra soggetti apparentemente sani. Havulinna et al. hanno identificato quattro ceramidi circolanti, Cer (d18:1/16:0), Cer (d18:1/18:0), Cer (d18:1/24:0), e Cer (d18:1/24:1), in 8101 campioni di siero mediante un saggio di spettrometria di massa cromatografica-tandem mirata. Gli autori hanno osservato la più forte associazione con incidenza di MACE e il più alto rapporto di rischio non aggiustato pari a 1.31 (intervallo di confidenza al 95%, 1.21–1.41) per Cer (d18: 1/18: 0), risultato significativo a 1.21 (intervallo di confidenza al 95%, 1.11 – 1.33) dopo aggiustamenti apportati per il fattore di rischio di Framingham. Tale studio ha mostrato che ceramidi sieriche distinte erano associate ad un maggior rischio di eventi cardiovascolari avversi maggiori in soggetti apparentemente sani. Questi risultati suggeriscono il ruolo delle ceramidi nella patobiologia cardiovascolare e suggeriscono il loro ruolo come possibili nuovi biomarcatori del rischio di MACE.

Un altro recente studio [212] ha valutato la concentrazione di sei molecole di ceramide plasmatica ad alto rischio [Cer (d18: 1/16: 0), Cer (d18: 1/18: 0), Cer (d18:

1/20: 0), Cer (d18: 1/22: 0), Cer (d18: 1/24: 0) e Cer (d18: 1/24: 1)] in 167 pazienti consecutivi con malattia coronarica accertata o sospetta (CAD) sottoposti a scintigrafia con perfusione miocardica con dypiridamole (MPS). Dopo correzione per età, sesso, fumo, dislipidemia, ipertensione, diabete, anamnesi pregressa di CAD, frazione di eiezione ventricolare sinistra e tipo di stress, i test sono stati associati in modo indipendente alla presenza di ischemia miocardica inducibile. Pertanto, questo studio ha dimostrato come le ceramidi plasmatiche siano predittori positivi e indipendenti di difetti di perfusione miocardica indotti da stress in pazienti con CAD accertato o sospetto riferito a scintigrafia di perfusione miocardica clinicamente indicata.

Wang et al. [213] hanno valutato i partecipanti allo studio PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea), inclusi 230 casi incidenti di CVD e 787 partecipanti selezionati casualmente al basale (inclusi 37 casi sovrapposti), seguiti per un follow up $\leq 7,4$ anni. I partecipanti sono stati randomizzati in tre coorti, differenti per regime dietetico seguito: i) dieta mediterranea integrata con olio extra vergine di oliva, ii) dieta mediterranea integrata con noci e iii) dieta di controllo. In questo studio, il punteggio di ceramide, che è stato calcolato come una somma ponderata delle concentrazioni di quattro ceramidi, è stato associato con un rischio di CVD 2.18 volte più elevato tra quartili estremi. I partecipanti con uno score di ceramide più alto, e assegnati a uno dei 2 bracci di intervento attivi dello studio, hanno mostrato un rischio CVD simile a quelli con un punteggio più basso, mentre i partecipanti con uno score ceramidico più alto assegnati al braccio di controllo hanno presentato un rischio CVD significativamente più alto. Questi risultati suggeriscono un'associazione positiva tra i livelli plasmatici di ceramide al basale e gli eventi cardiovascolari e riportano come l'adesione a uno stile di dieta mediterranea possa influenzare la potenziale relazione negativa tra elevate concentrazioni plasmatiche di ceramide e CVD.

Dong D. Wang et al. hanno evidenziato come le elevate concentrazioni plasmatiche di ceramidi (C:24, C:16, C:22, C:18) siano significativamente correlate al rischio di eventi cardiovascolari e come la dieta mediterranea sia in grado di ridurre tale rischio determinando una riduzione delle concentrazioni sieriche di suddette molecole in una popolazione ad elevato rischio cardiovascolare.

L'attuale piattaforma metabolomica ha identificato quattro diverse ceramidi, tra cui C16:0 (numero di atomi di carbonio: numero di doppi legami), C22:0, C24:0 e C24:1.

La ceramide C24:0 aveva la concentrazione relativa più alta, mentre la ceramide C16:0 mostrava la concentrazione relativa più bassa. Lo studio ha osservato correlazioni moderate e positive relativamente alle concentrazioni plasmatiche tra le quattro ceramidi, che vanno da 0.49 a 0.63, ad eccezione di un'alta correlazione pari a 0.90 tra ceramidi C22:0 e C24:0. Tutte le ceramidi erano positivamente associate al rischio di incidenza di malattie cardiovascolari; le associazioni positive differivano solo per grandezza tra le diverse specie di ceramide e diventavano leggermente più forti dopo un aggiustamento multivariabile. Le analisi secondarie sull'ictus hanno prodotto associazioni simili tra ceramidi plasmatiche e gli esiti CVD specifici, rispetto all'analisi principale dell'esito CVD composito. Sebbene si sia trattato solo di un miglioramento marginale, il confronto del rischio CVD a 7 anni previsto dai due modelli ha prodotto un NRI di 0.22 (IC 95%, 0,04-0,45, P = 0,037).

L'effetto dannoso di concentrazioni più elevate di ceramide sul rischio di CVD è stato modificato dall'intervento della dieta mediterranea. I potenziali meccanismi per gli effetti modulatori di tale regime dietetico sulla via della ceramide sono duplici. In primo luogo, il consumo di componenti chiave della dieta può influenzare direttamente la biosintesi della ceramide [214].

In contrapposizione a tali evidenze, lo studio condotto da R. Peterson et al. in una coorte di soggetti sani ha mostrato come i livelli plasmatici delle ceramidi e, in particolare, il rapporto C24:0/C16:0 siano inversamente correlati al rischio di eventi cardiovascolari, suggerendo il ruolo di tale rapporto come nuovo biomarcatore di rischio cardiovascolare.

CAPITOLO V

RUOLO DELL'EPIGENETICA

5.1 RUOLO DELLA GENOMICA

La conoscenza dell'interazione gene-dieta potrebbe consentire di chiarire meglio i meccanismi attraverso i quali un fattore modificabile come la dieta possa influenzare l'espressione genica. In letteratura sono ormai diversi i dati relativi alle diverse risposte degli individui con genotipi diversi alla dieta; lo studio della predisposizione genetica potrebbe fornire uno strumento finalizzato a rilevare i soggetti che potrebbero trarre beneficio dall'intervento sui modelli dietetici.

Il primo gene studiato per identificare le varianti genetiche associate ad un'alta suscettibilità alle malattie cardiovascolari è stato il gene che codifica per l'ACE (enzima di conversione dell'angiotensina). Questo studio ha riportato che soggetti omozigoti per una delezione del gene prescelto presentavano un rischio superiore di infarto del miocardio. Il gene APOE è un altro esempio di studio delle varianti genetiche correlate alla suscettibilità alle malattie cardiovascolari, e ancora il gene CEPT (proteina di trasferimento dell'estere del colesterolo) è stato studiato in modelli animali e studi condotti sull'uomo hanno dimostrato il suo ruolo nel trasporto inverso del colesterolo, influenzando in tal modo processi pro aterosclerotici e anti aterosclerotici [215] [216].

L'approccio generale alla base della genomica è volto a ricercare alcune associazioni tra molti SNP e diverse malattie. Il polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) è una variante genetica comune che viene rilevata attraverso metodi di genotipizzazione nella sequenza del DNA. Un obiettivo importante di GWAS (studio di associazione genomica ampia) è comprendere e studiare la relazione tra polimorfismi a singolo nucleotide e fenotipi [217].

Nel campo degli studi sulla dieta mediterranea, i risultati dello studio PREDIMED evidenziano la stretta influenza dei componenti dietetici sulla predisposizione genetica al rischio cardiovascolare. A questo proposito, Carella e colleghi hanno studiato il polimorfismo rs7903146 nel gene codificante per il fattore di trascrizione

7-like2; in particolare, hanno riportato una relazione tra la predisposizione genetica a presentare ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia, aumento della glicemia a digiuno e incidenza di ictus, in quei soggetti omozigoti per l'allele T del polimorfismo sopra menzionato. I loro risultati suggeriscono che l'adesione alla dieta mediterranea possa attenuare l'effetto di tale predisposizione genetica [218].

Ortega Azurim et al. hanno trovato un'associazione tra il polimorfismo rs3812316 al gene MLXIPL (come le proteine interagenti MLX) con livelli di trigliceridi circolanti ridotti e hanno riferito che la dieta mediterranea riesca a modificare le concentrazioni dei trigliceridi (TG). Gli effetti protettivi della dieta mediterranea sul rischio cardiovascolare sono stati evidenziati principalmente nei soggetti che presentavano una maggiore aderenza a tale approccio dietetico. In particolare, questo studio ha sottolineato che la riduzione del rischio cardiovascolare, correlata all'adesione alla dieta mediterranea, fosse particolarmente accentuata nei portatori dell'allele G sul locus MLXIPL [219]

La lunghezza dei telomeri è oggi considerata un marker dell'età biologica e recentemente è stato descritto il suo coinvolgimento nell'interazione gene-dieta. Altri studi, in particolare lavori osservativi ed ex vivo, hanno riferito che un'adesione alla dieta mediterranea sembra essere correlata, a lungo termine, ad una maggiore lunghezza dei telomeri. Ad esempio, Garcia Calzon et al. hanno osservato la presenza di telomeri più lunghi nelle donne che si univano all'approccio dietetico mediterraneo, tuttavia tale evidenza non è stata riscontrata nei maschi [220].

Ulteriori analisi suggeriscono che alcune varianti geniche potrebbero svolgere un ruolo nel modulare la lunghezza dei telomeri in soggetti che seguono un regime dietetico di tipo mediterraneo. Per esempio, è stato considerato il polimorfismo Pro/Ala del *peroxisome proliferator activated receptor* $\gamma 2$. Sembrava che i portatori della variante Ala avessero telomeri più lunghi. Altre osservazioni riportate erano relative al miglioramento dei parametri dell'obesità e dei marker infiammatori: queste modifiche probabilmente portano ad un rallentamento del processo di accorciamento dei telomeri [221] [222] [223].

Un gruppo di 521 soggetti dello studio PREDIMED è stato sottoposto ad analisi genetica al fine di valutare l'espressione dell'allele Ala in rs1801282 del gene

PPAR γ 2 (*peroxisome proliferator activated receptor γ 2*). Dopo un follow-up di cinque anni, è stato osservato che i soggetti aventi una costante aderenza alla dieta mediterranea mostravano benefici a causa dei loro telomeri più lunghi. Il rilevamento di un'interazione tra gene e dieta potrebbe rappresentare un ulteriore elemento che evidenzia l'importanza di approcci dietetici personalizzati al fine di favorire un invecchiamento in buona salute [224].

Il gene CLOCK è stato recentemente studiato da Garcia Ros e colleghi al fine di fornire dati sull'ipotesi che l'adesione abituale a un modello dietetico sano possa influenzare positivamente il metabolismo del glucosio: questo effetto sembrava essere mediato dall'interazione con il SNP rs1801260 nel gene CLOCK. Un altro studio di Lopez Guimera et al. ha valutato l'interazione del polimorfismo CLOCK 3111T / C nella risposta al programma di perdita di peso: gli autori hanno scoperto che tale polimorfismo sembrava avere effetti sul comportamento alimentare emotivo, influenzando così la perdita di peso. Alla luce di questi risultati, la predisposizione genetica e una maggiore esposizione ad un regime dietetico mediterraneo sembrano agire su diversi end point, come il profilo lipidico, il metabolismo del glucosio, il comportamento alimentare emotivo e la lunghezza dei telomeri [225] [226].

5.2 RUOLO DELL'EPIGENETICA

Nel contesto dell'interazione genico-dietetica, si colloca l'epigenetica, un'affascinante area di ricerca che in futuro potrebbe consentire di comprendere le basi molecolari di suddetta interazione, e quindi di prevedere il rischio di sviluppare malattie, nonché la possibilità di aiutare a definire strategie di prevenzione e approcci terapeutici. L'epigenetica è definita come quell'insieme di meccanismi in grado di causare alterazioni nell'espressione genica senza determinare la modifica della sequenza del DNA. I meccanismi epigenetici si esplicano a livello dello RNA non codificante, attraverso la metilazione del DNA o le modifiche istoniche [227]. La dieta può produrre alterazioni dell'epigenoma, ad esempio alcuni nutrienti costituiscono componenti che donano metile, come metionina, acido folico, vitamine del gruppo B, colina. Il primo impatto dei nutrienti e il loro eventuale squilibrio presenta effetti dalla vita fetale; infatti, studi condotti su modelli animali, ma anche

studi sull'uomo, suggeriscono che un alterato apporto di nutrienti durante i periodi gestazionali, determini nell'infanzia un rischio maggiore di mortalità per malattie cardiovascolari. Sia l'eccesso che le carenze di alcuni componenti dietetici potrebbero indurre alterazioni epigenetiche che risultano così ereditate e in grado di influenzare il fenotipo. A questo proposito, studi precedenti [228] [229] hanno riportato una significativa relazione tra carenza di nutrienti materni e perturbazione epigenetica che porta ad un rischio cardiovascolare più elevato e ad un aumentato rischio di sviluppo di malattie croniche.

I dati accumulati sottolineano l'intricata relazione esistente tra dieta, specifica componente alimentare e meccanismi epigenetici. Gli studi sull'ampia associazione epigenomica sono un interessante nuovo campo di ricerca che potrebbe consentire di definire il ruolo chiave dell'epigenetica e i suoi cambiamenti nel contesto dello sviluppo della malattia in risposta alla dieta e ai fattori ambientali.

Numerosi studi hanno riportato che i microRNA sono, tra le altre funzioni, regolatori di numerosi processi come apoptosi, metabolismo lipidico, differenziazione cellulare e metabolismo del glucosio. I microRNA agiscono inducendo il silenziamento dei loro geni bersaglio al fine di inibire l'mRNA [230]. Essi agiscono come inibitori post-trascrizionali dell'espressione genica attraverso il legame ad elementi di riconoscimento dei microRNA all'interno della regione 3 non tradotta (UTR) dei loro mRNA target [231]. La regione maggiormente critica per questo legame e per l'effetto di repressione post-trascrizionale è stata denominata "seed site". I polimorfismi a singolo nucleotide di determinati geni possono alterare il legame del microRNA creando un nuovo "seed site" o smantellando un sito già esistente [232] [233].

Richardson et al. hanno osservato che l'allele minore del polimorfismo a singolo nucleotide rs13702 nel gene 3-UTR del LPC8 (lipoproteina lipasi) ha determinato l'interruzione del sito di riconoscimento per il miRNA410. Questo effetto ha comportato un aumento della funzionalità e infine la riduzione dei livelli plasmatici di trigliceridi.

Il polimorfismo a singolo nucleotide del gene "fat mass and obesity-associated" (FTO rs9939609) è stato associato ad un incremento del peso corporeo, ad un incrementato BMI e ad altri tratti associati al rischio cardiovascolare [234] [235].

Il gene Fat Mass and Obesity (FTO) e quello per il recettore della melanocortina 4 (MC4R) sono loci associati significativamente alla obesità [236] [237] [238]. Entrambi i geni sono stati riportati come altamente espressi nell'ipotalamo di ratti [239] suggerendo un loro ruolo chiave nella regolazione centrale dell'equilibrio energetico e dell'appetito [240] [241]. Variazioni comuni a carico di questi geni siano stati associati ad un maggiore BMI ed al rischio di obesità in numerosi studi ed in alcune metanalisi [242] [243].

Il gene per il transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) rappresenta il più potente e replicato locus associato al diabete mellito di tipo 2 [244] [245], tutt'oggi solo pochi studi ne hanno esaminato la possibile associazione con le patologie cardiovascolari [246]. Analogamente non risulta ancora chiara l'associazione tra questo gene, il diabete mellito di tipo 2, le concentrazioni plasmatiche di glucosio, i livelli di lipidi plasmatici ed altri fattori di rischio cardiovascolare, nonché gli eventi cardiovascolari maggiori. Una migliore comprensione di queste possibili associazioni e delle eventuali interazioni con fattori dietetici potrebbe essere cruciale nel migliorare o progettare nuove tipologie di interventi di prevenzione primaria delle malattie cardiovascolari nei soggetti ad elevato rischio. Il prodotto della trascrizione di TCF7L2 è una "high-mobility box-containing transcription factor" che svolge un ruolo nell'attivazione di numerosi geni. Il meccanismo attraverso cui TCF7L2 risulta associato al diabete mellito di tipo 2 deve ancora essere chiarito sebbene siano stati proposti numerosi meccanismi ipotetici [247] [248]. Il polimorfismo TCF7L2-rs7903146 rappresenta una delle più importanti varianti genetiche in grado di influenzare il rischio di diabete mellito di tipo 2 [245]. La prevalenza dell'allele 7903146T, associata ad un maggiore rischio di diabete mellito di tipo 2, è minore di quella dell'allele C nella popolazione di origine caucasica. Helgason et al. hanno riportato come l'allele rs7903146T rappresenti probabilmente l'allele ancestrale, suggerendo come variazioni della sua prevalenza possano essere dovute ad una selezione positiva indotta da vari fattori tra cui anche fattori di ordine dietetico [249].

CAPITOLO VI

EFFETTI DELLA DIETA MEDITERRANEA SUGLI INDICI DI DISFUNZIONE ENDOTELIALE, SULL'ESPRESSIONE SIE- RICA DEI MARKERS ADIPOINFIAMMATORI E DEL PAT- TERN CERAMIDICO E SULLA MODULAZIONE EPIGENO- MICA DEI POLIMORFISMI TARGET

6.1 OBIETTIVI DEL PROGETTO DI RICERCA

In relazione all'esperienza scientifica maturata dal nostro gruppo in merito alla relazione tra polimorfismi genetici e rischio cerebrovascolare, per quel che concerne gli effetti dell'aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo sulle differenti tipologie di ictus ischemico e sulla loro espressività clinico prognostica, ed in considerazione dei pochi studi finora esistenti in letteratura ed inerenti ad un possibile effetto modulatore sull'espressione di alcuni polimorfismi indotti dall'aderenza al regime dietetico mediterraneo e aventi cruciale impatto cardiovascolare, abbiamo disegnato un progetto di studio allo scopo di valutare la prevalenza in una popolazione di pazienti ad elevato rischio cardiovascolare:

- 1) La prevalenza in una popolazione di pazienti ad elevato rischio cardiovascolare dei seguenti polimorfismi genetici:
 - microRNA-410 target site polymorphism (rs13702T.C)
 - polimorfismo della 3-untranslated region del gene per la lipoproteinlipasi (LPL)
 - polimorfismo del gene FTO rs9939609
 - polimorfismo TCF7L2 rs7903146
 - polimorfismo MC4R rs17782313
- 2) Differenze nei Mediterranean Diet Score nei soggetti ad elevato rischio cardiovascolare in relazione alla presenza dei diversi polimorfismi genetici
- 3) Differenze ad una analisi di tipo retrospettivo nella prevalenza di eventi cardio e cerebrovascolari in relazione alla aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo in relazione ai diversi polimorfismi

- 4) Possibili effetti ad un follow up di due anni della educazione ed implementazione di un regime dietetico di tipo mediterraneo arricchito di olio extravergine di oliva sugli eventi cardio e cerebrovascolari e sul rischio cardio e cerebrovascolare nei soggetti con diverse varianti dei polimorfismi analizzati.

Ulteriore obiettivo del nostro studio è quello di analizzare gli effetti indotti dall'aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo sulla modulazione delle concentrazioni sieriche di ceramidi e adipochine infiammatorie, correlandole ad indici di rischio cardiovascolare surrogato e di disfunzione endoteliale, come l'RHI (reactive hyperemia index), valutati attraverso metodica non invasiva con il device EndoPAT2000.

6.2 MATERIALI E METODI

Sono stati presi in considerazione 103 casi e 52 controlli di pazienti afferenti presso il Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica della Università degli Studi di Palermo ed a potenziale elevato rischio cardiovascolare nel periodo compreso tra settembre 2018 e dicembre 2020. I soggetti eleggibili sono soggetti di sesso maschile di età compresa tra i 55 e gli 80 anni e soggetti di sesso femminile di età compresa tra i 60 e gli 80, risultati positivi per almeno due tra i seguenti criteri di arruolamento:

- 1) Diabete mellito di tipo 2
- 2) Ipertensione arteriosa
- 3) BMI \geq 25
- 4) Fumo attivo
- 5) Storia familiare di malattia cardiovascolare precoce
- 6) Pregressi eventi cardio o cerebrovascolari (> 6 mesi)

6.3 DEFINIZIONE DEI FATTORI DI RISCHIO

All'ingresso in reparto per ogni paziente è stata raccolta una attenta anamnesi ed è stato eseguito un esame obiettivo. Per ogni soggetto, inoltre, venivano eseguiti: routine di laboratorio, esami strumentali (ecocardiogramma M-mode e 2D con ecocolor-Doppler, ecocolor-Doppler dei vasi epiaortici).

La presenza di diabete è stata definita in presenza dei criteri ADA 2018 o in presenza di un precedente trattamento dietetico, antidiabetico orale o insulinico prima dell'ingresso in reparto.

L'ipertensione arteriosa è stata valutata mediante i criteri ESC/ESH 2019.

L'ipercolesterolemia è stata definita in relazione alla presenza di livelli sierici di colesterolo totale ≥ 5.1 mmol/L, mentre l'ipertrigliceridemia per valori ≥ 1.7 mmol/L in accordo con i criteri NCEP-ATP III.

L'ictus è stato definito attraverso la presenza di un quadro clinico caratterizzato dalla presenza di segni o sintomi neurologici focali ritenuti di origine vascolare che persistevano per >24 ore, confermati da TC cerebrale e/o RM in basale e TC cerebrale eseguita dopo 48-72 ore.

6.4 CRITERI DI ESCLUSIONE

Sono stati esclusi tutti i pazienti con eventi cardiovascolari o cerebrovascolari recenti (< 6 mesi).

6.5 VALUTAZIONE DELLA ADERENZA ALLA DIETA MEDITERRANEA

Le informazioni relative alle abitudini dietetiche dei pazienti arruolati sono state raccolte mediante apposito questionario (semi-quantitative food frequency questionnaires (FFQs) [250] dedicato alla valutazione della frequenza dei diversi alimenti nella dieta ed adattato alla popolazione del Sud Italia.

La aderenza dei soggetti arruolati nello studio ad un regime dietetico del tipo Dieta Mediterranea è stata valutata mediante l'utilizzo del Mediterranean Diet Score utilizzato per valutare il consumo e la frequenza degli elementi caratterizzanti un regime dietetico di tipo mediterraneo.

I punteggi da 0 a 5, o viceversa, sono stati assegnati in ciascuno dei gruppi di alimenti secondo la loro posizione nella piramide della dieta mediterranea. Per il consumo di prodotti presunti essere vicino a questo modello (quelli suggeriti su base giornaliera o più di 3 porzioni a settimana, vale a dire, cereali non raffinati, frutta, verdura, legumi, olio d'oliva, pesce e patate):

- punteggi pari a 0 sono stati assegnati quando veniva segnalato nessun consumo
- punteggi da 1 a 5 per consumi compresi per frequenza tra rara ed il consumo quotidiano

Per il consumo di alimenti che si presume essere lontani da questo modello di dieta (consumo cioè rare o mensile, a base di carne e prodotti di carne, pollame e prodotti completi di grassi) i punteggi sono stati assegnati su scala inversa (cioè, da 5 quando qualcuno non ha segnalato il consumo e 0 veniva riferito consumo quasi quotidiano).

Soprattutto per l'alcol è stata applicata una funzione non monotona, cioè segnare 5 per il consumo di meno di 300 ml di alcol al giorno, punteggio 0 per nessun consumo o per il consumo di >700 ml al giorno e i punteggi da 4 a 1 per il consumo di 600 -700, 500-600, 400-500 e 300-400 ml al giorno (100 ml hanno 12 g concentrazione di etanolo).

I soggetti arruolati sono stati classificati in relazione all'aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo secondo le modalità indicate da Trichopoulou et al, che considera un punteggio massimo di 9 punti ed [251]:

- aderenza bassa: 0-7 punti
- aderenza moderata: 8-10 punti
- aderenza elevata: 11-17 punti

6.6 VALUTAZIONE NON INVASIVA DELLA FUNZIONE ENDOTELIALE MEDIANTE ENDOPAT-2000

L'Endo-PAT2000 è uno strumento non invasivo creato per rilevare la funzione endoteliale. In seguito sono state aggiunte le funzioni relative alla misurazione della rigidità arteriosa (Augmentation Index) e quelle per il calcolo del profilo di rischio cardiovascolare.

La valutazione della funzionalità endoteliale si basa sulla risposta arteriosa periferica valutata a livello della falange distale del dito indice dopo induzione di un periodo di ischemia nel braccio (occlusione di circa 5 minuti dell'arteria

brachiale) e successivo ripristino del flusso di sangue.

L'indice RHI (indice di iperemia reattiva) rappresenta il rapporto tra il volume in presenza del tono arterioso nel dito provocato dalla condizione di ischemia e lo stesso volume in condizioni basali ed esprime lo "stato di salute" dell'endotelio.

Il valore può essere espresso in termini numerici (RHI cut-off 1.67) o attraverso il logaritmo naturale (\ln RHI cut off 0.51); in entrambi i casi valori sopra tale soglia indicano una funzione endoteliale conservata, al di sotto una "disfunzione endoteliale".

Lo strumento è inoltre in grado di valutare la rigidità arteriosa mediante l'Augmentation Index o AI; entrambi questi indici riflettono l'aumento della pressione che si verifica dopo il picco sistolico, causato dall'onda riflessa dalla periferia e vengono calcolati automaticamente dal software abbinato allo strumento opportunamente installato su un PC.

Per eseguire l'esame vengono utilizzate particolari sonde (probe) da posizionarsi all'estremità di un dito (solitamente l'indice) di entrambe le mani.

L'Endo-PAT2000 può offrire a ricercatori e clinici uno strumento affidabile, che fornisce un risultato operatore- indipendente superiore agli altri metodi di misura della funzionalità endoteliale attraverso l'utilizzo della tecnologia PAT.

La Tonometria Arteriosa Periferica (PAT) è una tecnologia brevettata, che consente la misura non invasiva dell'ampiezza e delle variazioni del tono arterioso nei vasi arteriosi periferici. L'Endo-PAT2000 impiega questa tecnologia per misurare il segnale PAT alla punta di un dito registrando le variazioni pulsatili del volume delle arterie. Il sistema Endo-PAT2000 non è invasivo e comprende uno strumento di misura che supporta una coppia di sonde (pletismografi) capaci di sottoporre a pressione uniforme un'area precisa delle falangi delle dita.

Questa modalità è estremamente importante in quanto:

- previene la stasi del sangue venoso che può indurre una vasocostrizione veno-arteriolare riflessa;
- aumenta fortemente il range delle variazioni di volume determinate dal flusso di sangue mediante dispersione della tensione della parete arteriosa;
- previene il flusso di sangue venoso retrogrado che potrebbe inficiare la misurazione;

- fissa saldamente la sonda al dito con riduzione di eventuali falsi segnali dovuti al movimento.

6.6.1 Fisiologia ed ENDOPAT-2000

L'Endo-PAT2000 ha alcune proprietà esclusive che concorrono a rendere affidabile il risultato:

- A. Applicando una sonda ad un dito di ogni braccio il paziente funge da proprio controllo interno: mentre un braccio viene utilizzato per il test l'altro braccio fornisce dati su eventuali variazioni vascolari sistemiche, quali ad es. i mutamenti nel tono simpatico. Ciò consente a Endo-PAT2000 di correggere le variazioni sistemiche spontanee, che avvengono durante il periodo della misura;
- B. La capacità di una arteria a dilatarsi dipende (tra le altre cose) dal suo diametro a riposo. Questa capacità potenziale influenza sostanzialmente la risposta ad una ischemia indotta.
Pertanto, la dilatazione flusso mediata delle arterie dipende dalla loro capacità potenziale a dilatarsi. Questa dipendenza dal livello del tono vascolare pre-occlusione viene normalizzato mediante una correzione calcolata considerando il segnale PAT in condizioni basali.
- C. L'induzione di una ischemia temporanea (solitamente 5 minuti) è la modalità più comune per attivare in modo non invasivo l'endotelio. L'occlusione della arteria viene di solito ottenuta gonfiando un manicotto per la pressione arteriosa ad un valore sopra sistolico (>60 mmHg). Comunque, anche a queste pressioni, ci potrebbe essere un passaggio di sangue, che irrori i tessuti a valle prevenendo l'appropriata mancanza di ossigeno. Endo-PAT2000 possiede la sensibilità e la capacità di quantificare la qualità della occlusione della arteria brachiale. Questa capacità è assente nella tecnica BAUS (Brachial Artery Ultra-Sound) che si affida solamente alla qualità della occlusione prodotta dallo sfigmomanometro ed è fortemente operatore- dipendente richiedendo il ricorso ad una sonda ad ultra suoni ad elevata risoluzione.

6.6.2 Analisi Automatica

Il software di Endo-PAT ha due principali fasi operative:

- A) Acquisizione on-line dei dati
- B) Analisi off-line dei dati

Dal momento che il sistema registra i dati in tempo reale, è possibile seguire gli eventi man mano che questi avvengono. I dati acquisiti durante l'esame sono conservati automaticamente nell'hard disk del computer e possono essere riprodotti successivamente per una valutazione offline e per l'analisi automatica.

Dal momento che l'analisi viene eseguita automaticamente, non sussiste alcun problema per la sua interpretazione e, quindi, viene meno la variabilità intra- / inter-operatore.

Il software genera un foglio Excel con tutti i parametri della valutazione fornendo un database auto-aggiornato ad ogni esame che viene eseguito. Ciò è stato realizzato per facilitare il lavoro scientifico fornendo un archivio di semplice ricerca dei dati registrati.

6.6.3 Analisi dell'Augmentation Index (AI)

L'Augmentation Index (AI) viene calcolato automaticamente analizzando la forma dell'onda del segnale PAT, quale media di segnali multipli durante il periodo basale. L'indice PAT-AI è stato validato al Memory Medical School (dati non pubblicati) mediante un altro sistema disponibile commercialmente.

6.6.4 Studi realizzati tramite ENDOPAT

Numerosi studi sono stati realizzati per valutare attraverso l'endopat-2000 il grado di disfunzione endoteliale in diverse condizioni patologiche. Notevoli differenze sono state evidenziate fra i sessi e nelle diverse razze, infatti le donne tendenzialmente hanno un grado di disfunzione endoteliale minore che non sembrerebbe completamente spiegabile attraverso gli ormoni femminile o lo stato importanti implicazioni sullo stato di salute dei vasi [252]. La razza nera ha, invece, un grado di disfunzione endoteliale più marcato, le alterazioni delle onde e della rigidità dei vasi in questa popolazione potrebbero rappresentare importanti fattori di rischio cardiovascolare. [253] [254]

6.7 RANDOMIZZAZIONE

I soggetti arruolati, dopo la valutazione del grado di aderenza ad un regime dietetico del tipo Dieta Mediterranea, sono stati randomizzati a due diversi tipi di approccio dietetico:

1. Gruppo A: Dieta Low Fat: per cui i soggetti arruolati hanno ricevuto un “counseling” di tipo dietetico a partire dalla loro prima visita di arruolamento e, successivamente, ogni sei mesi per tutta la durata dello studio (tre anni)
2. Gruppo B: Dieta Mediterranea + olio extravergine di oliva (EVOO) (1 litro di alla settimana)

Per entrambi i gruppi l’adesione ad un regime dietetico di tipo mediterraneo è stata valutata mediante uno screening dietologico per monitorizzare l’adesione ad un regime dietetico di tipo mediterraneo ad ogni visita di controllo (ogni tre mesi)

6.8 ENDPOINT DEL PROGETTO DI RICERCA

1. Distribuzione dei polimorfismi genetici selezionati nei soggetti arruolati in relazione al grado di aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo
2. Prevalenza degli eventi cardio e cerebrovascolari (cardiopatía ischemica, pregresso ictus ischemico, arteriopatia periferica degli arti inferiori in relazione al grado di aderenza al regime dietetico di tipo Mediterraneo ed in relazione alla distribuzione dei polimorfismi genetici presi in esame)
3. Effetti dei due regimi dietetici (dieta mediterranea o dieta mediterranea + EVOO) sulla incidenza di eventi cardio e cerebrovascolari al follow up considerando rispettivamente:
 - a. un endpoint composito: infarto del miocardio, ictus ischemico e morte per cause cardiovascolari
 - b. endpoint secondario: infarto del miocardio, ictus cerebrale, morte per cause cardiovascolari

6.9 VALUTAZIONE DI TIPO BIOCHIMICO

Campioni di sangue sono stati ottenuti al mattino dopo almeno dieci ore di digiuno e sono stati conservati mediante crioconservazione a -80°.

I livelli plasmatici a digiuno di glucosio, colesterolo totale, trigliceridi, colesterolo HDL, colesterolo LDL sono stati misurati mediante le tradizionali metodiche di tipo enzimatico.

Nei partecipanti nei quali sono stati riscontrati livelli di trigliceridi <440 mg/dl, le concentrazioni di colesterolo LDL sono state determinate mediante la applicazione della formula di Friedewald.

6.10 ANALISI GENETICA

6.10.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI BIOLOGICI

Dopo avere ottenuto un consenso informato da parte dei pazienti, sono stati raccolti campioni di sangue periferico collezionati in EDTA, o di plasma e di siero e conservati alla temperatura di - 20°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

6.10.2 ESTRAZIONE DEL DNA DA SANGUE INTERO

Il DNA è stato estratto su colonna sfruttando il principio della cromatografia per affinità tramite Qia Amp DNA Blood mini Kit (Qiagen).

La resa e l'integrità del DNA è stata valutata attraverso la misura di densità ottica, con uno spettrofotometro UV (ratio 260/280 nm < 2).

6.10.3 GENOTIPIZZAZIONE MEDIANTE SAGGIO DI DISCRIMINAZIONE ALLELICA IN REAL TIME PCR

Lo studio dei Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNP) è stato effettuato in Real Time PCR mediante un saggio di discriminazione allelica con sonde Taqman allele-specifiche contenenti come marcatori i fluorocromi FAM o VIC, che ha permesso di evidenziare le due varianti di sequenza di acido nucleico. Sono stati utilizzati i seguenti assays:

- C_29347861_10, rs7903146, SNP di TCF7L2
- C_32667060_10, rs17782313, di MC4R
- C_30090620_10, rs9939609, SNP di FTO

- C_29347861_10, rs7903146, SNP di TCF7L2
- C_9639448_10, rs13702, SNP di LPL

L'amplificazione è stata effettuata utilizzando la Real Time PCR StepOnePlus, fornita dalla Applied Biosystems e l'analisi dei risultati è stata eseguita tramite il software SDS versione 2.3.

I dati sono stati collezionati in un diagramma, che ha riportato la fluorescenza associata a ciascuna variante allelica relativa a ciascuno SNP studiato.

Ciascuna seduta di discriminazione allelica è stata validata dall'utilizzo di un campione omozigote per l'allele 1, un campione omozigote per l'allele 2 e un campione eterozigote per i polimorfismi in oggetto, precedentemente determinati con altra metodica (sequenziamento). Inoltre sono stati inseriti random nella piastra almeno tre NTC (no template control) che contengono tutti i reattivi eccetto il DNA, sostituito da acqua DEPC, allo scopo di evidenziare eventuali contaminazioni che invaliderebbero la seduta.

Per ciò che concerne l'interpretazione del risultato, la risposta è univoca e definisce lo stato di omozigote per uno o l'altro allele o di eterozigote del soggetto.

6.10.4 ANALISI STATISTICA

Il test χ^2 è stato usato per valutare le differenze nelle percentuali relative alle frequenze dei diversi genotipi dei polimorfismi analizzati assumendo che siano in equilibrio di Hardy–Weinberg.

I test T di student ed ANOVA sono stati usati per confrontare le medie.

Correzioni per le variabili continue alla analisi multivariata sono state condotte mediante l'analisi di covarianza e i modelli sono stati corretti per l'età, il sesso, il BMI, il diabete di tipo 2, l'attività fisica ed i possibili farmaci praticati (antidiabetici, statine, farmaci antiipertensivi).

Allo scopo di valutare l'interazione tra i diversi polimorfismi analizzati e l'aderenza alla dieta mediterranea sulla base dei diversi fattori di rischio cardiovascolare in baseline, sono stati utilizzati diversi modelli di regressione logistica

Allo scopo di analizzare l'associazione tra i diversi gradi di aderenza alla dieta mediterranea e gli eventi cardiovascolari sono stati usati dei modelli di regressione di COX con la durata del follow-up come principale variabile temporale.

Lo scopo era quello di valutare sia l'associazione pre-randomizzazione tra aderenza alla dieta Mediterranea (bassa, moderata ed alta), sia quella tra il tipo di intervento dietetico a cui sono stati randomizzati i pazienti nel periodo post-randomizzazione, e l'incidenza di eventi cardiovascolari. Per tale motivo "Odds ratios" (ORs) (per la componente retrospettiva pre-randomizzazione del progetto) e gli "Hazard ratios" (HRs) (per la componente longitudinale post-randomizzazione del progetto) entrambi con il 95% di intervallo di confidenza (95%CI) sono stati valutati per ciascuno dei polimorfismi analizzati e sono stati calcolati e stratificati in relazione al grado di adesione alla Dieta Mediterranea valutata mediante Med Diet Score.

Nel modello di analisi multivariata le variabili sono rappresentate da sesso, età e gruppo di intervento dietetico, ed ulteriori correzioni sono state effettuate per la presenza di diabete mellito di tipo 2, fumo ed aderenza pre-randomizzazione alla Dieta Mediterranea.

6.11 RISULTATI

Sono stati arruolati 103 soggetti nel braccio dieta mediterranea e 52 soggetti nel gruppo di controllo di pazienti sottoposti a dieta "low fat"

Le caratteristiche demografiche, cliniche e di laboratorio dei soggetti arruolati e dei controlli sono elencati in tabella 1.

Tabella 1. Variabili quantitative e qualitative gruppi casi – controlli al T0

VARIABILE	CASI (N=101)	CONTROLLI (N=52)	P (INTER GRUPPO)
ETÀ (ANNI)	68.31 ± 10.61	65.08 ± 7.69	0.056
SESSO (M/F)	49/49	34/17	0.13
PAS (MMHG)	128.17 ± 10.78	126.92 ± 14.35	0.548
PAD (MMHG)	78.07 ± 12.32	74.71 ± 13.07	0.120
PESO (KG)	85.29 ± 17.55	82.73 ± 12.73	0.352

ALTEZZA (CM)	170.1 ± 5.3	165.73 ± 6.74	-
BMI	28.7 ± 5.6	30.19 ± 4.87	-
COLESTEROLO TOTALE (MG/DL)	136.26 ± 39.82	126.09 ± 35.20	0.122
COLESTEROLO HDL	39.94 ± 14.07	39.65 ± 15.81	0.909
COLESTEROLO LDL	69.18 ± 24.98	76.09 ± 87.15	0.459
TRIGLICERIDI (MG/DL)	111.91 ± 76.39	107.32 ± 49.07	0.695
MICROALBUMINURIA (MG/24H)	140.97 ± 97.06	184.89 ± 96.79	0.992
CREATININA (MG/DL)	1.09 ± 0.42	1.44 ± 1.22	0.010
EGFR (CKD-EPI)	68.14 ± 26.9	63.82 ± 47.99	0.476
VES	18.88 ± 16.40	13.98 ± 11.87	0.133
PCR (MG/DL)	11.09 ± 10.78	7.34 ± 5.64	0.002
EF	48.86 ± 8.80	27.15 ± 26.38	< 0.005
RWT N (%)	62 (61)	35 (67)	0.295
LAV N (%)	68 (67)	25 (48)	0.029
LVMi N (%)	46 (45)	14 (26)	0.084
RHI	1.69 ± 0.57	1.68 ± 0.56	0.998
AIX	6.76 ± 20.60	8.52 ± 11.24	0.588
VISFATINA	15.59 ± 3.19	22.46 ± 4.24	0.295
RESISTINA	10.83 ± 1.49	10.26 ± 1.67	0.035
ADIPONECTINA	23.11 ± 3.98	22.46 ± 4.24	0.353
C24:0	2.23 ± 0.19	2.15 ± 0.21	0.029
C16:0	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	< 0.005
C22:0	0.60 ± 0.03	0.55 ± 0.04	< 0.005
C18:0	0.53 ± 0.05	0.52 ± 0.04	0.208
C24:0/C16:0	11.47 ± 0.84	11.38 ± 0.91	0.549

CARDIOPATIA ISCHEMICA N (%)	39 (38)	25 (48)	0.171
DIABETE N (%)	55 (54)	29 (55)	0.507
AOCP N (%)	12 (11)	5 (9)	0.44
PLACCA N (%)	95 (94)	38 (73)	< 0.005
ICTUS/TIA N (%)	14 (13)	5 (9)	0.316
MALATTIA RENALE CRO- NICA N (%)			< 0.005
STADI NFKDOQI			
I	26 (25)	16 (30)	
II	32 (31)	14 (26)	
IIIA/IIIB	20 (19) / 17 (16)	5 (4) / 3 (5)	
IV	6 (5)	0	
V	0	14 (26)	
FUMO N (%)	40 (39)	29 (55)	0.042

Al follow up di 6 mesi dall'arruolamento è stato osservato, nei soggetti sottoposti a dieta mediterranea, una significativa riduzione dei livelli sierici di colesterolo totale, LDL, trigliceridi (vedi tabella n.2)

Tabella 2. Variabili quantitative e qualitative gruppi casi – controlli al T1

VARIABILE	CASI (N=101)	CONTROLLI (N=52)	P (INTER GRUPPO)
ETÀ (ANNI)	68.31 ± 10.61	65.08 ± 7.69	0.056
SESSO (M/F)	49/49	34/17	0.13
PAS (MMHG)	124.75 ± 10.05	126.76 ± 14.20	0.315
PAD (MMHG)	77.18 ± 10.06	73.37 ± 13.12	0.048
PESO (KG)	80.71 ± 14.54	83.13 ± 12.68	0.311
ALTEZZA (CM)	166.46 ± 6.74	165.73 ± 6.74	0.788
BMI	29.09 ± 4.60	30.14 ± 4.59	0.183

COLESTEROLO TOTALE (MG/DL)	126.93 ± 29.40	125.07 ± 34.81	0.726
COLESTEROLO HDL	40.20 ± 13.96	39.36 ± 15.81	0.737
COLESTEROLO LDL	67.8 ± 28.27	64.05 ± 24.37	0.408
TRIGLICERIDI (MG/DL)	104.06 ± 35.90	107.32 ± 49.07	0.641
MICROALBUMINURIA (MG/24H)	141.59 ± 43.43	134.88 ± 77.74	0.151
CREATININA (MG/DL)	<u>1.09 ± 0.42</u>	1.40 ± 1.21	0.021
EGFR (CKD-EPI)	37.91 ± 38.84	-	-
VES	-	-	-
PCR (MG/DL)	19.44 ± 13.45	11.51 ± 9.88	0.226
EF	-	-	-
RWT N (%)	-	-	-
LAV N (%)	53 (52)	31 (59)	0.401
LVMI N (%)	60 (59)	24 (46)	0.083
RHI	2.07 ± 0.41	1.74 ± 0.58	< 0.005
AIX	15.93 ± 12.20	35.39 ± 17.28	0.232
VISFATINA	12.32 ± 1.83	15.13 ± 3.29	< 0.005
RESISTINA	9.70 ± 1.02	10.25 ± 1.14	0.003
ADIPONECTINA	28.94 ± 2.98	23.22 ± 4.37	< 0.005
C24:0	1.96 ± 0.22	2.19 ± 0.23	< 0.005
C16:0	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.816
C22:0	0.60 ± 0.03	0.57 ± 0.04	< 0.005
C18:0	0.53 ± 0.04	0.53 ± 0.04	0.902
C24:0/C16:0	12.11 ± 0.90	11.60 ± 1.13	0.003
CARDIOPATIA ISCHEMICA N (%)	39 (38)	25 (48)	0.171

DIABETE N (%)	55 (54)	29 (55)	0.507
AOCP N (%)	12 (11)	5 (9)	0.44
PLACCA N (%)	95 (94)	38 (73)	< 0.005
ICTUS/TIA N (%)	14 (13)	5 (9)	0.316
MALATTIA RENALE CRO- NICA N (%)			< 0.005
<u>STADI NFKDOQI</u>			
I	26 (25)	16 (30)	
II	32 (31)	14 (26)	
IIIA/IIIB	20 (19) / 17 (16)	5 (4) / 3 (5)	
IV	6 (5)	0	
V	0	14 (26)	
FUMO N (%)	44 (39)	25 (55)	0.359

È stata, inoltre, osservata una significativa riduzione dei livelli sierici di visfatina e resistina ed un significativo incremento dei livelli sierici di adiponectina. (vedi tabella n.3)

I risultati mostrano anche una significativa riduzione dei livelli sierici di tre delle quattro ceramidi selezionate (C22:0, C16:0 e C24:0) ed un significativo incremento dei livelli del rapporto C24:0/C16:0

Analogo trend è stato osservato al follow up di 9 mesi.

6.12 DISCUSSIONE

La dieta mediterranea (Me-Di) è diventata il prototipo di una vita sana ed è riconosciuto il suo ruolo cardine nella riduzione degli eventi cardiovascolari. È caratterizzata da un'elevata assunzione di frutta, noci, verdure, legumi, cereali, pesce e altri frutti di mare, un basso apporto di latticini e carne, e un consumo moderato di etanolo, principalmente sotto forma di vino durante i pasti.

Alcuni studi hanno riportato come l'aderenza moderata o rigorosa ad una Me-Di sia in grado di proteggere da un rischio maggiore di formazione di placche aterosclerotiche, che può mediare la protezione contro eventi vascolari clinici.

Il nostro studio si è posto come obiettivo quello di valutare la correlazione tra l'aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo e l'aumento dell'RHI (indice indiretto di disfunzione endoteliale) e della rigidità arteriosa (valutata mediante AI), definiti come marcatori di rischio cardiovascolare “surrogati”.

L'endotelio è oggi considerato un organo autocrino-paracrino che gioca un ruolo chiave nella regolazione del tono e della struttura vascolare, agendo in risposta a stimoli umorali, nervosi e meccanici. In presenza di fattori di rischio cardiovascolare, il ruolo protettivo dell'endotelio sembra alterarsi, configurando il quadro della cosiddetta “disfunzione endoteliale”, caratterizzata da una compromissione della risposta vasomotoria ai principali stimoli vasodilatatori endotelio-dipendenti.

La più importante sostanza vasodilatatrice prodotta dalle cellule endoteliali è l'ossido nitrico (NO), che origina dal catabolismo della L-arginina ad opera di un enzima costitutivo chiamato NO-sintasi (eNOS), per ossidazione del suo nitrogruppo terminale guanidinico.

Una ridotta disponibilità di NO è stata descritta negli individui con disfunzione endoteliale ed è stata associata ad una riduzione dell'attività del suddetto enzima.

I risultati ottenuti dal nostro gruppo di studio sembrerebbero mostrare come l'aderenza ad un regime dietetico mediterraneo possa migliorare la disfunzione endoteliale, determinando un incremento della sintesi di NO e, di conseguenza, un aumento dei livelli di RHI.

Di fatti, la dieta mediterranea è abbondante in noci, legumi, cereali non raffinati e pesce, tutte fonti significative di L-arginina [255].

Il NO è un trasmettitore pleiotropico implicato in vari processi fisiologici, tra cui controllo della pressione arteriosa, omeostasi del glucosio, neurotrasmissione, funzione mitocondriale, contrazione muscolare e difesa dell'ospite [256]. La ridotta biodisponibilità di NO è stata associata all'invecchiamento e a molteplici condizioni patologiche tra cui ipertensione [257], insufficienza cardiaca congestizia [258], ipercolesterolemia [259], diabete di tipo II [260] e sindrome metabolica [261]. Al contrario, l'aumento della biodisponibilità di NO è stato proposto come obiettivo fisiologico per approcci nutrizionali volti a mitigare le malattie cardiovascolari,

metaboliche e neurodegenerative legate all'età [262]. La dieta mediterranea ha un notevole potenziale nel migliorare la biodisponibilità del NO perché contiene molti alimenti ricchi di L-arginina e nitrato, due substrati chiave per la generazione endogena di NO. Inoltre, questo schema dietetico è ricco di vitamina C, polifenoli e acidi grassi n-3 a catena lunga di origine marina, che possono potenziare la produzione di NO e ridurre il degrado dell'organismo.

In effetti, studi precedenti hanno riportato benefici cardiovascolari della supplementazione con 4-24 g/die di L-arginina (una quantità raggiungibile attraverso il consumo di cibi ricchi di L-arginina) inclusa la riduzione della pressione sanguigna (sistolica: -5 mmHg; diastolica: -3 mmHg) [263], miglioramento della funzione endoteliale valutata mediante dosaggio di biomarcatori umorali [264] e riduzione dell'aggregazione piastrinica [265].

La dieta mediterranea è anche ricca di verdure, molte delle quali hanno un alto contenuto di nitrati inorganici. Questo anione inorganico, attraverso la via nitrato-nitrito-NO recentemente chiarita, può anche fungere da precursore di NO. Il consumo di circa 6-12 mmol/die di nitrato inorganico produce riduzioni simili della pressione sanguigna (sistolica: -4 mmHg; diastolica: -1 mmHg) [266], miglioramenti della funzione endoteliale [267] e inibizione dell'aggregazione piastrinica [268] come integrazione di L-arginina. Inoltre, è stato riportato che l'ingestione di nitrati inorganici migliora il flusso sanguigno cerebrale e migliora la funzione cognitiva [269], sebbene ciò non sia stato confermato in una recente revisione sistematica e meta-analisi [270]. Poiché spinaci, barbabietole, lattuga, rucola e sedano hanno un contenuto di nitrati > 4 mmol/100 g di peso fresco [271], l'assunzione di 6-12 mmol/die di nitrato è facilmente raggiungibile attraverso una dieta ricca di verdure come la dieta mediterranea (ad es. 150–300 g di verdure ricche di nitrati) [272].

La vitamina C e i polifenoli, ricavabili da frutta, verdura, vino rosso e olio d'oliva, potrebbero anche contribuire agli effetti di potenziamento di NO dati da tale schema dietetico, potenziando sia i percorsi di L-arginina che nitrati-nitrito-NO, e minimizzando lo scavenging del superossido di NO tramite effetti antiossidanti [273] [274].

In uno studio secondario condotto su 200 partecipanti allo studio di intervento

PREDIMED [275], i biomarcatori del plasma senza disponibilità (somma di nitrati e nitriti nel plasma) sono risultati aumentati nei partecipanti che consumano la dieta mediterranea integrata con olio extravergine di oliva o noci. La variazione del nitrato plasmatico più il nitrito è stata associata a una pressione sanguigna sistolica e diastolica più bassa, e c'era una correlazione positiva tra l'escrezione totale di polifenoli urinari (un biomarcatore dell'assunzione di polifenoli) e la variazione di questi biomarcatori NO. Inoltre, una dieta mediterranea, in cui il pesce viene in genere consumato 2-4 volte alla settimana, sarà ricca di acidi grassi a catena lunga come acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA). È stato dimostrato che il consumo di EPA e DHA induce vasodilatazione e aumenta le concentrazioni circolanti di metaboliti NO [276] [277]. L'incubazione di lipoproteine ricche di EPA + di DHA dal plasma umano a seguito di un pasto ricco di olio di pesce determina un aumento dell'eNOS ed una riduzione dell'espressione del gene NADPH ossidasi nelle cellule endoteliali rispetto alle lipoproteine isolate dopo un pasto di controllo [276], suggerendo che un aumento della produzione e una riduzione della degradazione ha contribuito ad un aumento complessivo della biodisponibilità di NO.

In definitiva, molti componenti della dieta mediterranea hanno il potenziale per migliorare la biodisponibilità di NO. Un classico pasto mediterraneo a base di pesce e insalata cosparsa di noci e condito con olio extravergine d'oliva potrebbe contenere L-arginina, nitrato, polifenoli, vitamina C ed EPA più DHA sufficienti a fornire una significativa "quota" di NO, con conseguenze fisiologiche benefiche.

Un ruolo preminente nella disfunzione endoteliale va assegnato anche all'inattivazione dell'NO da parte dei radicali liberi dell'ossigeno. Le specie reattive dell'ossigeno reagiscono con l'NO producendo perossinitriti, molecole cito-ossidanti, che, tramite la nitratura delle proteine cellulari endoteliali, ne alterano la funzione. I perossinitriti sono anche coinvolti nell'ossidazione delle LDL, che aumentano così il loro effetto pro-aterogeno [60] e riducono a loro volta la biodisponibilità di NO, inibendone la via biosintetica.

L'adesione alla dieta mediterranea ha effetti sullo stato infiammatorio. Considerando che la dieta occidentale a base di carne è positivamente collegata a

livelli più elevati di alcuni importanti biomarcatori dell'infiammazione, come la proteina C-reattiva (CRP), l'interleuchina-6 e il fibrinogeno, il comportamento dietetico mediterraneo è associato ad una concentrazione sierica minore di questi biomarcatori, suggerendo così un'azione antinfiammatoria dei suoi principali componenti alimentari [278].

Lo studio MOLISANI [279] è un ampio studio prospettico di coorte che ha reclutato 24.325 uomini e donne della popolazione generale della Regione Molise, confermando l'ipotesi che una dieta ricca di componenti sani sia in grado di influenzare e di ridurre la produzione di biomarcatori di infiammazione cellulare. Tali studi hanno suggerito, dunque, che l'aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo riduca lo stress ossidativo [280], l'infiammazione vascolare [281] [282] e la disfunzione endoteliale [283]. Inoltre, altri autori hanno osservato concentrazioni sieriche inferiori di VCAM-1, ICAM-1, E e P-selectina, CRP e IL-6, nonché una down-regolazione delle molecole di adesione espresse sulle superfici dei linfociti T e di monociti, dopo 3 mesi di attuazione di un regime dietetico di tipo mediterraneo [284].

Il nostro studio si è proposto, inoltre, di valutare le concentrazioni sieriche delle seguenti ceramidi: C16:0 (numero di atomi di carbonio: numero di doppi legami), C18:0, C22:0 e C24:0.

Come precedentemente esposto, le ceramidi sono lipidi bioattivi coinvolti nelle risposte cellulari e nell'apoptosi. Alcuni modelli cellulari e animali hanno riportato il ruolo patogenetico dell'accumulo di ceramidi nell'attivazione di numerosi bersagli di segnalazione che compromettono le normali funzioni cellulari. La ceramide e i suoi metaboliti sono stati segnalati come punto intermedio tra alimentazione eccessiva e anomalie metaboliche, causando un aumento del rischio di malattie cardiometaboliche, come l'insulino-resistenza e l'infiammazione.

I risultati ottenuti hanno mostrato una riduzione dei livelli sierici delle suddette ceramidi in associazione ad una maggiore aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo.

L'effetto dannoso di concentrazioni più elevate di ceramide sul rischio di CVD è stato, dunque, modificato dall'intervento della dieta mediterranea. I potenziali

meccanismi per gli effetti modulatori di tale regime dietetico sulla via della ceramide sono duplici. In primo luogo, il consumo di componenti chiave della dieta può influenzare direttamente la biosintesi della ceramide.

I dati ottenuti dal nostro gruppo di studio sono supportati da diversi studi presenti in letteratura che hanno mostrato come l'incremento delle concentrazioni sieriche di ceramidi sia associato ad una maggiore incidenza di eventi cardiovascolari maggiori.

Lo studio di Mantovani et. al. [212], ad esempio, ha valutato come la concentrazione plasmatica delle ceramidi Cer 16:0, Cer 18:0, Cer 22:0 e Cer 24:0 fossero associati alla presenza di ischemia miocardica inducibile, essendo dunque predittori positivi indipendenti di difetti di perfusione miocardica.

Wang et al. hanno valutato le concentrazioni di suddette ceramidi in una coorte di pazienti afferenti allo studio PREDIMED e hanno notato come un aumento delle stesse fosse correlato ad un maggiore rischio di andare incontro ad eventi cardiovascolari maggiori.

Questi risultati suggeriscono un'associazione positiva tra i livelli plasmatici di ceramide al basale e gli eventi cardiovascolari e riportano come l'adesione a uno stile di dieta mediterranea possa influenzare la potenziale relazione negativa tra elevate concentrazioni plasmatiche di ceramide e CVD.

Inoltre, i risultati mostrano un aumento del rapporto C24:0/C16:0, che sembra essere inversamente correlato al rischio di eventi cardio vascolari, suggerendo il ruolo di tale rapporto come nuovo biomarcatore di rischio cardiovascolare.

I nostri risultati mostrano, dunque, che l'aderenza alla dieta mediterranea comporti una riduzione dei livelli plasmatici di ceramidi, determinando una riduzione della biosintesi degli stessi, nonché un incremento del rapporto C24:0/C16:0, avente ruolo protettivo sul rischio di sviluppare patologie cardiovascolari.

È possibile ipotizzare, pertanto, che una maggiore aderenza ad uno stile di vita sano quale quello previsto dalla Dieta Mediterranea, possa determinare un miglioramento del profilo di rischio cardio e cerebrovascolare, valutabile indirettamente attraverso il monitoraggio del rapporto ceramidico esplicito sopra.

Ulteriore obiettivo del nostro progetto di ricerca è stato quello di valutare le

concentrazioni sieriche delle adipochine infiammatorie, correlando le variazioni delle stesse alla diversa aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo, a sua volta correlato ad un miglioramento della funzione endoteliale, valutata in termini di aumento dell'RHI.

I risultati ottenuti hanno mostrato come nei soggetti aventi un profilo di aderenza maggiore, rispetto al braccio in cui era stata somministrata una dieta *low fat*, vi fosse una riduzione delle concentrazioni sieriche di resistina e visfatina, ma un aumento dei livelli plasmatici di adiponectina.

La resistina umana svolge un ruolo regolatorio importante nella risposta infiammatoria [164]. La resistina sovraregola l'espressione delle citochine proinfiammatorie come TNF- α , IL-6, IL-12 e le proteine chemoattattive monocitarie (MCP) -1 in PBMC, macrofagi e cellule stellate epatiche attraverso il fattore nucleare- κ B (NF- κ B) [166]. I livelli circolanti di resistina sono correlati a marcatori infiammatori e fibrinolitici, come proteina C-reattiva (CRP), TNF- α e IL-6 nella popolazione generale e in individui con diabete mellito di tipo 2, aterosclerosi coronarica, [149]. Nelle cellule endoteliali, la resistina umana aumenta l'espressione di vari fattori proinfiammatori, tra cui MCP-1, endotelina-1 e metalloproteinasi di matrice, nonché molecole di adesione, come molecola di adesione intercellulare-1, molecola di adesione delle cellule vascolari-1 e P-selectina [168] [169]. Inoltre, la resistina inibisce la proteina che media la sintesi dell'ossido nitrico endoteliale attraverso lo stress ossidativo nelle cellule endoteliali umane [171], promuove la formazione di macrofagi umani, induce un fenotipo protrombotico nelle cellule endoteliali umane [165] e induce l'attivazione piastrinica aumentando l'espressione di P-selectina [172]. Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che la resistina umana potrebbe svolgere un importante ruolo regolatorio nella modulazione delle interazioni tra cellule endoteliali, nella patogenesi e nella progressione dell'aterosclerosi [156]. Quanto riscontrato in letteratura è conforme ai risultati ottenuti da uno studio condotto dal nostro team di ricerca [285] in cui sono stati reclutati 34 pazienti diabetici, con piede diabetico e non, afferenti al nostro Dipartimento di Medicina Interna con Stroke Care, in un periodo temporale compreso tra il 2006 e il 2008. I pazienti diabetici con piede diabetico hanno mostrato, ad un follow-up di 5 anni, un'incidenza

più elevata di eventi cardiovascolari di nuova diagnosi. Le nuove conoscenze sulla fisiopatologia dell'aterosclerosi e delle sue complicanze vascolari hanno portato ad un notevole sviluppo dell'uso di numerosi biomarcatori che giocano un ruolo chiave nel processo di aterosclerosi e che hanno un'importante correlazione con eventi vascolari clinicamente rilevanti. Non solo la loro valutazione ha avanzato la nostra conoscenza sul processo dell'aterosclerosi, ma ha anche accelerato la ricerca e l'utilizzo di nuovi macchinari con lo scopo di stratificare il rischio. Alla luce di ciò, abbiamo riscontrato che i soggetti diabetici con piede diabetico presentavano livelli plasmatici più elevati di IL-6 e resistina, definiti come possibili determinanti dell'aumentato rischio cardiovascolare, ma più bassi di adiponectina.

Chen et al. In uno studio condotto nel 2010 hanno mostrato come la resistina determini disfunzione endoteliale in quanto il livello dei ROS (specie reattive dell'ossigeno), incluso l'anione superossido, era significativamente incrementato nelle cellule endoteliali coronariche trattate con resistina rispetto alle cellule non trattate; così come l'espressione del mRNA di eNOS (ossido nitrico sintasi) è risultata ridotta in pazienti con elevate concentrazioni sieriche della adipochina suddetta [286].

La visfatina è una delle principali adipochine secrete dal tessuto adiposo. Il livello di visfatina aumenta significativamente nelle persone con obesità a causa dell'aumento dell'indice di massa corporea (BMI). Nei soggetti obesi, gli adipociti, che popolano il tessuto adiposo, vanno incontro ad ipertrofia e iperplasia e secernono un numero variabile di adipocitochine, tra cui la visfatina. La visfatina ad alta concentrazione attira le cellule immunitarie e produce infiammazione cronica negli adipociti. Inoltre, induce resistenza all'insulina in molti tessuti e provoca disfunzione delle cellule beta del pancreas nelle fasi successive [126]. Oltre a promuovere l'infiammazione, l'isoforma extracellulare della visfatina contribuisce alla vulnerabilità della placca aterosclerotica sostenendo la degradazione della matrice extracellulare e l'angiogenesi.

Alcuni studi sperimentali hanno mostrato come il trattamento cronico con visfatina potrebbe indurre adesione dei leucociti alle cellule endoteliali e all'endotelio aortico

tramite l'induzione di adesine quali ICAM-1 e VCAM-1 e suggeriscono che la visfatina sia un mediatore dell'infiammazione vascolare [194].

Le conoscenze a riguardo suggeriscono, quindi, che un aumento dei livelli di visfatina e resistina concorrano alla patogenesi della disfunzione endoteliale, che a sua volta determina una riduzione delle concentrazioni plasmatiche di adiponectina. Tale adipochina, generalmente, è responsabile di un effetto insulino-sensibilizzante, anti infiammatorio ed anti apoptotico su un elevato numero di citotipi, e agisce, inoltre, a livello cerebrale incrementando la spesa energetica e inducendo calo ponderale [194].

Tenendo conto dell'efficace azione della Me-Di nel ridurre i livelli di suddette adipochine e nell'aumentare la sintesi di NO e adiponectina, è verosimile che un'alta aderenza ad un regime dietetico mediterraneo possa infine ridurre l'entità della disfunzione endoteliale e, al tempo stesso, mantenere basso il rischio cardiovascolare a cui tali paziente sono esposti.

Infine, in relazione all'esperienza scientifica maturata dal nostro gruppo in merito alla relazione tra polimorfismi genetici e rischio cerebrovascolare, in considerazione dei pochi studi finora esistenti in letteratura ed inerenti ad un possibile effetto modulatore sull'espressione di alcuni polimorfismi indotti dall'aderenza al regime dietetico mediterraneo e aventi cruciale impatto cardiovascolare, ci siamo posti come obiettivo quello di valutare l'espressione di alcuni polimorfismi di geni implicati nell'eziopatogenesi della disfunzione endoteliale, dell'insulino-resistenza e della diabetità.

Il dato relativo ad una maggiore prevalenza di eventi cardiovascolari nei soggetti portatori del genotipo TT per quel che riguarda il polimorfismo TCF7L2-rs7903146 e gli altri polimorfismi presi in esame sottolineerebbe la possibile influenza che un background di tipo genetico potrebbe rivelare nella mediazione dei possibili effetti cardiovascolari di una minore aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo.

Interessante e ambizioso appare quindi l'obiettivo che il nostro progetto ha di analizzare ulteriormente il ruolo di modulazione, su verosimile base epigenetica, che la aderenza ad un regime dietetico di tipo mediterraneo potrebbe fornire proprio in quei soggetti a maggiore rischio, sia perché portatori di uno o più fattori di rischio cardiovascolare, sia perché geneticamente caratterizzati da un allele di uno dei polimorfismi presi in considerazione associato ad un profilo di rischio cardiovascolare ulteriormente sfavorevole.

Già in passato il nostro gruppo di ricerca si è occupato della prevalenza dei polimorfismi di alcuni geni codificanti per alcune citochine infiammatorie e per molecole coinvolte nel processo emostatico fibrinolitico nei soggetti con ictus ischemico, sottolineandone le relazioni con il sottotipo lacunare dei polimorfismi. Questo studio [287] ha mostrato una frequenza significativamente maggiore del genotipo AA del polimorfismo 1082AA del gene per la IL-10 nei soggetti con ictus ischemico, lo stesso studio ha riportato una maggiore prevalenza dei genotipi CC e 1/1 dei polimorfismi TPA 7351-CT e IL-1RN-VNTR 86 bp 2/2 nei soggetti con ictus lacunare.

Recentemente il nostro gruppo ha analizzato l'aderenza al regime dietetico di tipo mediterraneo, valutata mediante il Mediterranean Diet Score, in una popolazione di soggetti con ictus ischemico residenti nei territori limitrofi Palermo. Il nostro studio ha mostrato come esista una correlazione tra minore aderenza a tale regime dietetico ed il sottotipo aterosclerotico dell'ictus ischemico (LAAS), con maggiore gravità dello stesso, valutata in termini di NIHSS score e Rankin Score [288].

BIBLIOGRAFIA

1. Keys A et al. A multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge Mass, Harvard University Press, 1980; pp. 1-381.
2. Keys, A. Coronary heart disease in seven countries. 1970. *Nutr.* Burbank Los Angel. Cty. Calif 1997, 13, 250–252.
3. Buzina, R.; Keys, A.; Mohacek, I.; Marinkovic, M.; Hahn, A.; Blackburn, H. Coronary Heart Disease in Seven Countries. V. Five-year follow-up in Dalmatia and Slavonia.
4. Fitó, M.; Konstantinidou, V. Nutritional Genomics and the Mediterranean Diet's Effects on Human Cardiovascular Health. *Nutrients* 2016, 8, 218.
5. Dimitriou, M.E.; Dedoussis, G.V.Z. Gene–Diet Interactions in Cardiovascular Disease. *Curr. Nutr. Rep.* 2012, 1, 153–160.
6. Linseisen, J. et al. Meat consumption in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts: Results from 24-h dietary recalls. *Public Health Nutr.* 2002, 5, 1243–1258.
7. La dieta mediterranea. Come mangiare bene e stare bene - Ancel Keys - Margaret Keys - Libro - Slow Food -AsSaggi IBS.
8. Pereira da Silva, L.; Pinto, E. Low Adherence to Mediterranean Diet in Portugal: Pregnant Women Nutrition in Portugal and its Repercussions. *Acta Med. Port.* 2016, 29, 658–666.
9. Benhammou, S.; et al. Seguimiento de la dieta mediterránea e hidratación de la población española y marroquí. *Nutr. Hosp.* 2015, 32, 2749–2756.
10. Relazione sullo stato di salute del Paese, 2000.
11. CuoreData, Il Progetto Cuore, Istituto Superiore di Sanità.
12. Ros, E.; Martínez-González, M.A.; et al. Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Adv. Nutr. Bethesda Md* 2014, 5, 330S–336S.
13. Martínez-González, M.Á.; Toledo, E.; et al. Extravirgin olive oil consumption reduces risk of atrial fibrillation: The PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) trial. *Circulation* 2014, 130, 18–26.
14. Estruch, R.; Ros, E.; et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N. Engl. J. Med.* 2018, 378, e34.
15. Esposito, K.; Marfella, R.; et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: A randomized trial. *JAMA* 2004, 292, 1440–1446.
16. Blankenberg, S.; Barbaux, S.; Tiret, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003, 170, 191–203.

17. Cortés, B.; Núñez, I.; Cofán, M.; Gilabert, R.; Pérez-Heras, A.; Casals, E.; Deulofeu, R.; Ros, E. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006, 48, 1666–1671.
18. Estruch, R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: The experience of the PREDIMED study. *Proc. Nutr. Soc.* 2010, 69, 333–340.
19. Carluccio, M.A.; Siculella, L.; Ancora, M.A.; Massaro, M.; Scoditti, E.; Storelli, C.; Visioli, F.; Distanto, A.; De Caterina, R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 622–629.
20. Ros, E.; Núñez, I.; Pérez-Heras, A.; Serra, M.; Gilabert, R.; Casals, E.; Deulofeu, R. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: A randomized crossover trial. *Circulation* 2004, 109, 1609–1614.
21. Estruch, R.; Martínez-González, M.A.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Covas, M.I.; Fiol, M.; Gómez-Gracia, E.; López-Sabater, M.C.; Vinyoles, E.; et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.*
22. Dell'Agli, M.; Fagnani, R.; Mitro, N.; Scurati, S.; Masciadri, M.; Mussoni, L.; Galli, G.V.; Bosisio, E.; Crestani, M.; De Fabiani, E.; et al. Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 3259–3264.
23. Meisinger, C.; Baumert, J.; Khuseyinova, N.; Loewel, H.; Koenig, W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 2005, 112, 651–657.
24. Fitó, M.; Guxens, M.; Corella, D.; Sáez, G.; Estruch, R.; de la Torre, R.; Francés, F.; Cabezas, C.; López-Sabater, M.D.C.; Marrugat, J.; et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: A randomized controlled trial. *Arch. Intern. Med.* 2007, 167, 1195–1203.
25. Calder, P.C.; Ahluwalia, N.; et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br. J. Nutr.* 2011, 106, S5–S78.
26. Oh, D.Y.; Talukdar, S.; Bae, E.J.; et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010, 142, 687–698.
27. Ogiwara, T.; Satoh, K.; Kadoma, Y.; et al. Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. *Anticancer Res.* 2002, 22, 2711–2717.
28. Visioli, F.; Poli, A.; Gall, C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* 2002, 22, 65–75.
29. Eisenberg, T.; Abdellatif, M.; et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat. Med.* 2016, 22, 1428–1438.

30. Kouli, G.-M.; Panagiotakos, D.B.; et al. Olive oil consumption and 10-year (2002–2012) cardiovascular disease incidence: The ATTICA study. *Eur. J. Nutr.* 2019, 58, 131–138.
31. Urquiaga, I.; Stobel, P.; Perez, D.; et al. Mediterranean diet and red wine protect against oxidative damage in young volunteers. *Atherosclerosis* 2010, 211, 694–699.
32. Wu, L.L.; Chiou, C.C.; Chang, P.Y.; Wu, J.T. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 2004, 339, 1–9.
33. Salas-Salvadó, J.; Farrés, X.; Luque, X.; Narejos, S.; Borrell, M.; Basora, J.; Anguera, A.; Torres, F.; Bulló, M.; Balanza, R.; et al. Effect of two doses of a mixture of soluble fibres on body weight and metabolic variables in overweight or obese patients: A randomised trial. *Br. J. Nutr.* 2008, 99, 1380–1387.
34. Ahmad, S.; Moorthy, M.V.; et al. Assessment of Risk Factors and Biomarkers Associated with Risk of Cardiovascular Disease Among Women Consuming a Mediterranean Diet. *JAMA Netw. Open* 2018, 1.
35. Quintero-Flórez, A.; Sinausia Nieva, L.; et al. The Fatty Acid Composition of Virgin Olive Oil from Different Cultivars Is Determinant for Foam Cell Formation by Macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 6731–6738.
36. Varela, L.M.; Ortega-Gomez, A.; Lopez, S.; Abia, R.; Muriana, F.J.G.; Bermudez, B. The effects of dietary fatty acids on the postprandial triglyceride-rich lipoprotein/apoB48 receptor axis in human monocyte/macrophage cells. *J. Nutr. Biochem.* 2013, 24, 2031–2039.
37. Vallvé, J.-C.; Uliaque, K.; Girona, J.; Cabré, A.; Ribalta, J.; Heras, M.; Masana, L. Unsaturated fatty acids and their oxidation products stimulate CD36 gene expression in human macrophages. *Atherosclerosis* 2002, 164, 45–56.
38. Endemann, G.; Stanton, L.W.; Madden, K.S.; Bryant, C.M.; White, R.T.; Protter, A.A. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 11811–11816.
39. Tontonoz, P.; Nagy, L.; Alvarez, J.G.; Thomazy, V.A.; Evans, R.M. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998, 93, 241–252.
40. Tontonoz, P.; Nagy, L. Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma: Implications for cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 1999, 10, 485–490.
41. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 2003; 108:2054-2059.
42. Luscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: modulator of cardiovascular function. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.
43. Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38 [suppl 2]: S3-S6.

44. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
45. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 22-27.
46. Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens* 2001; 19: 415-420 e 2.
47. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan M, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I, Rosei EA. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 103: 1238-124.
48. Endermann D, Pu Q, De Ciucesi C, Savoia C, Viridis A, Neves MF, Touyz RM, Schiffrin EL. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on anti-hypertensive treatment. *Hypertension* 2004; 43: 399-404.
49. Monnick SH, van Haelst PL, van Boven AJ, Stroes ES, Tio RA, Plokker TW, Smit AJ, Veeger NJ, Crijns HJ, van Gilst WH. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med* 2002; 50: 19-24.
50. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002; 106: 3073-3078.
51. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046-1051.
52. Lerman A, Burnett JC., Jr Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*. 1992;86(Suppl III): III-12–III-19.
53. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, et al. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein (a) level. *J Clin Invest*.1994;93:50–5.
54. Gokce N, Keaney JF, Jr, Hunter LM, et al. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. 2002;105: 1567–72.
55. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*.2002;105:1135–43.
56. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92: 3337-49.
57. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D: Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. 2003, *Circulation* 107: 1891–1895.

58. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ, Cooke JP: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. 2003, *Circulation* 108: 3042–3047.
59. Sanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K: Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. 2003, *Hypertension* 42: 985–990.
60. Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108: 1912-1916.
61. Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 2001; 38: 606-61.
62. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678.
63. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280: C719–41.
64. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev.* 2001; 22:36–52.
65. Cosentino F, Luscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32(Suppl 3): S54–61.
66. Yaqoob M, Patrick AW, McClelland P, et al. Relationship between markers of endothelial dysfunction, oxidant injury and tubular damage in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci (Colch)* 1993; 85:557–62.
67. Myrup B, Mathiesen ER, Ronn B, et al. Endothelial function and serum lipids in the course of developing microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 1994; 26:33–9.
68. Neri S, Bruno CM, Leotta C, et al. Early endothelial alterations in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Clin Lab Res.* 1998;28: 100–3.
69. Watts GF, Playford DA. Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: a hypothesis. *Atherosclerosis.* 1998;141: 17–30.
70. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, et al. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest.* 1994;94: 1172–9.
71. Ferri C, Bellini C, Desideri G, et al. Circulating endothelin-1 levels in obese patients with the metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*1997;105(Suppl 2): 38–40.

72. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes*.1999; 48:1856–62.
73. Hamasaki S, Al Suwaidi J, Higano ST, et al. Attenuated coronary flow reserve and vascular remodeling in patients with hypertension and left ventricular hyperatrophy. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35:1654–60.
74. Taddei S, Virdis A, Mattei P, et al. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*. 1993; 21(6 Pt 2):929–33.
75. Tao J, Jin YF, Yang Z, et al. Reduced arterial elasticity is associated with endothelial dysfunction in persons of advancing age: comparative study of noninvasive pulse wave analysis and laser Doppler blood flow measurement. *Am J Hypertens*. 2004; 17:654–9.
76. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, et al. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenesence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004; 2:141–8.
77. Taddei S, Virdis A, Mattei P, et al. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation*.1995;91:1981–7.
78. Masumoto A, Hirooka Y, Hironaga K, et al. Effect of pravastatin on endothelial function in patients with coronary artery disease (cholesterol-independent effect of pravastatin) *Am J Cardiol*. 2001; 88:1291–4.
79. Gilligan DM, Guetta V, Panza JA, et al. Selective loss of microvascular endothelial function in human hypercholesterolemia. *Circulation*. 1994; 90:35–41.
80. Brook RD. Obesity, weight loss, and vascular function. *Endocrine* 2006; 29: 21-5.
81. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 1999; 13: 1231-8.
82. Verma S, Li SH, Wang CH, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003; 108: 736-40.
83. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 45021-6.
84. Paolisso G, Giugliano D. Oxidative stress and insulin action: is there a relationship? *Diabetologia*. 1996; 39:357–63.
85. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, et al. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med*.1996; 334:150–4.
86. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 257-265.

87. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1235-1241.
88. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008; 117: 2467–2474.
89. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1185ù.
90. Boos CJ, Goon PK, Lip GY. Circulating endothelial progenitor cells. *N Engl J Med* 2005; 353:2613.
91. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348:593.
92. Murasawa S, Kawamoto A, Horii M, et al. Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1388.
93. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1.
94. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353:999.
95. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005; 111: 363-8.
96. Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 505-10.
97. Widlansky ME, Gokce N, Keaney F, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1149-1160.
98. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; 90: 40L-48L.
99. Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, et al. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97:716.
100. John S, Schmieder RE. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J Hypertens* 2000; 18: 363-374ù.
101. Moertl D, Hammer A, Steiner S, et al. Dose-dependent effects of omega-3-polyunsaturated fatty acids on systolic left ventricular function, endothelial function, and markers of inflammation in chronic heart failure of nonischemic origin: a double-blind, placebo-controlled, 3-arm study. *Am Heart J* 2011; 161: e1.

102. Sahin-Efe A, Katsikeris F, Mantzoros CS. Advances in adipokines. *Metabolism* 2012;61(12):1659–65.
103. Matsuzawa Y. Adipocytokines and metabolic syndrome. *Semin Vasc Med* 2005;5(1):34–9.
104. Silva D, Moreira R, Beltrão M, et al. What is the effect of a Mediterranean compared with a Fast Food meal on the exercise induced adipokine changes? A randomized cross-over clinical trial. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215475. Published 2019 Apr 18. doi:10.1371/journal.pone.0215475.
105. Dinu M, Pagliai G, Casini A, Sofi F. Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *Eur J Clin Nutr*. 2018;72(1):30–43. 10.1038/ejcn.2017.58.
106. Liyanage T, Ninomiya T, Wang A, Neal B, Jun M, Wong MG, et al. Effects of the Mediterranean Diet on Cardiovascular Outcomes-A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(8):e0159252. doi:10.1371/journal.pone.0159252.
107. Papamichael MM, Katsardis C, Lambert K, Tsoukalas D, Koutsilieris M, Erbas B, et al. Efficacy of a Mediterranean diet supplemented with fatty fish in ameliorating inflammation in paediatric asthma: a randomised controlled trial. *J Hum Nutr Diet*. 2018. 10.1111/jhn.12609.
108. Bedard A, Tchernof A, Lamarche B, Corneau L, Dodin S, Lemieux S. Effects of the traditional Mediterranean diet on adiponectin and leptin concentrations in men and premenopausal women: do sex differences exist? *Eur J Clin Nutr*. 2014;68(5):561–6. 10.1038/ejcn.2014.27.
109. Dordevic AL, Pendergast FJ, Morgan H, Villas-Boas S, Caldow MK, Larsen AE, et al. Postprandial Responses to Lipid and Carbohydrate Ingestion in Repeated Subcutaneous Adipose Tissue Biopsies in Healthy Adults. *Nutrients*. 2015;7(7):5347–61. 10.3390/nu7075224.
110. Nimmo MA, Leggate M, Viana JL, King JA. The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15 Suppl 3:51–60. 10.1111/dom.12156.
111. Zhang X, Zheng J, Zhang L, Liu Y, Chen GP, Zhang HP, et al. Systemic inflammation mediates the detrimental effects of obesity on asthma control. *Allergy Asthma Proc*. 2018;39(1):43–50. 10.2500/aap.2018.39.4096.
112. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 117:241-250.
113. Catalàn, V., Gòmez-Ambrosi, J. Rodríguez, A., Salvador, J., Frühbeck, G., 2009. Adipokines in the treatment of diabetes mellitus and obesity. *Expert opinion in Pharmacotherapy* 10:239-254.
114. Blüher, M., 2012. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes and Metabolism Journal* 36:317-327.

115. Van Gaal, L.F., Mertens, I.L., De Block, C.E., 2006. Mechanism linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444:875-800.
116. Lehr, S., Hartwig, S., Sell, H., 2012. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *PROTEOMICS- Clinical Application* 6:91-101.
117. Kusminski, c. M., Scherer, P. E., 2009 The rpad from discovery to clinic: adiponec-
tin as a biomarker of metabolic status. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 86:592-595.
118. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral
fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307(5708): 426–430).
119. Burgos ES, Vetticatt MJ, Schramm VL. Recycling nicotinamide. The transition-state
structure of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Am Chem Soc* 135: 3485-
3493, 2013.
120. Takahashi R, Nakamura S, Yoshida T, Kobayashi Y, Ohkubo T. Crystallization of hu-
man nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst
Commun* 63: 375-377, 2007.
121. Pittelli M, Formentini L, Faraco G, Lapucci A, Rapizzi E, Cialdai F, Romano G,
Moneti G, Moroni F, Chiarugi A. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase:
Cellular bioenergetics reveals a mitochondrial insensitive NAD pool. *J Biol Chem* 285:
34106-34114, 2010.
122. Yang T, Chan NY, Sauve AA. Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives:
Effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mam-
malian cells. *JMed Chem* 50: 6458-6461, 2007.
123. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization
of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 14:
1431-1437, 1994.
124. Olarescu NC, Ueland T, Lekva T, Dahl TB, Halvorsen B, Aukrust P, Bollerslev J. Adi-
pocytes as a source of increased circulating levels of nicotinamide phosphoribosyltrans-
ferase/visfatin in active acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 1355-1362, 2012.
125. Spinnler R, Gorski T, Stolz K, Schuster S, Garten A, Beck-Sickingler AG, Engelse MA,
de Koning EJ, Korner A, Kiess W, Maedler K. The adipocytokine Nampt and its product
NMN have no effect on beta-cell survival but potentiate glucose stimulated insulin secre-
tion. *PLoS One* 8: e54106, 2013.
126. B. Kumari and U.C.S. Yadav, "Adipokine Visfatin's Role in Pathogenesis of Diabe-
sity and Related Metabolic Derangements", *Current Molecular Medicine* (2018) 18: 116.
127. Spiroglou SG, Kostopoulos CG, Varakis JN, Papadaki HH. Adipokines in periaortic
and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. *J Ath-
eroscler Thromb* 17: 115-130, 2010.
128. Wang P, Xu TY, Guan YF, Su DF, Fan GR, Miao CY. Perivascular adipose tissue-de-
rived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mono-
nucleotide. *Cardiovasc Res* 81: 370-380, 2009.

129. Kim SR, Bae YH, Bae SK, Choi KS, Yoon KH, Koo TH, Jang HO, Yun I, Kim KW, Kwon YG, Yoo MA, Bae MK. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1783: 886-895, 2008.
130. Lee WJ, Wu CS, Lin H, Lee IT, Wu CM, Tseng JJ, Chou MM, Sheu WH. Visfatin-induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells through the NF-kappaB pathway. *Int J Obes (Lond)* 33: 465-472, 2009.
131. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal* 20: 2794-2814, 2014.
132. Fan Y, Meng S, Wang Y, Cao J, Wang C. Visfatin/PBEF/Nampt induces EMMPRIN and MMP-9 production in macrophages via the NAMPT/MAPK (p38, ERK1/2)-NF-kappaB signaling pathway. *Int J Mol Med* 27: 607-615, 2011.
133. Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, Oie E, Dahl A, Michelsen A, Damas JK, Tunheim SH, Ueland T, Smith C, Bendz B, Tonstad S, Gullestad L, Froland SS, Krohg-Sorensen K, Russell D, Aukrust P, Halvorsen B. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: Possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation* 115: 972-980, 2007.
134. Adya R, Tan BK, Pun A, Chen J, Randeve HS. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovasc Res* 78: 356-365, 2008.
135. Yun MR, Seo JM, Park HY. Visfatin contributes to the differentiation of monocytes into macrophages through the differential regulation of inflammatory cytokines in THP-1 cells. *Cell Signal* 26: 705-715, 2014.
136. Li Y, Zhang Y, Dorweiler B, Cui D, Wang T, Woo CW, Brunkan CS, Wolberger C, Imai S, Tabas I. Extracellular Nampt promotes macrophage survival via a non enzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem* 283: 34833-34843, 2008.
137. Lovren F, Pan Y, Shukla PC, Quan A, Teoh H, Szmítko PE, Peterson MD, Gupta M, Al-Omran M, Verma S. Visfatin activates eNOS via Akt and MAP kinases and improves endothelial cell function and angiogenesis in vitro and in vivo: Translational implications for atherosclerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1440-E1449, 2009.
138. Bae YH, Bae MK, Kim SR, Lee JH, Wee HJ, Bae SK. Upregulation of fibroblast growth factor-2 by visfatin that promotes endothelial angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 206-211, 2009.
139. Huang P, Riordan SM, Heruth DP, Grigoryev DN, Zhang LQ, Ye SQ. A critical role of nicotinamide phosphoribosyltransferase in human telomerase reverse transcriptase induction by resveratrol in aortic smooth muscle cells. *Oncotarget* 6: 10812-10824, 2015.
140. Yin H, van der Veer E, Frontini MJ, Thibert V, O'Neil C, Watson A, Szasz P, Chu MW, Pickering JG. Intrinsic directionality of migrating vascular smooth muscle cells is regulated by NAD(+) biosynthesis. *J Cell Sci* 125: 5770-5780, 2012.

141. Boini KM, Zhang C, Xia M, Han WQ, Brimson C, Poklis JL, Li PL. Visfatin-induced lipid raft redox signaling platforms and dysfunction in glomerular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1801: 1294-1304, 2010.
142. Li S, Wang C, Li K, Li L, Tian M, Xie J, Yang M, Jia Y, He J, Gao L, Boden G, Liu H, Yang G. NAMPT knockdown attenuates atherosclerosis and promotes reverse cholesterol transport in ApoE KO mice with high-fat-induced insulin resistance. *Sci Rep* 6: 26746, 2016.
143. Nencioni A, da Silva RF, Fraga-Silva RA, Steffens S, Fabre M, Bauer I, Caffa I, Magnone M, Sociali G, Quercioli A, Pelli G, Lenglet S, Galan K, Burger F, Vazquez Calvo S, Bertolotto M, Bruzzone S, Ballestrero A, Patrone F, Dallegri F, Santos RA, Stergiopoulos N, Mach F, Vuilleumier N, Montecucco F. Nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibition reduces intraplaque CXCL1 production and associated neutrophil infiltration in atherosclerotic mice. *Thromb Haemost* 111: 308-322, 2014.
144. F. Carbone; L. Liberale; et al. Regulation and Function of Extracellular Nicotinamide Phosphoribosyltransferase/Visfatin. American Physiological Society. *Compr Physiol* 7:603-621, 2017.
145. Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 2004;304:1154-1158.
146. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-312.
147. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:472-476.
148. Tomaru T, Steger DJ, Lefterova MI, Schupp M, Lazar MA. Adipocyte-specific expression of murine resistin is mediated by synergism between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem* 2009;284:6116-6125.
149. Park HK, Ahima RS. Resistin in rodents and humans. *Diabetes Metab J* 2013;37:404-414.
150. Novick D, Barak S, Ilan N, Vlodaysky I. Heparanase interacts with resistin and augments its activity. *PLoS One* 2014;9:e85944.
151. Lazar MA. Resistin- and obesity-associated metabolic diseases. *Horm Metab Res* 2007;39:710-716.
152. Song R, Wang X, Mao Y, et al. Resistin disrupts glycogen synthesis under high insulin and high glucose levels by down-regulating the hepatic levels of GSK3beta. *Gene* 2013;529:50-56.
153. Schwartz DR, Lazar MA. Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:259-265.

154. Daquinag AC, Zhang Y, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ, Kolonin MG. An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell Stem Cell* 2011;9:74-86.
155. Sanchez-Solana B, Laborda J, Baladron V. Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Mol Endocrinol* 2012;26:110-127.
156. Codoner-Franch P, Alonso-Iglesias E. Resistin: insulin resistance to malignancy. *Clin Chim Acta* 2015;438:46-54.
157. Huang X, Yang Z. Resistin's, obesity and insulin resistance: the continuing disconnect between rodents and humans. *J Endocrinol Invest* 2016;39:607-615.
158. Qatanani M, Szwegold NR, Greaves DR, Ahima RS, Lazar MA. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 2009;119:531-539.
159. Park HK, Qatanani M, Briggs ER, Ahima RS, Lazar MA. Inflammatory induction of human resistin causes insulin resistance in endotoxemic mice. *Diabetes* 2011;60:775-783.
160. Graveleau C, Zaha VG, Mohajer A, et al. Mouse and human resistins impair glucose transport in primary mouse cardiomyocytes, and oligomerization is required for this biological action. *J Biol Chem* 2005;280:31679-31685.
161. Sheng CH, Du ZW, Song Y, et al. Human resistin inhibits myogenic differentiation and induces insulin resistance in myocytes. *Biomed Res Int* 2013;2013:804632.
162. Luo Z, Zhang Y, Li F, et al. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. *Endocrine* 2009;36:60-69.
163. Chen BH, Song Y, Ding EL, et al. Circulating levels of resistin and risk of type 2 diabetes in men and women: results from two prospective cohorts. *Diabetes Care* 2009;32:329-334.
164. Filkova M, Haluzik M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol* 2009;133:157-170.
165. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 2012;165:622-632.
166. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005;174:5789-5795.
167. Jung HS, Park KH, Cho YM, et al. Resistin is secreted from macrophages in atherosclerotic lesions and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2006;69:76-85.
168. Hsu WY, Chao YW, Tsai YL, et al. Resistin induces monocyte- endothelial cell adhesion by increasing ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells via p38MAPK-dependent pathway. *J Cell Physiol* 2011;226:2181-2188.

169. Manduteanu I, Pirvulescu M, Gan AM, et al. Similar effects of resistin and high glucose on P-selectin and fractalkine expression and monocyte adhesion in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1443-1448.
170. Jamaluddin MS, Yan S, Lu J, Liang Z, Yao Q, Chen C. Resistin increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. *PLoS One* 2013;8:e84576.
171. Chen C, Jiang J, Lu JM, et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H193-H201.
172. Qiu W, Chen N, Zhang Q, et al. Resistin increases platelet P-selectin levels via p38 MAPK signal pathway. *Diab Vasc Dis Res* 2014;11:121-124.
173. Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Raselli S, Grigore L, Catapano AL. Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 2007;156:279-284.
174. Owecki M, Nikisch E, Miczke A, Pupek-Musialik D, Sowinski J. Serum resistin is related to plasma HDL cholesterol and inversely correlated with LDL cholesterol in diabetic and obese humans. *Neuro Endocrinol Lett* 2010;31:673-678.
175. Cabrera de Leon A, Almeida Gonzalez D, Gonzalez Hernandez A, et al. Relationships between serum resistin and fat intake, serum lipid concentrations and adiposity in the general population. *J Atheroscler Thromb* 2014;21:454- 462.
176. Abate N, Sallam HS, Rizzo M, et al. Resistin: an inflammatory cytokine: role in cardiovascular diseases, diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Pharm Des* 2014;20:4961-4969.
177. Costandi J, Melone M, Zhao A, Rashid S. Human resistin stimulates hepatic overproduction of atherogenic ApoB-containing lipoprotein particles by enhancing ApoB stability and impairing intracellular insulin signaling. *Circ Res* 2011;108:727-742.
178. Rashid S, Kastelein JJ. PCSK9 and resistin at the crossroads of the atherogenic dyslipidemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2013;11:1567-1577.
179. Melone M, Wilsie L, Palyha O, Strack A, Rashid S. Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low-density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1697-1705.
180. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S172-S177.
181. Hampton EN, Knuth MW, Li J, Harris JL, Lesley SA, Spraggon G. The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:14604-14609.
182. Li S, Xu RX, Zhang Y, et al. Relation of resistin to proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 levels in coronary artery disease patients with different nutritional status. *J Endocrinol Invest* 2015;38:1291-1299.

183. Park HK, et al. Resistin and cardiometabolic diseases. *The Korean Journal of Internal Medicine* Vol. 32, No. 2, March 2017.
184. Yang WS, Chuang LM. Human genetics of adiponectin in the metabolic syndrome. *J Mol Med*. 2006;84:112–121.
185. Gu HF. Biomarkers of adiponectin: plasma protein variation and genomic DNA polymorphisms. *Biomark Insights*. 2009;4:123–133.
186. Heid IM, Wagner SA, Gohlke H, et al. Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. *Diabetes*. 2006;55(2):375–384.
187. Bouatia-Naji N, Meyre D, Lobbens S, et al. ACDC/adiponectin polymorphisms are associated with severe childhood and adult obesity. *Diabetes*. 2006;55(2):545–550.
188. Yang M, Qiu CC, Chen W, Xu LL, Yu M, Xiang HD. Identification of a regulatory single nucleotide polymorphism in the adiponectin (APM1) gene associated with type 2 diabetes in Han nationality. *Biomed Environ Sci*. 2008;21:454–459.
189. Rasmussen-Torvik LJ, Pankow JS, Jacobs DR Jr, Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. The association of SNPs in ADIPOQ, ADIPOR1, and ADIPOR2 with insulin sensitivity in a cohort of adolescents and their parents. *Hum Genet*. 2009;125:21–28.
190. Wu LS, Hsieh CH, Pei D, Hung YJ, Kuo SW, Lin E. Association and interaction analyses of genetic variants in ADIPOQ, ENPP1, GHSR, PPARgamma and TCF7L2 genes for diabetic nephropathy in a Taiwanese population with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(11):3360–3366.
191. Sun P, Liu L, Chen J, Chen Y, Shi L, Imam MU, Chen Y, Pei X, Xu Y, Guo Y, Ping Z, Fu X. The polymorphism of rs266729 in adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Nov;96(47):e8745.
192. Zhou JM, Zhang M, Wang S, Wang BY, Han CY, Ren YC, Zhang L, Zhang HY, Yang XY, Zhao Y, Hu DS. Association of the ADIPOQ Rs2241766 and Rs266729 Polymorphisms with Metabolic Syndrome in the Chinese Population: A Metaanalysis. *Biomed Environ Sci*. 2016 Jul;29(7):505-15.
193. Siitonen N, Pulkkinen L, Lindström J, Kolehmainen M, Eriksson JG, Venojärvi M, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Uusitupa M Association of ADIPOQ gene variants with body weight, type 2 diabetes and serum adiponectin concentrations: the Finnish Diabetes Prevention Study. *BMC Med Genet*. 2011 Jan 10;12:5. doi: 10.1186/1471-2350-12-5.
194. Turer, A.T., Scherer, P.E., 2012 Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 55:2319-2326.
195. Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., Pashke, R., 2002. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290:1084-1089.

196. Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997, 387, 569–572.
197. Perry, D.K.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. Ceramide and the regulation of apoptosis and the stress response. *Trends Cardiovasc. Med.* 1996, 6, 158–162.
198. Spiegel, S.; Cuvillier, O.; Edsall, L.; Kohama, T.; Menzeleev, R.; Olivera, A.; Thomas, D.; Tu, Z.; Van Brocklyn, J.; Wang, F. Roles of sphingosine-1-phosphate in cell growth, differentiation, and death. *Biochem. Biokhimiia* 1998, 63, 69–73.
199. Sassoli, C.; Pierucci, F.; Zecchi-Orlandini, S.; Meacci, E. Sphingosine 1-Phosphate (S1P)/ S1P Receptor Signaling and Mechanotransduction: Implications for Intrinsic Tissue Repair/Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20.
200. Van Brocklyn, J.R.; Williams, J.B. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 2012, 163, 26–36.
201. Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008, 9, 139–150.
202. Laaksonen, R.; Ekroos, K.; Sysi-Aho, M.; Hilvo, M.; Vihervaara, T.; Kauhanen, D.; Suoniemi, M.; Hurme, R.; Marz, W.; Scharnagl, H.; et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur. Heart J.* 2016, 37, 1967–1976.
203. Maceyka, M.; Spiegel, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 2014, 510, 58–67.
204. Farzana Parveen, Daniel Bender, et al., Role of Ceramidases in Sphingolipid Metabolism and Human Diseases; *Cells* 2019, 8, 1573.
205. Gault, C.R.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. An overview of sphingolipid metabolism: From synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010, 688, 1–23.
206. Xia, J.Y.; Holland, W.L.; Kusminski, C.M.; Sun, K.; Sharma, A.X.; Pearson, M.J.; Sifuentes, A.J.; McDonald, J.G.; Gordillo, R.; Scherer, P.E. Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab.* 2015, 22, 266–278.
207. Bruce, C.R.; Risis, S.; Babb, J.R.; Yang, C.; Kowalski, G.M.; Selathurai, A.; Lee-Young, R.S.; Weir, J.M.; Yoshioka, K.; Takuwa, Y.; et al. Overexpression of sphingosine kinase 1 prevents ceramide accumulation and ameliorates muscle insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 2012, 61, 3148–3155.
208. Chavez, J.A.; Summers, S.A. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab.* 2012, 15, 585–594.
209. Summers, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.* 2006, 45, 42–72.
210. Summers, S.A. The ART of Lowering Ceramides. *Cell Metab.* 2015, 22, 195–196.

211. Havulinna, A.S.; Sysi-Aho, M.; Hilvo, M.; Kauhanen, D.; Hurme, R.; Ekroos, K.; Salomaa, V.; Laaksonen, R. Circulating Ceramides Predict Cardiovascular Outcomes in the Population-Based FINRISK 2002 Cohort. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016, *36*, 2424–2430.
212. Mantovani, A.; Bonapace, S.; Lunardi, G.; Salgarello, M.; Dugo, C.; Canali, G.; Byrne, C.D.; Gori, S.; Barbieri, E.; Targher, G. Association between plasma ceramides and inducible myocardial ischemia in patients with established or suspected coronary artery disease undergoing myocardial perfusion scintigraphy. *Metabolism.* 2018, *85*, 305–312.
213. Wang, D.D.; Toledo, E.; Hruby, A.; Rosner, B.A.; Willett, W.C.; Sun, Q.; Razquin, C.; Zheng, Y.; Ruiz-Canela, M.; Guasch-Ferré, M.; et al. Plasma Ceramides, Mediterranean Diet, and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial (Prevención con Dieta Mediterránea). *Circulation* 2017, *135*, 2028–2040.
214. Dong D. Wang; Estefanía Toledo; et al. Plasma Ceramides, Mediterranean Diet, and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial; *Circulation.* 2017 May 23; *135*(21): 2028–2040. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024261.
215. Cambien, F.; Poirier, O.; Lecerf, L.; Evans, A.; Cambou, J.P.; Arveiler, D.; Luc, G.; Bard, J.M.; Bara, L.; Ricard, S. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992, *359*, 641–644.
216. Song, Y.; Stampfer, M.J.; Liu, S. Meta-analysis: Apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* 2004, *141*, 137–147.
217. Pearson, T.A.; Manolio, T.A. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 2008, *299*, 1335–1344.
218. Corella, D.; Carrasco, P.; Sorlí, J.V.; Estruch, R.; Rico-Sanz, J.; Martínez-González, M.A.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.I.; Coltell, O.; Arós, F.; et al. Mediterranean diet reduces the adverse effect of the TCF7L2- rs7903146 polymorphism on cardiovascular risk factors and stroke incidence: A randomize. *Diabetes Care* 2013, *36*, 3803–3811.
219. Ortega-Azorín, C.; Sorlí, J.V.; Estruch, R.; Asensio, E.M.; Coltell, O.; González, J.I.; Martínez-González, M.Á.; Ros, E.; Salas-Salvadó, J.; Fitó, M.; et al. Amino acid change in the carbohydrate response element binding protein is associated with lower triglycerides and myocardial infarction incidence depending on level of adherence to the Mediterranean diet in the PREDIMED trial. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2014, *7*, 49–58.
220. García-Calzón, S.; Martínez-González, M.A.; Razquin, C.; Arós, F.; Lapetra, J.; Martínez, J.A.; Zalba, G.; Martí, A. Mediterranean diet and telomere length in high cardiovascular risk subjects from the PREDIMED-NAVARRA study. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 2016, *35*, 1399–1405.
221. Boccardi, V.; Esposito, A.; Rizzo, M.R.; Marfella, R.; Barbieri, M.; Paolisso, G. Mediterranean diet, telomere maintenance and health status among elderly. *PLoS ONE* 2013, *8*, e62781.

222. Crous-Bou, M.; Fung, T.T.; Prescott, J.; Julin, B.; Du, M.; Sun, Q.; Rexrode, K.M.; Hu, F.B.; De Vivo, I. Mediterranean diet and telomere length in Nurses' Health Study: Population based cohort study. *BMJ* 2014, 349, g6674.
223. Marin, C.; Delgado-Lista, J.; Ramirez, R.; Carracedo, J.; Caballero, J.; Perez-Martinez, P.; Gutierrez-Mariscal, F.M.; Garcia-Rios, A.; Delgado-Casado, N.; Cruz-Teno, C.; et al. Mediterranean diet reduces senescence-associated stress in endothelial cells. *Age Dordr. Neth.* 2012, 34, 1309–1316.
224. García-Calzón, S.; Martínez-González, M.A.; Razquin, C.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Martínez, J.A.; Zalba, G.; Martí, A. Pro12Ala polymorphism of the PPAR 2 gene interacts with a mediterranean diet to prevent telomere shortening in the PREDIMED-NAVARRA randomized trial. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2015, 8, 91–99.
225. Garcia-Rios, A.; Gomez-Delgado, F.J.; Garaulet, M.; Alcala-Diaz, J.F.; Delgado-Lista, F.J.; Marin, C.; Rangel-Zuñiga, O.A.; Rodriguez-Cantalejo, F.; Gomez-Luna, P.; Ordovas, J.M.; et al. Beneficial effect of CLOCK gene polymorphism rs1801260 in combination with low-fat diet on insulin metabolism in the patients with metabolic syndrome. *Chronobiol. Int.* 2014, 31, 401–408.
226. López-Guimerà, G.; Dashti, H.S.; Smith, C.E.; Sánchez-Carracedo, D.; Ordovas, J.M.; Garaulet, M. CLOCK 3111 T/C SNP interacts with emotional eating behavior for weight-loss in a Mediterranean population. *PLoS ONE* 2014, 9, e99152.
227. Dimitriou, M.E.; Dedoussis, G.V.Z. Gene–Diet Interactions in Cardiovascular Disease. *Curr. Nutr. Rep.* 2012, 1, 153–160.
228. Jackson, A.A.; Burdge, G.C.; Lillycrop, K.A. Diet, Nutrition and Modulation of Genomic Expression in Fetal Origins of Adult Disease. *J. Nutr. Nutr.* 2011, 3, 192–208.
229. Heijmans, B.T.; Tobi, E.W.; Stein, A.D.; Putter, H.; Blauw, G.J.; Susser, E.S.; Slagboom, P.E.; Lumey, L.H. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 17046–17049.
230. Gallach, S.; Calabuig-Fariñas, S.; Jantus-Lewintre, E.; Camps, C. MicroRNAs: Promising new antiangiogenic targets in cancer. *BioMed Res. Int.* 2014, 2014, 878450.
231. Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet* 2008;24:489–97.
232. Hata A. Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease. *Annu Rev Physiol* 2013;75:69–93. 7. Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet* 2008;24:489–97.
233. Salzman DW, Weidhaas JB. SNPing cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacol Ther* 2013;137:55–63.
234. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN et al .A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;316:889–894 4.

235. Scuderi et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 2007; 3:e115 5.
236. Allahdini M, Kamalidehghan B, Akbari L, Azadfar P, Rahmani A, Ahmadipour F, Meng GY, Masserrat A, Houshmand M. Prevalence of the rs7903146CT polymorphism in TCF7L2 gene for prediction of type 2 diabetes risk among Iranians of different ethnicities. *Drug Des Devel Ther.* 2015 Oct 28;9:5835-41.
237. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007, 316: 889-894.
238. Loos RJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, Prokopenko I, Inouye M, Freathy RM, Attwood AP, Beckmann JS, Berndt SI, Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial, Jacobs KB, Chanock SJ, Hayes RB, Bergmann S, Bennett AJ, Bingham SA, Bochud M, Brown M, Cauchi S, Connell JM, Cooper C, Smith GD, Day I, Dina C, De S, Dermitzakis ET, Doney AS, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 2008, 40: 768 -775.
239. Cecil J, Dalton M, Finlayson G, Blundell J, Hetherington M, Palmer C: Obesity and eating behaviour in children and adolescents: contribution of common gene polymorphisms. *Int Rev Psychiatry* 2012,24:200–210.
240. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med.* 2013 Apr 4;368(14):1279-90.
241. M.D. Kontogianni, N. Vidra, A.E. Farmaki, S. Koinaki, K. Belogianni, S. Sofrona, et al., Adherence rates to the Mediterranean diet are low in a representative sample of Greek children and adolescents, *J. Nutr.* 138 (10) (2008 Oct) 1951e6.
242. Peng S, Zhu Y, Xu F, Ren X, Li X, Lai M: FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis. *BMC Med* 2011, 9: 71.
243. Hardy R, Wills AK, Wong A, Elks CE, Wareham NJ, Loos RJ, Kuh D, Ong KK: Life course variations in the associations between FTO and MC4R gene variants and body size. *Hum Mol Genet* 2010, 19: 545 –552.
244. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 2007; 316:1336–1341; Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007; 316:1341–1345.
245. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2006;38(3):320–323.

246. Ahlqvist E, Ahluwalia TS, Groop L. Genetics of type 2 diabetes. *Clin Chem*. 2011;57(2):241–254.
247. Pollex RL, Hegele RA. Genomic copy number variation and its potential role in lipoprotein and metabolic phenotypes, *Current Opinion in Lipidology* 2007; 18, no. 2, pp. 174–180.
248. Schinner S. Wnt-signalling and the metabolic syndrome, *Hormone and Metabolic Research* 2009, vol. 41, no. 2, pp. 159–163.
249. Helgason A, Pálsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V, Gunnarsdottir S, Adeyemo A, Chen Y, Chen G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Hinney A, Hansen T, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Schäfer H, Faruque M, Doumatey A, Zhou J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Sigurdsson G, Hebebrand J, Pedersen O, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Rotimi C, Stefánsson K. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):218-25.
250. J.D. Fernandez-Ballart, J.L. Piñol, I. Zazpe, et al., Relative validity of a semiquantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain, *Br. J. Nutr.* 103 (2010) 1808e1816.
251. Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T et al (2005) Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ* 330:99.
252. Schnabel RB, Biener MP, Wilde S, Sinning CR, Ojeda FM, Zeller T, Lubos E, Lackner KJ, Warnholtz A, Gori T, Espinola-Klein C, Blankenberg S, Munzel T, Sex differences in non-invasive vascular function in the community, *Wild PS. J Hypertens*. 2013 May 9.
253. SR Mulukutla, L Venkitachalam, C Bambs, KE Kip, A Aiyer, OC Marroquin, SE Reis, Black race is associated with digital artery endothelial dysfunction: results from the Heart SCORE study. *Eur Heart J*. 2010 Aug 24.
254. Morris AA, Patel RS, Binongo JN, Poole J, Mheid IA, Ahmed Y, Stoyanova N, Vaccarino V, Din-Dzietham R, Gibbons GH, Quyyumi A., Racial differences in arterial stiffness and microcirculatory function between black and white americans. *J Am Heart Assoc*. 2013 Apr 8;2(2):e002154. doi: 10.1161/JAHA.
255. Mirmiran P, Bahadoran Z, Ghasemi A, Azizi F. The Association of Dietary L-Arginine Intake and Serum Nitric Oxide Metabolites in Adults: A Population-Based Study. *Nutrients*. 2016;8(5). doi:10.3390/nu8050311.
256. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*. 2001;81(1):209–237.
257. Forte P, Kneale BJ, Milne E, et al. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension*. 1998;32(4):730-734.
258. Katz SD, Khan T, Zeballos GA, et al. Decreased Activity of the L-Arginine–Nitric Oxide Metabolic Pathway in Patients With Congestive Heart Failure. *Circulation*. 1999;99(16):2113-2117. doi:10.1161/01.CIR.99.16.2113.

259. Maas R, Schwedhelm E, Kahl L, et al. Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia. *Clin Chem*. 2008;54(2):292-300. doi:10.1373/clinchem.2007.093575.
260. Tessari P, Cecchet D, Cosma A, et al. Nitric Oxide Synthesis Is Reduced in Subjects With Type 2 Diabetes and Nephropathy. *Diabetes*. 2010;59(9):2152-2159. doi:10.2337/db09-1772.
261. Siervo M, Jackson SJ, Bluck LJ c. In-vivo nitric oxide synthesis is reduced in obese patients with metabolic syndrome: application of a novel stable isotopic method. *J Hypertens*. 2011;29(8):1515-1527. doi:10.1097/HJH.0b013e3283487806.
262. Weitzberg E, Lundberg JO. Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annu Rev Nutr*. 2013;33:129-159. doi:10.1146/annurev-nutr-071812-161159.
263. Dong J-Y, Qin L-Q, Zhang Z, et al. Effect of oral L-arginine supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Am Heart J*. 2011;162(6):959-965. doi:10.1016/j.ahj.2011.09.012.
264. Lerman A, Burnett JC, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR. Long-term L-Arginine Supplementation Improves Small-Vessel Coronary Endothelial Function in Humans. *Circulation*. 1998;97(21):2123-2128. doi:10.1161/01.CIR.97.21.2123.
265. Wolf A, Zalpour C, Theilmeier G, et al. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(3):479-485.
266. Siervo M, Lara J, Ogbonmwan I, Mathers JC. Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis. *J Nutr*. 2013;143(6):818-826. doi:10.3945/jn.112.170233.
267. Lara J, Ashor AW, Oggioni C, Ahluwalia A, Mathers JC, Siervo M. Effects of inorganic nitrate and beetroot supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr*. 2016;55(2):451-459. doi:10.1007/s00394-015-0872-7.
268. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, et al. Acute blood pressure lowering, vasoprotective and anti-platelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension*. 2008;51(3):784-790. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103523.
269. Wightman EL, Haskell-Ramsay CF, Thompson KG, et al. Dietary nitrate modulates cerebral blood flow parameters and cognitive performance in humans: A double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Physiol Behav*. 2015;149:149-158. doi:10.1016/j.physbeh.2015.05.035.
270. Clifford T, Babateen A, Shannon OM, et al. Effects Of Inorganic Nitrate And Nitrite Consumption On Cognitive Function And Cerebral Blood Flow: A Systematic Review And Meta-Analysis Of Randomised Clinical Trials. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018; doi:10.1080/10408398.2018.1453779.

271. Hord NG, Tang Y, Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(1):1-10. doi:10.3945/ajcn.2008.27131.
272. Van der Avoort CMT, Van Loon LJC, Hopman MTE, Verdijk LB. Increasing vegetable intake to obtain the health promoting and ergogenic effects of dietary nitrate. *Eur J Clin Nutr.* March 2018;1. doi:10.1038/s41430-018-0140-z.
273. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(2):156-167. doi:10.1038/nrd2466.
274. Rocha BS, Nunes C, Pereira C, Barbosa RM, Laranjinha J. A shortcut to wide-ranging biological actions of dietary polyphenols: modulation of the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in the gut. *Food Funct.* 2014;5(8):1646-1652. doi:10.1039/c4fo00124a.
275. Medina-Remón A, Tresserra-Rimbau A, Pons A, et al. Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD.* 2015;25(1):60-67. doi:10.1016/j.numecd.2014.09.001.
276. Armah CK, Jackson KG, Doman I, James L, Cheghani F, Miniñane AM. Fish oil fatty acids improve postprandial vascular reactivity in healthy men. *Clin Sci.* 2008;114(11):679-686. doi:10.1042/CS20070277.
277. Balakumar P, Taneja G. Fish oil and vascular endothelial protection: bench to bedside. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(2):271-279. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.005.
278. J. Barbaresko, M. Koch, M.B. Schulze, U. Nöthlings, Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review, *Nutr. Rev.* 71 (8) (2013 Aug) 511e527.
279. M. Bonaccio, C. Cerletti, L. Iacoviello, G.D. Gaetano, Mediterranean diet and sub-clinical chronic inflammation: the MOLI-SANI study, *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* (2014) e-pub ahead of print.
280. M.T. Mitjavila, M. Fandos, J. Salas-Salvado, M.I. Covas, S. Borrego, et al., The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial, *Clin. Nutr.* 32 (2) (2013) 172e178.
281. M. Urpi-Sarda, R. Casas, G. Chiva-Blanch, E.S. Romero-Mamani, P. Valderas-Martínez, et al., Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis, *Pharmacol. Res.* 65 (6) (2012) 577e583.
282. M.P. Mena, E. Sacanella, M. Vazquez-Agell, M. Morales, M. Fito, et al., Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular anti-inflammatory effect of the Mediterranean diet, *Am. J. Clin. Nutr.* 89 (1) (2009) 248e256.

283. C. Marin, R. Ramirez, J. Delgado-Lista, E.M. Yubero-Serrano, P. Perez-Martinez, et al., Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium, *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2) (2011) 267e274.
284. V. Llorente-Cortes, R. Estruch, M.P. Mena, E. Ros, M.A. Gonzalez, et al., Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk, *Atherosclerosis* 208 (2) (2010) 442e450.
285. A. Tuttolomondo, S. La Placa, et al.; Adiponectin, resistin and IL-6 plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlations with clinical variables and cardiovascular co-morbidity; *Cardiovascular Diabetology* 2010, 9:50.
286. Chen C, Jiang J, Lu JM, Chai H, Wang X, Lin PH et al. (2010). Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H193-H201.
287. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Forte GI, Casuccio A, Vaccarino L, Scola L, Pecoraro R, Serio A, Clemente G, Arnao V, Palmeri M, Misiano G, Lio D, Pinto A, Licata G Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of pro-inflammatory/anti-inflammatory and thrombotic/fibrinolytic genes in patients with acute ischemic stroke in relation to TOAST subtype. *Cytokine*. 2012 Jun;58(3):398-405.
288. Antonino Tuttolomondo; Alessandra Casuccio; et al. Mediterranean Diet in patients with acute ischemic stroke: Relationships between Mediterranean Diet score, diagnostic subtype, and stroke severity index; <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.017> 0021-9150/© 2015 Elsevier Ireland Ltd.