

DOCUMENTO SID ACIDI GRASSI E DIABETE

- 1. Effetti degli acidi grassi sul pancreas endocrino**
 - a. Cellule beta pancreatiche (A. Natalicchio)
 - b. Cellule alfa pancreatiche (S. Piro)
- 2. Effetti degli acidi grassi sul fegato** (A. Gastaldelli e G. Targher)
- 3. Effetti degli acidi grassi sul muscolo**
 - a. Cellule muscolari scheletriche e cardiache in vitro (L. Laviola)
 - b. Insulino-resistenza in vivo (G. Perseghin)
- 4. Effetti degli acidi grassi sull'endotelio e sull'apparato vascolare** (A. Natali)
- 5. Relazione tra acidi grassi della dieta e diabete** (R. Giacco)
- 6. Effetti sulla composizione corporea** (F. Leonetti)

1. EFFETTI DEGLI ACIDI GRASSI SUL PANCREAS ENDOCRINO

CELLULE BETA PANCREATICHE

Annalisa Natalicchio

Dipartimento dell’Emergenza e dei Trapianti di Organi, Sezione di Medicina Interna, Endocrinologia, Andrologia e Malattie Metaboliche, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia.

Messaggi chiave

- Gli acidi grassi (FA) esercitano azioni dirette sulla cellula beta pancreatica che dipendono dal tempo di esposizione, dalla lunghezza della catena e dal grado di saturazione.
- Un’esposizione cronica ad alti livelli di acidi grassi saturi (SFAs) determina disfunzione e morte delle cellule beta pancreatiche.
- I dati riguardanti l’azione degli acidi grassi mono e polinsaturi (MUFAs e PUFAs) sulle cellule beta pancreatiche sono ancora controversi.
- L’azione degli FA sulla cellula beta sono mediate prevalentemente da recettori legati a proteine G: GPCRs (*G-Protein-coupled Receptors*) e noti anche come FFARs (*Free Fatty Acids Receptors*).
- I meccanismi di danno lipotossico sono complessi e numerosi, includendo l’ accumulo di ceramide, di ossido nitrico, lo stress ossidativo, l’ER stress, con il coinvolgimento di proteine come PKC α , JNK, P38MAPK, P66Shc, SREBP-1C. Tra i meccanismi di danno delle cellule beta pancreatiche indotto dagli FA vi è la promozione di uno stato di incretino resistenza.

Introduzione

Un aumento cronico dei livelli circolanti di acidi grassi liberi (FFAs) è ormai comunemente associato al progressivo declino della funzionalità e della massa delle cellule beta pancreatiche, tipico del diabete mellito di tipo 2 (DM2) (1). Tale fenomeno prende il nome di lipotossicità e non dipende esclusivamente dal consumo eccessivo di acidi grassi con la dieta, ma anche da un’aumentata sintesi endogena di lipidi conseguente a un eccesso di glucosio (2). Gli FFAs inducono numerosi effetti sulle cellule beta: un’esposizione acuta determina un incremento della secrezione insulinica, al contrario un’esposizione cronica altera la secrezione insulinica glucosio-stimolata (GSIS), sopprime la sintesi di proinsulina e favorisce l’apoptosi (3). Gli effetti degli specifici FFAs sulla secrezione insulinica e sulla morte beta-cellulare sono direttamente correlati al

loro grado di saturazione e alla lunghezza della loro catena carboniosa (4). Nello specifico, a seconda del grado di saturazione, gli acidi grassi introdotti con la dieta possono essere suddivisi in saturi (SFAs), monoinsaturi (MUFAs) e polinsaturi (PUFAs). Se, da un lato, l'effetto dannoso di un eccesso di SFAs sulle cellule beta pancreatiche è ormai comunemente riconosciuto, il comportamento degli acidi grassi insaturi resta ancora controverso. Infatti, sebbene numerosi studi abbiano dimostrato che gli acidi grassi monoinsaturi siano in grado di prevenire, e in alcuni casi anche abolire, la lipotossicità indotta dagli SFAs (5), è noto che l'esposizione cronica delle cellule beta ai singoli MUFAs, così come accade per gli SFAs, risulta essere dannosa e citotossica (6, 7). Allo stesso modo, anche i dati della letteratura riguardanti gli effetti dei PUFAs sulle cellule beta sono contrastanti (8, 9).

Acidi grassi e cellule beta pancreatiche: evidenze in vivo

La prima risposta beta-cellulare all'obesità, e quindi a un eccesso di acidi grassi, è un incremento compensatorio della propria massa funzionale. Studi di autopsie umane hanno rivelato che in soggetti obesi non diabetici la massa beta-cellulare è di circa il 50% più grande rispetto ai magri, mentre nei pazienti con DM2 è ridotta rispetto ai soggetti sani (10). Anche nei modelli murini è riconosciuto che una dieta a elevato contenuto di grassi (HFD) porta a un'iniziale espansione della massa beta-cellulare (10). Numerosi studi hanno investigato in vivo gli effetti di elevati livelli di FFAs sulle cellule beta negli uomini, ma i risultati sono contrastanti: un incremento di acidi grassi in soggetti sani ha determinato, in diversi studi, effetti sia benefici che deleteri sui parametri di funzionalità e sopravvivenza beta-cellulare, indipendentemente dal fatto che l'esposizione fosse avvenuta in acuto o in cronico (11). Al contrario, in soggetti diabetici, con una predisposizione al DM2 o obesi, l'infusione prolungata di lipidi ha determinato un peggioramento della GSIS (11). Questi dati suggeriscono che un incremento transitorio di FFAs nei soggetti sani non è in grado di

indurre un danno lipotossico a livello beta-cellulare, come invece accade in soggetti obesi e ad alto rischio di sviluppare diabete.

Danno a carico delle cellule beta pancreatiche indotto dagli acidi grassi: meccanismi molecolari

Gli studi in vitro hanno permesso di identificare numerosi meccanismi molecolari alla base della disfunzione beta-cellulare indotta dagli acidi grassi (Figura 1). Come prima cosa, gli FFAs sono in grado di ridurre l'espressione del gene dell'insulina in presenza di alti livelli di glucosio, in parte attraverso una regolazione negativa del fattore di trascrizione pancreatic-duodenum homeobox-1 (PDX-1) (12). Alti livelli di acidi grassi liberi portano anche all'accumulo di secondi messaggeri come diacilglicerolo (DAG) e ceramide (5). La ceramide è uno sfingolipide presente in elevate concentrazioni nelle membrane cellulari che partecipa a una serie di processi come il differenziamento, la proliferazione e l'apoptosi. Il trattamento di cellule di insulinoma di ratto INS-1E con analoghi della ceramide riduce la vitalità cellulare (13). DAG e ceramide a loro volta attivano le chinasi PKC, JNK (c-Jun N terminal kinase) e IKK β (IKB-kinase- β) (14). L'attivazione di PKC induce la fosforilazione in serina e treonina di IRS-2 impedendo l'attivazione di AKT e interferendo, di fatto, sulle vie di segnale attivate dall'insulina (15), fondamentali per la sopravvivenza, la crescita e la proliferazione beta-cellulare (16, 17). Inoltre, il trattamento delle cellule beta con acido palmitico, l'acido grasso saturo più abbondante a livello ematico nell'uomo, determina la traslocazione di PKC dal citoplasma al nucleo, dove media l'attivazione diretta della caspasi-3 favorendo il processo apoptotico (18). L'eccesso di FFAs aumenta anche l'attività dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) con un conseguente incremento nella produzione di ossido nitrico (NO), che gioca un ruolo cruciale nei processi di apoptosi beta-cellulari (19). Un ulteriore meccanismo di danno indotto dagli FFAs coinvolge lo stress del reticolo endoplasmatico (ER stress) che è associato all'attivazione dell'unfolded protein response (UPR) e determina un incremento dei livelli di apoptosi in diversi tipi cellulari, comprese le beta cellule (20). È noto,

infatti, che l'esposizione delle cellule all'acido palmitico induce alterazioni nel folding proteico; le proteine non ripiegate correttamente si accumulano a livello dell'ER, inducendo l'attivazione della chinasi eIF2, che fosforila e inibisce il fattore di elongazione eIF2 e quindi blocca la sintesi proteica, induce la degradazione delle proteine alterate e favorisce la sintesi di proteine pro-apoptotiche come BAX, BAK e BAD. In particolare, numerosi studi hanno dimostrato che l'apoptosi beta-cellulare in risposta agli acidi grassi è accompagnata da una down-regolazione delle proteine anti-apoptotiche (BCL-2, BCL-XL e BCL-w) (21) e da un'iperespressione della proteina pro-apoptotica BAX (22); questo squilibrio porta a un'alterazione della permeabilità di membrana mitocondriale esterna (MPTP), alla fuoriuscita di citocromo c e all'attivazione della cascata delle caspasi, con conseguente attivazione dell'apoptosi. Lo stress del reticolo endoplasmatico promuove anche l'attivazione di SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1), un fattore di trascrizione implicato nel metabolismo lipidico a livello beta-cellulare. SREBP-1c riduce significativamente la trascrizione di IRS-2 (23), con conseguente riduzione delle vie di segnale di sopravvivenza mediate da PI3-K/AKT. Yamashita et al. hanno dimostrato che l'overespressione di SREBP-1c nelle cellule beta pancreatiche determina un accumulo di TG, un'alterazione della GSIS e un aumento della sintesi di UCP-2 (mitochondrial uncoupling protein-2) (24), che si traduce in una ridotta efficienza mitocondriale e di conseguenza nell'attivazione del pathway intrinseco dell'apoptosi. Gli SFAs favoriscono anche la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che, quando in eccesso, oltre che nei mitocondri, vengono ossidate anche nei perossisomi, portando alla formazione di alte quantità di perossido di idrogeno (H_2O_2) che, non essendo eliminate dalle cellule beta in quanto prive dell'enzima catalasi, determinano apoptosi e disfunzione. È stato dimostrato che in cellule beta di topo NIT-1 un eccesso di ROS indotto dagli acidi grassi porta all'attivazione dello stress chinasi JNK e p38 MAPK e del fattore di trascrizione NF- κ B, determinando una riduzione dell'attivazione di AKT e un'aumentata espressione di geni pro-apoptotici (25). L'attivazione di JNK

e p38 MAPK rappresenta un evento chiave nei meccanismi di apoptosi indotti dall'acido palmitico; infatti, l'utilizzo di inibitori chimici di entrambe le stress chinasi previene in modo evidente il processo apoptotico (26). Un ruolo importante è svolto da p66^{Shc}, una proteina che funziona come sensore redox ed è implicata nella produzione di ROS e nell'induzione dell'apoptosi (27). I livelli di espressione di p66^{Shc} sono direttamente associati ai livelli intracellulari di ROS. La ridotta espressione di p66^{Shc}, infatti, determina la riduzione dell'attività degli enzimi antiossidanti, l'incremento della NADPH ossidasi e la diminuzione dell'attività della catena respiratoria mitocondriale (28). In isole pancreatiche umane e cellule INS-1E, l'acido palmitico è in grado di indurre un incremento selettivo dell'espressione di p66^{Shc} e della sua fosforilazione in serina 36, con un conseguente aumento nei livelli di apoptosi (29). Allo stesso modo, l'espressione e l'attività di p66^{Shc} sono aumentate in isole pancreatiche isolate da topi nutriti con una dieta ad alto contenuto di grassi e in isole umane derivanti da soggetti obesi o sovrappeso (29). È stato dimostrato che l'apoptosi indotta dall'acido palmitico è ridotta in isole pancreatiche derivanti da topi p66^{Shc} ^{-/-}, e in cellule INS-1E caratterizzate da una riduzione selettiva dell'espressione di p66^{Shc} ottenuta mediante l'utilizzo di un siRNA specifico. Al contrario, l'iperespressione di p66^{Shc} determina un incremento dell'apoptosi beta-cellulare (29). Inoltre, gli effetti pro-apoptotici della proteina p66^{Shc} dipendono dalla sua fosforilazione in serina 36, in quanto l'iperespressione in cellule INS-1E di una proteina p66^{Shc} mutante, con un'alanina in posizione 36 al posto della serina, è in grado di prevenirli. Infine, la proteina p53 potrebbe ricoprire un ruolo cruciale in tale meccanismo, dato che la sua inibizione si è dimostrato essere in grado di prevenire sia l'incremento di p66^{Shc} indotto dall'acido palmitico che l'apoptosi delle cellule beta pancreatiche (29). Un ulteriore meccanismo responsabile della ridotta massa funzionale beta-cellulare nel DM2 potrebbe essere rappresentato dalla dedifferenziazione delle cellule beta pancreatiche, un processo caratterizzato da una ridotta espressione dei geni tipici della cellula beta e dalla

concomitante overespressione di geni solitamente poco espressi a livello di tali cellule (30). Il ruolo degli acidi grassi in tale processo non è ancora del tutto chiaro, tuttavia esistono evidenze che una dieta ad alto contenuto di grassi è in grado di indurre, oltre che apoptosi, anche dedifferenziamento beta-cellulare (31, 32).

Ruolo del GPR40 (G-protein coupled receptor-40) nella lipotossicità

Gli FFAs possono agire sulle cellule beta pancreatiche sia legandosi a uno specifico recettore che diffondendo attraverso la membrana plasmatica. È, infatti, noto che tali cellule possiedono dei recettori di membrana accoppiati a proteina G, originariamente considerati recettori orfani, capaci di interagire con gli FFAs e di mediarne l'azione (33). Nell'uomo, questi recettori sono codificati da geni localizzati sul cromosoma 19 (19q13.1) che specificatamente codificano per tre distinte isoforme: GPR40, GPR41 e GPR43 (34). L'isoforma più espressa sulle cellule beta pancreatiche è il GPR40, un recettore con alta affinità per gli acidi grassi a lunga catena (da 10 a 23 atomi di carbonio), tra cui l'acido palmitico e l'acido oleico (35). Sebbene il GPR40 sia necessario per la secrezione insulinica mediata in acuto dagli FFAs (35), il suo ruolo nel mediare gli effetti negativi degli acidi grassi sulle cellule beta pancreatiche è ancora controverso. Nel 2005, Steneberg et al. (36) hanno dimostrato che topi GPR40^{-/-} sottoposti a una dieta ad alto contenuto di grassi mostravano livelli di insulina a digiuno più bassi, insulino sensibilità periferica aumentata e migliore tolleranza al glucosio rispetto ai topi wild type. Inoltre, le isole pancreatiche isolate da tali topi, se stimulate in vitro con acido palmitico per 48 h, mostravano un'aumentata secrezione insulinica al contrario di quanto osservato nei topi wild type. Questi risultati attribuiscono al GPR40 un ruolo determinante nel mediare gli effetti dannosi di un'esposizione cronica delle cellule beta pancreatiche agli acidi grassi liberi, sebbene altri studi (37, 38) abbiano mostrato che topi GPR40^{-/-} non sono protetti dalla lipotossicità. Recentemente, è stato dimostrato che l'inibizione del GPR40 protegge le cellule beta dallo stress del reticolo endoplasmatico e dall'apoptosi indotti

dall'acido palmitico (39). Natalicchio et al. (26) hanno studiato il ruolo del GPR40 come possibile mediatore degli effetti tossici derivati dall'esposizione cronica delle cellule beta agli SFAs. Nello specifico, è stato dimostrato che il trattamento di tali cellule con l'analogo del GLP-1, exendin-4, contrasta gli effetti pro-apoptotici dell'acido palmitico attraverso una riduzione dei livelli di espressione del GPR40. In aggiunta, l'esposizione cronica delle cellule INS-1E agli agonisti del GPR40 ha determinato un incremento dei livelli di apoptosi, mentre il knockdown del recettore, così come l'incubazione con suoi antagonisti, ha significativamente ridotto la capacità dell'acido palmitico di indurre la fosforilazione di JNK e p38 MPAK e quindi di favorire l'apoptosi beta-cellulare.

Incretino-resistenza delle cellule beta pancreatiche indotta dagli acidi grassi

GLP-1 e GIP sono i principali ormoni incretinici rilasciati dalle cellule enteroendocrine in risposta all'ingestione di nutrienti. Tra i loro numerosi effetti a livello sistemico, uno dei più studiati è la loro capacità di potenziare la GSIS (effetto incretinico). Negli ultimi anni, è stato dimostrato che l'obesità è in grado di ridurre l'effetto incretinico a livello beta-cellulare, in particolare la risposta al GLP-1 (40). Inoltre, elevati livelli di SFAs riducono significativamente gli effetti del GLP-1 in cellule INS-1E e in isole pancreatiche murine (41). È noto che l'acido palmitico è in grado di influenzare negativamente l'azione del GLP-1 e dei suoi analoghi sulle cellule beta pancreatiche, riducendo PDX-1 e di conseguenza l'espressione genica e proteica e il signalling del GLP-1R, in maniera dipendente dall'attivazione di SREBP-1c (42). Questi dati suggeriscono che un eccesso di lipidi potrebbe modulare la responsività beta-cellulare al GLP-1, proponendo l'incetino-resistenza come ulteriore meccanismo di danno beta-cellulare indotto dagli acidi grassi.

Conclusioni

In conclusione, è ampiamente noto che il diabete di tipo 2 è caratterizzato da un progressivo declino della massa e della funzione beta-cellulare e che una delle cause principali di tale deterioramento è la condizione definita "lipotossicità", rappresentata da una cronica esposizione delle cellule beta pancreatiche a elevati livelli di acidi grassi liberi. Pertanto, la conoscenza degli specifici meccanismi molecolari responsabili di lipotossicità beta-cellulare rappresenta un fondamentale obiettivo della ricerca sperimentale, alla luce di recenti scoperte che hanno evidenziato come gli interventi farmacologici possono migliorare i danni beta-cellulari in *vitro*, suggerendo che la progressione verso la malattia diabetica potrebbe essere reversibile.

Figure

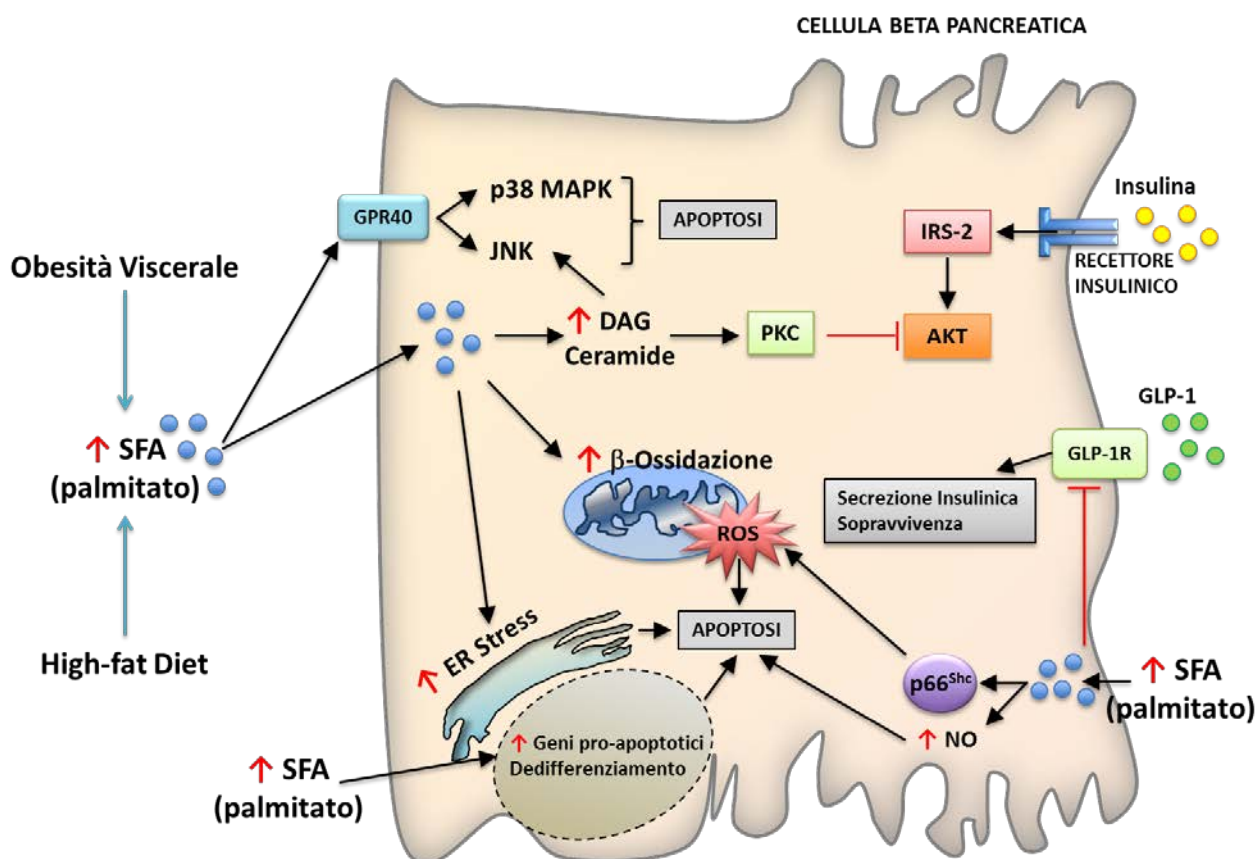


Figura 1. Meccanismi molecolari alla base del danno lipotossico indotto dal palmitato nella cellula beta pancreatica. Una dieta a elevato contenuto di grassi e l'obesità viscerale determinano un aumento della concentrazione ematica di acidi grassi liberi (FFAs). Gli acidi grassi saturi, in particolar modo il palmitato, possono diffondere attraverso la membrana plasmatica delle cellule beta pancreatiche oppure legare un recettore specifico, il GPR40, e indurre apoptosi e disfunzione cellulare. I meccanismi attraverso i quali il palmitato agisce comprendono: accumulo e attivazione di secondi messaggeri tossici come diacilglicerolo (DAG), ceramide, p66^{Shc} e ossido nitrico (NO); aumento della β-ossidazione mitocondriale con produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e induzione dello stress ossidativo; stress del reticolo endoplasmatico (ER stress), attivazione delle stress chinasi JNK e p38 MAPK; induzione di geni pro-apoptotici; dedifferenziamento; blocco del signalling dell'insulina e del GLP-1.

Referenze

1. M. Kasuga. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest* 116(7): 1756-60, 2006.
2. Kusminski CM, Shetty S, Orci L, et al. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis* 14: 1484–95, 2009.
3. Haber EP, Procópio J, Carvalho CRO, et al. New insights into fatty acid modulation of pancreatic beta-cell function. *Int Rev Cytol* 248: 1–41, 2006.
4. Keane DC, Takahashi HK, Dhayal S, et al. Arachidonic acid actions on functional integrity and attenuation of the negative effects of palmitic acid in a clonal pancreatic beta-cell line. *Clin Sci (Lond)* 120(5): 195-206, 2011.
5. Xavier Palomer, Javier Pizarro-Delgado, Emma Barroso, et al. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 Dec 28. pii: S1043-2760(17)30170-4.
6. Maris M, Waelkens E, Cnop M, et al. Oleate-induced beta cell dysfunction and apoptosis: a proteomic approach to glucolipotoxicity by an unsaturated fatty acid. *J Proteome Res* 10: 3372–85, 2011.
7. Oprescu AI, Bikopoulos G, Naassan A, et al. Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo. *Diabetes* 56: 2927–37, 2007.
8. Bhaswant M, Poudyal H, Brown L. Mechanisms of enhanced insulin secretion and sensitivity with n-3 unsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 26(6):571-84, 2015.
9. Åhrén B, Mari A, Fyfe CL, et al. Effects of conjugated linoleic acid plus n-3 polyunsaturated fatty acids on insulin secretion and estimated insulin sensitivity in men. *Eur J Clin Nutr* 63(6):778-86, 2009.
10. Mosser RE, Maulis MF, Moullé VS, et al. High-fat diet-induced β -cell proliferation occurs prior to insulin resistance in C57Bl/6J male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308(7): E573-82. 2015.
11. van Raalte DH, Diamant M. Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy? *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1:S37-46, 2011.
12. Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, et al. Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* 49: 532–6, 2000.
13. Veluthakal R, Palanivel R, Zhao Y, et al. Ceramide induces mitochondrial abnormalities in insulin-secreting INS-1 cells: potential mechanisms underlying ceramide-mediated metabolic dysfunction of the beta cell. *Apoptosis* 10: 841–50, 2005.
14. Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2: S9–S15, 2006.
15. Wrede CE, Dickson LM, Lingohr MK, et al. Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 277: 49676–84, 2002.
16. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55: 2565–82, 2012.
17. Panse M, Gerst F, Kaiser G, et al. Activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2) by free fatty acid receptor 1 (FFAR1/GPR40) protects from palmitate-induced beta cell death but plays no role in insulin secretion. *Cell Physiol Biochem* 35: 1537–45, 2015.
18. Reyland ME. Protein kinase C δ and apoptosis. *Biochem Soc Trans* 35: 1001–4, 2007.

19. Yaekura K, Julyan R, Wicksteed BL, et al. Insulin secretory deficiency and glucose intolerance in Rab3A null mice. *J Biol Chem* 278: 9715–21, 2003.
20. Marchetti P, Bugliani M, Lupi R, et al. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 50: 2486–94, 2007.
21. Lupi R, Dotta F, Marselli L, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51: 1437–42, 2002.
22. Maestre I, Jordán J, Calvo S, et al. Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 144: 335–45, 2003.
23. Ferré P, Fougère F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2: 83–92, 2010.
24. Yamashita T, Eto K, Okazaki Y, et al. Role of uncoupling protein-2 up-regulation and triglyceride accumulation in impaired glucose-stimulated insulin secretion in a beta-cell lipotoxicity model overexpressing sterol regulatory element-binding protein-1c. *Endocrinology* 145: 3566–77, 2004.
25. Yuan H, Zhang X, Huang X, et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of β -cells via JNK, p38 MAPK and p53 pathways. *PLoS One* 5: e15726, 2010.
26. Natalicchio A, Labarbuta R, Tortosa F, et al. Exendin-4 protects pancreatic beta cells from palmitate-induced apoptosis by interfering with GPR40 and the MKK4/7 stress kinase signalling pathway. *Diabetologia* 56: 2456–66, 2013.
27. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402: 309–13, 1999.
28. Galimov ER. The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis. *Acta Naturae* 2: 44–51, 2010.
29. Natalicchio A, Tortosa F, Labarbuta R, et al. The p66Shc redox adaptor protein is induced by saturated fatty acids and mediates lipotoxicity-induced apoptosis in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 58: 1260–1271, 2015.
30. Bensellam M, Jonas JC, Laybutt DR, et al. Mechanisms of β -cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions. *J Endocrinol* 236(2):R109-R143, 2018.
31. Xuan X, Gao F, Ma X, et al. Activation of ACE2/angiotensin (1-7) attenuates pancreatic β cell dedifferentiation in a high-fat-diet mouse model. *Metabolism*. 2017 Dec 7. pii: S0026-0495(17)30339-6.
32. Mia C, Åkerfeldt D, Ross Laybutt. Inhibition of Id1 Augments Insulin Secretion and Protects Against High-Fat Diet-Induced Glucose Intolerance. *Diabetes* 60(10): 2506–2514, 2011.
33. Morgan NG, Dhayal S. G-protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signalling in the pancreatic beta-cell. *Biochem Pharmacol* 78: 1419–27, 2009.
34. Del Guerra S, Bugliani M, D'Aleo V, et al. G-protein-coupled receptor 40 (GPR40) expression and its regulation in human pancreatic islets: the role of type 2 diabetes and fatty acids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20: 22–5, 2010.
35. Kebede M, Alquier T, Latour MG, et al. The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes* 57: 2432–7, 2008.
36. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, et al. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* 1: 245–58, 2005.

37. Lan H, Hoos LM, Liu L, et al. Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease. *Diabetes* 57: 2999–3006, 2008.
38. Brownlie R, Mayers RM, Pierce JA, et al. The long-chain fatty acid receptor, GPR40, and glucolipotoxicity: investigations using GPR40-knockout mice. *Biochem Soc Trans* 36: 950–4, 2008.
39. Wu J, Sun P, Zhang X, et al. Inhibition of GPR40 protects MIN6 β cells from palmitate-induced ER stress and apoptosis. *J Cell Biochem* 113: 1152–8, 2012.
40. Knop FK, Aaboe K, Vilsbøll T, et al. Impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia characterizing type 2 diabetic subjects are early signs of dysmetabolism in obesity. *Diabetes Obes Metab* 14:500–510, 2012.
41. Kang ZF, Deng Y, Zhou Y, Fan RR, Chan JCN, Laybutt DR, Luzuriaga J, Xu G. Pharmacological reduction of NEFA restores the efficacy of incretin-based therapies through GLP-1 receptor signalling in the beta cell in mouse models of diabetes. *Diabetologia*. 2013; 56:423–433.
42. Natalicchio A, Biondi G, Marrano N, et al. Long-term Exposure of Pancreatic Beta-Cells to Palmitate Results in SREBP-1C-dependent Decreases in GLP-1 Receptor Signaling via CREB and AKT and Insulin Secretory Response. *Endocrinology* 157: 2243–58, 2016.

CELLULE ALFA PANCREATICHE

Salvatore Piro

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania, Catania, Italia.

Messaggi chiave

- Gli acidi grassi (FA) hanno azioni dirette sulla cellula alfa pancreatica. Le azioni tuttavia dipendono dalla lunghezza della catena, dal grado di saturazione e dalla conformazione spaziale delle molecole in esame.
- Le azioni degli FA sulla cellula alfa sono mediate prevalentemente da recettori legati a proteine G: GPCRs (*G-Protein-coupled Receptors*) e noti anche come FFARs (*Free Fatty Acids Receptors*).
- Per la corretta interpretazione delle azioni degli FA sulla cellula alfa pancreatica è necessario distinguere l'effetto stimolatorio in condizioni di normoglicemia (fisiologia) o in presenza di ipo- o iperglicemia (fisiopatologia).
- Il palmitato potrebbe indurre insulino-resistenza a livello delle alfa cellule pancreatiche, causando la mancata inibizione della secrezione di glucagone in corso di iperglicemia.

Acidi grassi e cellula alfa pancreatica: una breve panoramica sulle problematiche aperte

Gli acidi grassi (FA) rappresentano la sorgente endogena di energia più importante per l'isola pancreatica. In maniera analoga a quanto è noto per la cellula beta pancreatica, anche per la cellula alfa, gli FA svolgono un ruolo critico sia per la secrezione ormonale di glucagone sia per la funzione e per la vitalità di questa popolazione cellulare (1). Tuttavia, se per quanto riguarda le azioni degli acidi grassi sulle beta cellule pancreatiche nell'ultimo ventennio molti aspetti sono stati descritti e chiariti, per quanto riguarda le cellule alfa molti aspetti hanno bisogno di decisivi approfondimenti. Tra questi per esempio non è chiaro se la diversa composizione degli FA, a catena lunga *versus* a catena corta oppure con conformazione *cis versus* conformazione *trans*, possa determinare un differente effetto secretorio o funzionale. Inoltre, data l'importanza della cellula alfa e del glucagone per la salvaguardia dai fenomeni ipoglicemici dell'organismo, bisognerà comprendere in dettaglio le azioni degli acidi grassi in condizioni di ipoglicemia, di normoglicemia o ancora di iperglicemia, così come normalmente avviene in corso di diabete mellito. I dati in

nostro possesso contribuiscono ad alimentare questa complessità, poiché com'è noto esistono differenze tra dati ottenuti *in vitro* in sistemi cellulari in coltura continua o in cellule isolate dalle isole *ex vivo*. Esistono inoltre differenze tra dati ottenuti in isole pancreatiche intere isolate, verso dati ottenuti *in vivo* nell'uomo o nell'animale. Quest'ultimo aspetto in particolare potrebbe risentire delle procedure di isolamento delle isole pancreatiche e della differente distribuzione delle cellule alfa all'interno dell'isola che sono prevalentemente distribuite in superficie nelle isole di roditore o di maiale mentre nell'uomo sono distribuite spazialmente in maniera più disordinata (2, 3). Per questo motivo le isole di roditore, dove la maggior parte dei dati disponibili sono stati prodotti, potrebbero presentare questo *bias* dovuto al danno indotto dai processi di digestione applicati ai pancreas in studio. Inoltre, essendo la cellula alfa più instabile dal punto di vista epigenetico (4, 5) si potrebbe ipotizzare una differente risposta al trattamento cronico con FA in termini di resistenza alla lipotossicità. In aggiunta a quanto detto, ancora, data l'instabilità fenotipica di queste cellule, l'effetto degli FA potrebbe tradursi in fenomeni di differenziamento (es. da precursori staminali verso alfa cellula o viceversa) o di trans-differenziamento (es. alfa verso beta cellula) che risultano ad oggi ancora privi di interpretazione definitiva. Per tutti questi aspetti elencati e per molti altri ancora, potremmo sostenere che alla data attuale non è possibile disporre di punti forti relativi all'azione degli acidi grassi liberi sulla cellula alfa pancreatica.

Glucagone, diabete e acidi grassi: quale legame

Le alterazioni secretorie riscontrate nel diabete mellito, oltre al difetto di secrezione insulinica, prevedono alterazioni dei livelli di glucagone prodotto dall'isola pancreatica. I livelli di glucagonemia sono stati al centro di ricerche e speculazioni sia per il loro ruolo in corso di ipoglicemia (azione controregolatoria) che per spiegare l'iperglicemia, prevalentemente a digiuno, da neoglucogenesi epatica. Il primo aspetto, più tipico del diabete mellito di tipo 1, viene descritto

dopo anni dall'esordio della patologia ed è coinvolto nelle alterazioni della risposta controregolatoria alle ipoglicemie; il secondo aspetto, tipico sia del diabete tipo 1 che del tipo 2, sarebbe il responsabile dell'iperglicemia a digiuno da neo-glucogenesi epatica per gli aumenti assoluti o relativi dei livelli di glucagone plasmatici derivanti dalla disfunzione delle cellule alfa pancreatiche (6). Se per anni questi aspetti sono stati considerati tipici del diabete mellito e riscontrabili anni dopo l'insorgenza clinica, oggi è noto come queste alterazioni, assieme ad altre a carico degli ormoni gastro-intestinali, possano verificarsi prima della diagnosi clinica di diabete, quando ancora l'omeostasi glicemica non è definitivamente compromessa. Comprendere il ruolo degli FA nelle fasi che precedono l'esordio del diabete potrebbe quindi essere uno degli aspetti critici per la comprensione delle basi fisiopatologiche del diabete mellito.

Effetto degli acidi grassi sulla secrezione di glucagone: ruolo della lunghezza della catena, del grado di saturazione, della conformazione spaziale in presenza o in assenza di glucosio

È noto come gli acidi grassi possano stimolare la secrezione di glucagone da parte della cellula alfa pancreatica. Tale fenomeno è stato variamente descritto negli ultimi anni e i meccanismi molecolari e funzionali descritti sembrano essere molti simili a quelli noti per la cellula beta pancreatica e per la secrezione di insulina. Tra questi, per esempio, appare certo come la depolarizzazione della membrana cellulare, il potenziale di membrana, l'aumento dei livelli di calcio intracellulare e l'esocitosi dei granuli possano essere controllati dallo stimolo acuto con palmitato (7) o con FA in generale (1). Un ruolo chiave per la secrezione di glucagone indotta dagli FA è rivestito dai recettori di membrana legati a proteine G, noti come GPCRs (*G-Protein-coupled Receptors*) e noti anche come FFARs (*Free Fatty Acids Receptors*) (Figura 1) (8). Tra i recettori di questa famiglia, il GPR120 sembra svolgere un ruolo chiave per la secrezione di glucagone e per la cellula alfa pancreatica (9). Il GPR40 invece sembra associato al controllo delle concentrazioni di calcio intracellulare e quindi al legame calcio-esocitosi (10). Questi recettori presenti in diverse

isoforme rispondono agli acidi grassi in maniera differente e la loro risposta può dipendere dalla lunghezza della catena degli acidi grassi legati e dal grado di saturazione degli stessi. Tuttavia, per la comprensione delle azioni degli FA sulla cellula alfa pancreatica è necessario distinguere l'effetto stimolatorio in condizioni di normoglicemia (fisiologia) o in presenza di ipo- o iperglicemia (fisiopatologia). Per la definizione di questi aspetti un articolo pionieristico di oltre dieci anni fa ha contribuito a tracciare la via per le ricerche moderne (1). Nel 2005 Jing Hong e collaboratori, infatti, descrivevano come il palmitato [C16:0] era in grado di stimolare la secrezione di glucagone sia in isole di topo che in cellule alfa in coltura continua. In questo studio, testando differenti FA con differente lunghezza della catena (da [C8:0] a [C 18:0]) gli autori dimostravano che esisteva un effetto sulla secrezione di glucagone di tipo dose-dipendente e affermavano che tale effetto era dovuto alla lunghezza della catena che componeva l'acido grasso. Gli FA a catena corta non erano in grado di determinare secrezione di glucagone; dal laurato [C 12:0] in poi l'effetto stimolatorio era osservabile con una maggiore azione stimolatoria in presenza di bassi livelli di glucosio (3,3 mmol/L, circa 60 mg/dl). Come atteso inoltre, questi effetti erano ridotti a concentrazioni di glucosio più elevate (16,7 mmol/L, circa 300 mg/dl). In questo lavoro, inoltre, veniva evidenziato come la conformazione *trans* era più efficace rispetto agli isomeri *cis*, mentre la presenza di doppi legami tipici degli FA poli-insaturi non era determinante o significativamente differente rispetto agli FA saturi ai fini della induzione della secrezione ormonale. Questi risultati potrebbero, seppur *in vitro*, spiegare l'azione degli FA in condizioni di esposizione acuta; tuttavia poco è noto in merito all'esposizione prolungata nel tempo. Esistono evidenze, *in vitro* e *in vivo*, di come le condizioni pro-diabetogene in cui si riscontri un aumento cronico degli FA come preludio dell'insorgenza del diabete, potrebbero determinare inappropriata secrezione di glucagone; l'iperglucagonemia indotta dall'aumento degli FA circolanti, di conseguenza, sosterebbe l'iperglicemia prevalentemente a digiuno. Per esempio, un modello di studio che conferma tali alterazioni

secretorie indotte dagli FA e tale consequenzialità temporale è rappresentato dal ratto ZDF (11, 12). In questo modello animale i livelli di palmitato, assieme ad altri FA, aumentano spontaneamente intorno alla 14^a settimana di vita (12-14). In questo periodo di vita, in questi animali compare iperglicemia e diabete come conseguenza dell'aumento degli acidi grassi liberi circolanti. In queste condizioni sperimentali i livelli di glucagone misurati risultavano elevati, ancor prima che il deficit insulinico potesse rendersi manifesto. Comportamenti analoghi, tipici di condizioni di obesità o di insulino-resistenza, sono stati descritti anche nell'uomo *in vivo* (15). È stato dimostrato inoltre che l'esposizione prolungata a elevati livelli di FA, e in particolare a palmitato, possa determinare l'accumulo di trigliceridi all'interno delle cellule alfa in un modello di isole di topo (16). Questa similitudine con quanto descritto nel modello ZDF lascerebbe supporre che gli FA potrebbero indurre danno cellulare da lipotossicità oltre che per le cellule beta anche per le alfa. A conferma di queste ipotesi, alcune evidenze sono state prodotte anche per quanto riguarda i livelli di autofagia indotti dagli FA nella cellula alfa (17). Tuttavia, altre evidenze legate all'esposizione ad acidi grassi indicano che la cellula alfa possa rispondere anche in maniera differente, rispetto alla beta, agli stress citotossici e addirittura potrebbe risultare resistente all'apoptosi indotta dal palmitato (18). Il significato di questo dato e di queste apparenti differenze di risposta agli stress metabolici, e in generale la comprensione di questi aspetti di comportamento cellulare, resta tuttavia ancora aperto all'interpretazione. Questo aspetto potrebbe dipendere dalla maggiore plasticità epigenetica di queste cellule e dalla capacità di transdifferenziare verso altre tipologie cellulari (4, 19). Un dato recente per esempio indica come l'esposizione prolungata al palmitato in modelli murini determini un aumento del numero di cellule "pro-alfa" come precursori cellulari in grado di produrre GLP-1 all'interno dell'isola pancreatica e di ripopolare l'isola di nuove beta cellule (20). In questo modello lo stress metabolico, negativo per le cellule beta, potrebbe addirittura diventare vantaggioso per le cellule

alfa e per i precursori di queste. Evidenze simili sono anche state prodotte in modelli cellulari immortalizzati (21). Si potrebbe quindi dedurre come l'esposizione cronica a FA possa determinare una perdita della normale funzionalità delle cellule alfa pancreatiche dell'isola in cambio di un probabile beneficio differenziativo. Resta quindi da capire come le cellule alfa interagiscano con gli ormoni dell'isola e con gli stimoli ormonali e metabolici dell'organismo. Il difetto secretorio delle cellule alfa inoltre potrebbe sottendere altri difetti che precedono la secrezione del glucagone; le azioni degli FA sulla cellula delta, per esempio, e sulla secrezione di somatostatina, potrebbero anticipare quelli del glucagone, così come evidenziato da Rorsman e dai suoi collaboratori (22). Le alterazioni funzionali identificabili con l'aumento della secrezione di glucagone potrebbero quindi avere interpretazioni di tipo extra-glicemico che tuttavia ad oggi risultano difficili da definire. Resta certo come il ruolo degli ormoni gastrointestinali, in particolare GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*) e GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide 1*), non può prescindere dalla funzione e dalla vitalità della cellula alfa. Sarebbe utile quindi in quest'ottica comprendere anche il ruolo degli FA sulle cellule endocrine intestinali e sulla secrezione di GIP e GLP-1, così come la valutazione dell'effetto degli FA sulla possibile produzione di GLP-1 all'interno dell'isola (23). Questi ormoni potrebbero avere un ruolo anche nelle fasi precoci di disfunzione alfa cellulare che precedono l'esordio clinico di diabete mellito e potrebbero supportare e condizionare l'isola pancreatica in corso di danno metabolico.

FA e cellula alfa pancreatica: possibili meccanismi molecolari

In fisiologia la cellula alfa è influenzata sia dai livelli di glucosio circolanti che da molti ormoni. L'insulina in particolare riveste un ruolo critico nel controllo della secrezione di glucagone. Pertanto, la vicinanza tra cellule alfa e beta all'interno dell'isola pancreatica potrebbe svolgere un ruolo chiave nella secrezione del glucagone. Poiché nei pazienti con diabete mellito è osservabile una disfunzione secretoria della cellula alfa e dei livelli di glucagone circolante,

inappropriatamente elevato rispetto ai valori di glicemia, da sempre si è pensato ad una possibile insensibilità di queste cellule sia al glucosio sia all'insulina (24, 25). Tuttavia, poter misurare il grado di competenza al glucosio delle cellule alfa e la sensibilità all'insulina risulta difficile poiché questa popolazione cellulare è complessa nella funzione, nell'isolamento e nella caratterizzazione. I modelli disponibili sono pochi e inoltre, per quanto espresso all'inizio di questo capitolo, le variabili di studio sono molteplici. Per esempio, è noto che studiare la secrezione di glucagone è differente quando effettuata in isole pancreatiche intere o in cellule disgregate dopo digestione dell'isola (26, 27); probabilmente una serie di varianti sono condizionate dalle interazioni tra le cellule dell'isola e queste influenze di conseguenza possono condizionare la secrezione ormonale finale. Al fine di valutare questi aspetti nella fisiopatologia del diabete sono state studiate le α -TC1, una linea immortalizzata di alfa cellule che si presta bene a studi con queste finalità (28). In questo modello cellulare l'esposizione prolungata con palmitato (fino a 48 ore) era in grado di determinare aumento della secrezione di glucagone dopo stimolo con glucosio. Sorprendentemente, in queste cellule esposte cronicamente al palmitato, le vie di trasduzione del segnale insulinico intracellulare erano compromesse, con una riduzione dell'attivazione del recettore dell'insulina e del suo segnale intracellulare in seguito a stimolazione acuta con l'ormone. Quindi, in questo modello *in vitro*, l'esposizione cronica con palmitato era in grado di determinare insulino-resistenza a livello delle cellule alfa ed aumento della secrezione di glucagone. In questo modello, nelle cellule esposte cronicamente al palmitato, lo stimolo acuto con insulina, anche a concentrazioni *sovra-fisiologiche*, non era più in grado di bloccare la secrezione di glucagone (Figura 1) (29). Speculando su questi risultati ottenuti *in vitro*, si potrebbe immaginare come l'esposizione cronica al palmitato, anche nell'uomo *in vivo*, potrebbe rendere queste cellule insulino-resistenti. L'insulina quindi, fisiologicamente in grado di controllare la secrezione di glucagone, potrebbe divenire inefficace in presenza di elevati livelli di FA. Questo

potrebbe spiegare la mancata inibizione della secrezione di glucagone nelle condizioni tipiche di prediabete o di diabete. Questi dati, trovano riscontro in risultati ottenuti *in vivo* nell'uomo. Recentemente, infatti, Niederwanger e collaboratori hanno dimostrato che le diete ad alto contenuto lipidico possano indurre aumento della lipemia post-prandiale in soggetti volontari sani (15). In queste condizioni gli autori mostravano un'inadeguata risposta della cellula alfa pancreatica in termini di secrezione di glucagone. Tale alterazione secretoria (mancata soppressione) era evidenziata sia dopo stimolo con alto glucosio che con insulina (15). Gli autori concludevano il lavoro affermando che l'aumento degli FA circolanti potesse determinare alterazioni della funzione secretoria delle cellule alfa pancreatiche.

Conclusioni

Sebbene il ruolo degli acidi grassi sulla cellula alfa sia certo, il significato di questa interazione ed il contributo qualitativo e quantitativo di questa classe di nutrienti non è chiaro. La difficoltà nello studio di questa famiglia cellulare e la riscoperta tardiva di queste cellule come elemento chiave nella patogenesi del diabete ha determinato un ritardo anche nella produzione di evidenze scientifiche a supporto. Alla data attuale possiamo affermare che gli FA stimolano la secrezione di glucagone, influenzano la vitalità delle cellule alfa e potrebbero contribuire al potenziale differenziativo e trans-differenziativo di queste cellule. Ad oggi, i meccanismi che sottendono tali processi non sono stati completamente chiariti. Tuttavia, resta certo e indiscusso il ruolo degli FA nella fisiopatologia del diabete mellito e la cellula alfa è sicuramente da annoverarsi tra i possibili bersagli cellulari di questa classe di nutrienti.

Figure

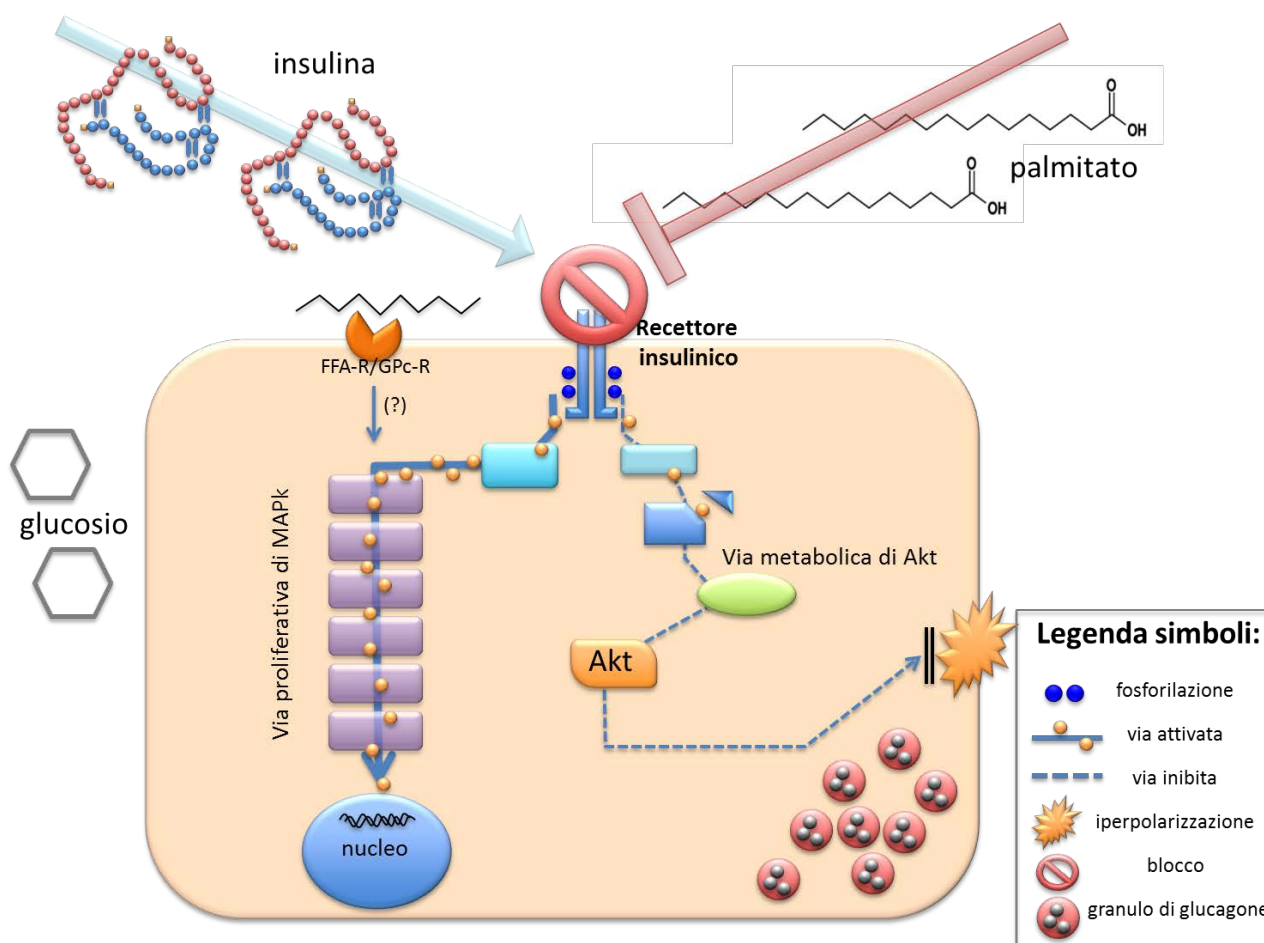


Figura 1. Effetti del palmitato sulla cellula alfa pancreatica: rappresentazione schematica dell'azione del palmitato sulla cellula alfa pancreatica e sul segnale insulinico intracellulare. In fisiologia l'insulina e il glucosio controllano la secrezione di glucagone; quando la glicemia aumenta, l'aumento dei livelli di insulina all'interno dell'isola blocca la secrezione di glucagone. Questa azione di controllo si esplica tramite l'attivazione della via intracellulare di Akt (via metabolica) che determina iper-polarizzazione della membrana cellulare. Il palmitato, come dimostrato in sistemi cellulari *in vitro*, è in grado di bloccare la fosforilazione del recettore insulinico, compromettendo la via intracellulare di Akt. In condizioni di insulino-resistenza, inoltre, l'aumento dei livelli di insulina potrebbe attivare la via di MAPK. Gli acidi grassi potrebbero agire sulla cellula alfa anche tramite i recettori GPCR/FFARs. Questi recettori potrebbero controllare vie molecolari intracellulari ancora non del tutto descritte.

Referenze

1. Hong J, Abudula R, Chen J, et al. The short-term effect of fatty acids on glucagon secretion is influenced by their chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro. *Metabolism: clinical and experimental* 54:1329-1336, 2005.
2. Kim A, Miller K, Jo J, et al. Islet architecture: A comparative study. *Islets* 1:129-136, 2009.
3. Jeon J, Correa-Medina M, Ricordi C, et al. Endocrine cell clustering during human pancreas development. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 57: 811-824, 2009.
4. Bramswig NC, Everett LJ, Schug J, et al. Epigenomic plasticity enables human pancreatic alpha to beta cell reprogramming. *The Journal of clinical investigation* 123: 1275-1284, 2013.
5. Hall E, Volkov P, Dayeh T, et al. Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Med* 12:103, 2014.
6. Edgerton DS, Kraft G, Smith M, et al. Insulin's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion. *JCI Insight* 2: e91863, 2017.
7. Olofsson CS, Salehi A, Gopel SO, et al. Palmitate stimulation of glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells results from activation of L-type calcium channels and elevation of cytoplasmic calcium. *Diabetes* 53: 2836-2843, 2004.
8. Miyamoto J, Hasegawa S, Kasubuchi M, et al. Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *Int J Mol Sci* 17: 450, 2016.
9. Suckow AT, Polidori D, Yan W, et al. Alteration of the glucagon axis in GPR120 (FFAR4) knockout mice: a role for GPR120 in glucagon secretion. *The Journal of biological chemistry* 289: 15751-15763, 2014.
10. Wang L, Zhao Y, Gui B, et al. Acute stimulation of glucagon secretion by linoleic acid results from GPR40 activation and $[Ca^{2+}]_i$ increase in pancreatic islet $\{\alpha\}$ -cells. *The Journal of endocrinology* 210: 173-179, 2011.
11. Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y, et al. Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats. *The Journal of biological chemistry* 273: 3547-3550, 1998.
12. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, et al. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2498-2502, 1998.
13. Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, et al. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *The Journal of biological chemistry* 273: 32487-32490, 1998.
14. Zhou YT, Grayburn P, Karim A, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 1784-1789, 2000.
15. Niederwanger A, Ciardi C, Tatarczyk T, et al. Postprandial lipemia induces pancreatic alpha cell dysfunction characteristic of type 2 diabetes: studies in healthy subjects, mouse pancreatic islets, and cultured pancreatic alpha cells. *Am J Clin Nutr* 100: 1222-1231, 2014.
16. Hong J, Jeppesen PB, Hermansen K. Effects of elevated fatty acid and glucose concentrations on pancreatic islet function in vitro. *Diabetes, obesity & metabolism* 11: 397-404, 2009.
17. Sun Q, Nie S, Wang L, et al. Factors that Affect Pancreatic Islet Cell Autophagy in Adult Rats: Evaluation of a Calorie-Restricted Diet and a High-Fat Diet. *PloS one* 11: e0151104, 2016.

18. Marroqui L, Masini M, Merino B, et al. Pancreatic alpha Cells are Resistant to Metabolic Stress-induced Apoptosis in Type 2 Diabetes. *EBioMedicine* 2: 378-385, 2015.
19. Thorel F, Nepote V, Avril I, et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464: 1149-1154, 2010.
20. Huang C, Yuan L, Cao S. Endogenous GLP-1 as a key self-defense molecule against lipotoxicity in pancreatic islets. *Int J Mol Med* 36: 173-185, 2015.
21. Sancho V, Daniele G, Lucchesi D, et al. Metabolic regulation of GLP-1 and PC1/3 in pancreatic alpha-cell line. *PloS one* 12: e0187836, 2017.
22. Collins SC, Salehi A, Eliasson L, et al. Long-term exposure of mouse pancreatic islets to oleate or palmitate results in reduced glucose-induced somatostatin and oversecretion of glucagon. *Diabetologia* 51: 1689-1693, 2008.
23. Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, et al. A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia* 55: 3262-3272, 2012.
24. Unger RH. Alpha- and beta-cell interrelationships in health and disease. *Metabolism: clinical and experimental* 23: 581-593, 1974.
25. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *The Journal of clinical investigation* 122: 4-12, 2012.
26. Pipeleers DG, in't Veld PA, Van de Winkel M, et al. A new in vitro model for the study of pancreatic A and B cells. *Endocrinology* 117: 806-816, 1985.
27. Pipeleers DG, Schuit FC, in't Veld PA, et al. Interplay of nutrients and hormones in the regulation of insulin release. *Endocrinology* 117: 824-833, 1985.
28. Hong J, Chen L, Jeppesen PB, et al. Stevioside counteracts the alpha-cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 290: E416-422, 2006.
29. Piro S, Maniscalchi ET, Monello A, et al. Palmitate affects insulin receptor phosphorylation and intracellular insulin signal in a pancreatic alpha-cell line. *Endocrinology* 151: 4197-4206, 2010.

2. EFFETTI DEGLI ACIDI GRASSI SUL FEGATO

Amalia Gastaldelli ¹, Giovanni Targher ²

¹ Laboratorio di Rischio Cardiometabolico, Istituto di Fisiologia Clinica, Pisa, Italia.

² Dipartimento di Medicina, Sezione di Endocrinologia, Diabete e Metabolismo, Università di Verona, Verona, Italia.

Messaggi chiave

- Il fegato è uno degli organi con maggior assorbimento e metabolismo degli acidi grassi liberi (FFA) circolanti, tramite ossidazione, produzione di trigliceridi (TG) o usati per la sintesi di altre specie lipidiche (es ceramidi e fosfolipidi).
- L'eccesso di FFA nel fegato porta non solo all'accumulo di lipidi (steatosi epatica non alcolica, NAFLD) ma anche ad aumentata tossicità cellulare (lipotossicità epatica)
- Il fegato è anche in grado di sintetizzare FFA (principalmente FFA saturi) tramite de novo lipogenesi (DNL). La DNL è aumentata nella NAFLD.
- La dieta induce un significativo miglioramento e/o regressione del danno epatico nella NAFLD se è associata ad una restrizione delle calorie giornaliere in grado di indurre un significativo calo ponderale (>5% del peso corporeo)
- Per quanto riguarda l'apporto dietetico degli acidi grassi, vi è una ragionevole evidenza che una dieta ricca di acidi grassi saturi favorisce l'accumulo di lipidi epatici, mentre una dieta più ricca in acidi grassi monoinsaturi e/o poli-insaturi sembra essere meno steatogenica
- Tuttavia, i dati clinici attualmente disponibili riguardo un possibile beneficio di modifiche esclusivamente qualitative della composizione di una dieta isocalorica sulla NAFLD sono ancora insufficienti.

Introduzione

Il fegato è uno degli organi con maggior assorbimento e metabolismo degli acidi grassi liberi (FFA) circolanti (Figura 1). Nel fegato gli FFA possono essere ossidati (tramite la beta-ossidazione mitocondriale per produrre ATP) oppure essere ri-esterificati a trigliceridi (TG); i TG, a loro volta, vengono secreti come lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) o immagazzinati negli epatociti come gocce lipidiche, formando grasso ectopico (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD). Inoltre, alcuni acidi grassi, come l'acido palmitico, vengono utilizzati per la produzione di particolari specie lipidiche quali sfingolipidi e ceramidi (1). L'eccesso di FFA circolanti è inoltre associato anche ad un aumento della gluconeogenesi epatica (2) con conseguente incremento della produzione epatica di glucosio con possibile comparsa di iperglicemia diabetica (3), insulino-resistenza (IR) e

lipotossicità (4, 5). Tuttavia, gli FFA non vengono utilizzati direttamente per la produzione di glucosio, ma piuttosto utilizzati per produrre l'ATP necessario per la gluconeogenesi. Nei pazienti con NAFLD, la sintesi di VLDL e la beta-ossidazione epatica degli acidi grassi sono spesso aumentate, suggerendo che la secrezione delle VLDL non è un difetto primario che spiega un aumento del TG epatico, ma piuttosto un processo saturabile (6, 7). Quindi, i trigliceridi epatici si accumulano principalmente a causa dell'eccesso della lipolisi periferica a livello del tessuto adiposo, che determina un flusso aumentato di FFA con conseguente maggior assorbimento epatico (6, 7). Come evidenziato nella Figura 1, la *de novo* lipogenesi (DNL) e una dieta ricca di grassi saturi concorrono allo sviluppo di NAFLD (1). Inoltre, l'aumentata secrezione di VLDL è associata a un aumento dei livelli circolanti di colesterolo LDL, dovuto allo scambio di esteri di colesterolo e trigliceridi tra LDL e VLDL attraverso l'aumentata attività della proteina di trasferimento dell'estere del colesterolo (CETP) e della lipasi epatica (HL) (8). Alti livelli circolanti di LDL e CD-36 solubile sono associati a un aumentato rischio di aterosclerosi e malattia cardiovascolare (9, 10). Tutti questi meccanismi contribuiscono a spiegare l'aumentato rischio cardiovascolare osservato nei pazienti con NAFLD (11).

Ruolo dell'insulino-resistenza

L'IR gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo epatico degli FFA. Nei soggetti con IR la secrezione pancreatica di insulina è aumentata, sia a digiuno che nella fase post-prandiale, poiché i tessuti periferici dell'organismo richiedono maggiori concentrazioni di insulina per l'assorbimento del glucosio. L'iperinsulinemia dovrebbe inibire la lipolisi del tessuto adiposo, ma nei soggetti con NAFLD e/o diabete tipo 2 (T2D), l'IR è presente non solo a livello muscolare ma anche a livello del tessuto adiposo (Adipo-IR), che rilascia quindi una maggiore quantità di FFA (2, 6). L'Adipo-IR influenza quindi anche la sensibilità insulinica a livello epatico poiché l'insulina è un ormone

adipogenico e, in presenza di maggiori substrati circolanti, favorisce la sintesi di trigliceridi epatici (7, 12).

***De novo* lipogenesi**

La DNL rappresenta la sintesi di acidi grassi a partire da acetyl-CoA (13). In presenza di eccesso di substrati (soprattutto di carboidrati semplici) vi è un aumento della sintesi epatica di acetyl-CoA, che viene poi utilizzato per la sintesi degli acidi grassi (1, 14, 15). Il primo step della DNL è la sintesi di acido palmitico che, a sua volta, può trasformarsi in acido stearico (per un processo di elongazione) oppure essere desaturato ad acido palmitoleico. La DNL è aumentata fino a tre volte nella NAFLD, favorendo così il sovraccarico lipidico proveniente dalla lipolisi periferica e la deposizione di grasso epatico (15, 16). DNL è un processo strettamente regolato da diversi ormoni e da una complessa rete di recettori nucleari e fattori di trascrizione, come sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) e peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma, che sono in grado di regolare l'espressione di vari geni lipogenici, quali ACC, FAS e ATP-citrato liasi (17, 18).

Lipotossicità epatica

L'eccesso di FFA nel fegato porta non solo all'accumulo di lipidi (NAFLD) ma anche ad aumentata tossicità cellulare (lipotossicità). La lipotossicità epatica gioca un ruolo chiave sia nella progressione della NAFLD che nell'incidenza di T2D, in quanto aumenta la perossidazione lipidica, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e il rilascio di molteplici citochine infiammatorie e profibrotiche, tra cui interleuchina-8, TGF-beta, MCP-1 e il TNF- α (7, 12, 14, 19, 20). Le adipocitochine contribuiscono all'infiammazione epatica attraverso la perossidazione lipidica e la modulazione della risposta infiammatoria. L'eccesso di FFA può causare ulteriore disfunzione mitocondriale e stress ossidativo, promuovendo la produzione di ROS e

l'infiammazione degli epatociti, favorendo così lo sviluppo di NASH. Inoltre, l'eccesso di FFA favorisce l'apoptosi epatocitaria (20) e attiva una risposta fibrogenica delle cellule stellate epatiche, che favorisce la progressione della NAFLD verso la NASH e cirrosi (14, 21).

Ruolo delle lipasi

Un fattore importante nel metabolismo degli acidi grassi è l'azione 'disfunzionale' delle lipasi. La mobilizzazione dei TG intracellulari è mediata dalle lipasi, in particolare la lipasi ormone-sensibile (HSL) e la lipasi dei trigliceridi adiposi (ATGL). Oltre ad ATGL, il fegato contiene altre lipasi intracellulari come la trigliceride lipasi 1 e 2, mentre l'HSL è espressa a un livello piuttosto basso. ATGL e HSL agiscono in modo coordinato: ATGL è la principale lipasi responsabile dell'idrolisi del primo FFA dei TG, formando diacilglicerolo (DAG); in seguito, HSL completa l'idrolisi di DAG, rilasciando altri due FFA. Sebbene la regolazione di ATGL e la sua funzione fisiologica rimangano ancora da definire nel fegato, alcuni dati sperimentali consentono di concludere che tale lipasi è fondamentale nella mobilizzazione dei TG epatici. È stato infatti documentato che topi knockout per ATGL sviluppano NAFLD, mentre la iper-espressione epatica di ATGL si associa ad un'aumentata beta-ossidazione, rilascio di FFA e risoluzione della NAFLD sia in topi ob/ob che in topi trattati con dieta ad alto contenuto di grassi (14). Nel fegato dei soggetti con NAFLD, l'ATGL è mal funzionante, e la sua ridotta espressione si associa ad aumentato accumulo di TG epatici, indipendentemente dal grado di IR (1, 22). Anche la lipoproteina lipasi (LPL) circolante svolge un ruolo importante nel metabolismo degli acidi grassi epatici. Studi sia nel modello animale che nell'uomo hanno dimostrato che i chilomicroni, che si formano durante il pasto, possono essere parzialmente idrolizzati dalla lipoproteina lipasi (LPL), rilasciando FFA nel plasma ('spillover'). Questi FFA derivati dalla dieta possono quindi entrare direttamente nel fegato ed essere utilizzati per la sintesi di VLDL-TG, aumentando il carico di acidi grassi sul fegato(23). Usando la tecnica dei traccianti, è stato stimato che durante il digiuno, la maggior parte dei VLDL-TG (77%) deriva dal

tessuto adiposo e circa il 4% dalla DNL (23). Dopo il pasto, invece, la quota di VLDL-TG derivante dagli FFA del tessuto adiposo scende al 44% (anche perché durante il pasto si sopprime la lipolisi periferica), 8% dalla DNL, il 10% dallo spillover dei chilomicroni e il 15% dall'assorbimento di Chylomicron-Remnant TG (23).

Importanza degli acidi grassi saturi e insaturi nella NAFLD

Si è molto dibattuto in letteratura sull'effetto dei diversi acidi grassi (saturi vs. insaturi) sullo sviluppo e la progressione della NAFLD. È stato dimostrato che gli FFA plasmatici derivano per la maggior parte dalla lipolisi del tessuto adiposo e solo in parte dalla lipolisi intravascolare (spillover) delle lipoproteine circolanti (Figura 1). La loro composizione a digiuno riflette, infatti, per lo più la composizione dei TG del tessuto adiposo. Un aumento degli FFA saturi (SFA, in particolare acido palmitico e stearico) è da attribuirsi solo in parte alla dieta, in quanto questi SFA sono prodotti tramite DNL. La DNL produce acido palmitico da cui derivano acido stearico per elongazione e acido palmitoleico per desaturazione. Studi su fegato e tessuto adiposo umani hanno evidenziato che l'attività di elongazione è maggiore nel fegato che nel tessuto adiposo, mentre l'attività di desaturazione è superiore nel tessuto adiposo (24). Per tale motivo, quando la DNL viene stimolata, la produzione epatica di SFA aumenta, diminuendo il rapporto tra grassi insaturi e saturi. Il fegato di soggetti con NAFLD contiene una maggiore quantità di SFA (in particolare palmitato) ed una minore quantità di grassi poli-insaturi a catena lunga (PUFA) (16). Il palmitato non viene usato solo nella sintesi di DAG e TG ma anche per la sintesi di sfingolipidi e ceramidi, che sono due classi lipidiche principalmente coinvolte nello stress ossidativo, nei processi infiammatori e nel danno del tessuto epatico. DAG rappresenta il primo step nella sintesi e idrolisi dei TG, ed il fatto che il fegato dei soggetti con NAFLD avendo un'aumentata DNL, contenga più SFA e DAG e meno PUFA rispetto al fegato dei soggetti senza NAFLD, indica che la NAFLD è strettamente associata ad un alterato metabolismo degli acidi grassi (24).

Ruolo della dieta e della sua composizione in acidi grassi nella NAFLD

Molti studi indicano che modificazioni dello stile di vita migliorano i valori ematici delle transaminasi ed il grado di steatosi epatica (25, 26). In particolare, la perdita di peso ottenuta mediante una dieta ipocalorica (con una riduzione media dell'introito calorico di ~500-800 Cal/die e caratterizzata da ridotto introito di carboidrati, acidi grassi saturi, cibi raffinati, alcol e bevande contenenti fruttosio, un componente alimentare che più chiaramente è risultato associato con NAFLD/NASH negli studi epidemiologici), in combinazione all'esercizio fisico di grado moderato (sia aerobico che di resistenza), è in grado di determinare un miglioramento/regressione della steatosi epatica (27). Nei soggetti con sovrappeso o obesità, è stato chiaramente documentato che una riduzione del peso corporeo di circa il 5% migliora significativamente il grado di steatosi mentre è necessaria una riduzione del peso corporeo di circa il 10% per poter migliorare anche l'attività necro-infiammatoria ed il grado di fibrosi epatica. In presenza di obesità severa (BMI >40 kg/m²) o di grado moderato (BMI ≥35 kg/m² con diabete ed altre comorbidità metaboliche), è utile valutare se inviare il paziente a centri che eseguono chirurgia bariatrica, in quanto la perdita di peso ottenuta mediante questo approccio terapeutico è in grado di indurre un marcato miglioramento e, in molti casi, una regressione del danno epatico nella NAFLD (25, 26, 28, 29). Tuttavia, come sottolineato nelle recenti linee guida europee EASL/EASD/EASO, la dieta induce un significativo miglioramento e/o regressione del danno epatico nella NAFLD (documentato mediante biopsia epatica) solo quando è associata ad una restrizione delle calorie giornaliere in grado di indurre un significativo calo ponderale (25, 26, 29). I dati clinici attualmente disponibili in letteratura riguardo un possibile beneficio di modifiche esclusivamente qualitative della composizione di una dieta isocalorica sulla NAFLD sono scarsi e complessivamente meno convincenti (39, 31). In particolare, non vi sono ampi trial clinici di sufficiente durata che abbiano valutato l'effetto di modifiche qualitative della dieta sull'istologia epatica nella NAFLD. Per quanto

riguarda, specificamente, l'apporto dietetico degli acidi grassi, vi è una ragionevole evidenza derivante da diversi studi sperimentali e clinici che una dieta ricca di acidi grassi saturi (>40-45% delle calorie totali) favorisce l'accumulo di trigliceridi epatici, mentre una dieta più ricca in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e/o poli-insaturi (*n*-6 PUFA) appare essere meno steatogenica (27, 32). Tuttavia, i pochi studi che hanno valutato l'aggiunta di acidi grassi poli-insaturi omega-3 (*n*-3 PUFA) alla dieta hanno dato risultati abbastanza controversi, evidenziando in certi casi solo una lieve riduzione della steatosi ma uno scarso effetto sulle altre caratteristiche istopatologiche della NASH (necro-infiammazione e fibrosi) (31). Comunque, sulla base dei pochi trial clinici disponibili (che nella quasi totalità dei casi sono caratterizzati da una dimensione campionaria ridotta, una breve durata di intervento e dall'assenza della biopsia epatica per la caratterizzazione degli endpoints clinici), vari esperti ritengono che la cosiddetta dieta mediterranea possa rappresentare, ad oggi, il miglior approccio dietetico di tipo qualitativo per la maggior parte dei pazienti con NAFLD e normale peso corporeo (25, 26, 31, 33, 34). Anche recentemente, un trial clinico randomizzato della durata di 18 mesi, che includeva circa 280 soggetti con obesità addominale e dislipidemia, ha evidenziato che una dieta mediterranea isocalorica (ricca in acidi grassi mono-insaturi/poli-insaturi e bassa di carboidrati, <50% delle calorie totali) era in grado di ridurre maggiormente il grado di steatosi epatica (valutata mediante RMN) rispetto ad una dieta isocalorica con pochi acidi grassi (<30% delle calorie totali), a parità del lieve calo ponderale, ottenuto al termine dello studio (35). Tuttavia, bisogna sottolineare che non vi è, almeno per ora, alcuna evidenza derivante da trial clinici randomizzati che la sola manipolazione qualitativa della dieta, ed in particolare della qualità e quantità degli acidi grassi assunti con la dieta (senza una consensuale riduzione dell'apporto calorico complessivo in grado di determinare un significativo calo ponderale) sia in grado di ridurre la progressione epatica della NAFLD, documentata mediante biopsia epatica.

Figure

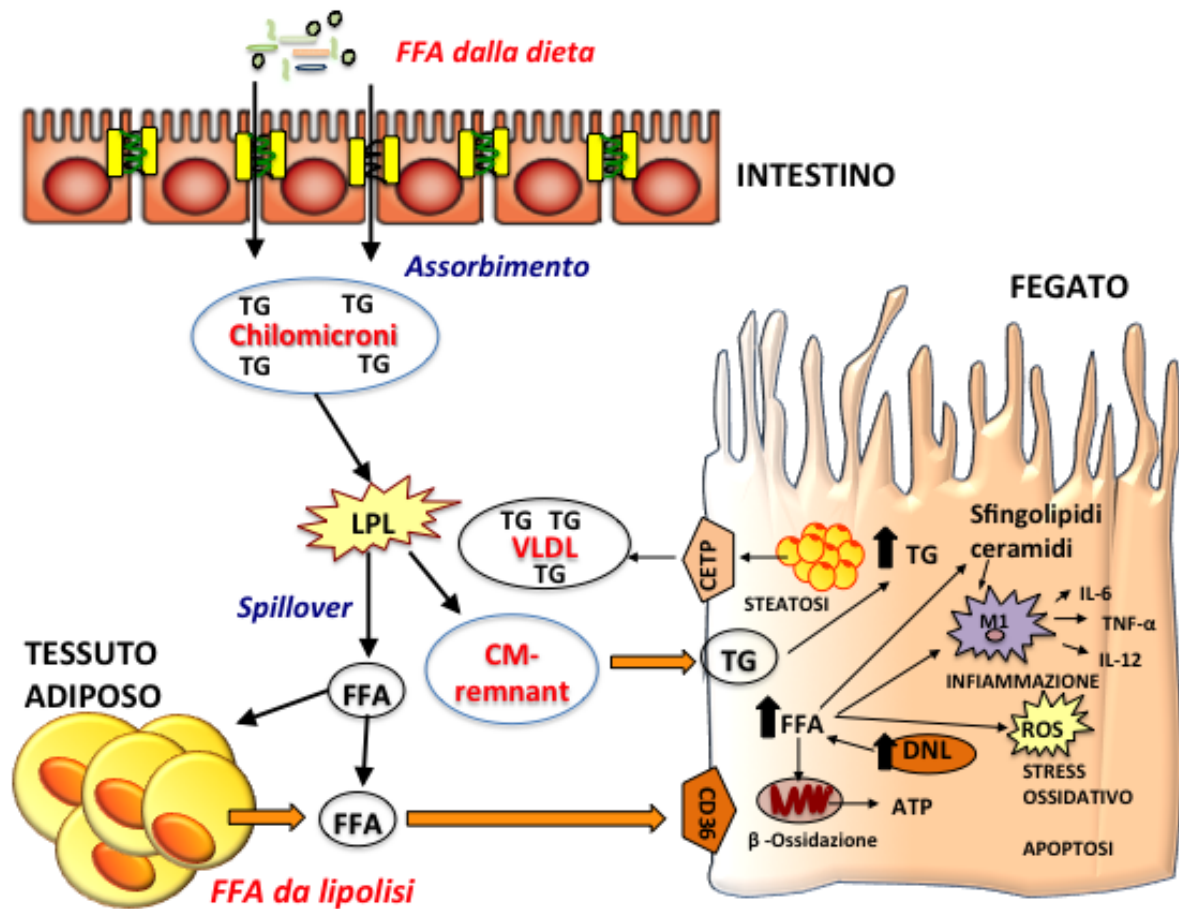


Figura 1. Effetti degli FFAs a livello epatico. Gli acidi grassi liberi (FFA) che vengono metabolizzati dal fegato possono derivare dalla dieta oppure, a digiuno, dall'idrolisi dei trigliceridi del tessuto adiposo. Nel fegato gli FFA possono essere ossidati, o riesterificati a trigliceridi che a loro volta possono essere secreti come VLDL oppure formare gocce lipidiche di grasso ectopico (steatosi). Gli FFA possono anche essere utilizzati per la sintesi di lipidi lipotossici quali ceramidi e sfingolipidi e provocare infiammazione epatica.

Referenze

1. Saponaro C, Gaggini M, Carli F, et al. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* 7: 9453-9474, 2015.
2. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 133: 496-506, 2007.
3. Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, et al. Separate contribution of diabetes, total fat mass, and fat topography to glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3914-3921, 2004.
4. Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18: 139-143, 2011.
5. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 53: 1270-1287, 2010.
6. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 48: 634-642, 2005.
7. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients* 5: 1544-1560, 2013.
8. Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J Lipids* 2011: 783976, 2011.
9. Koenig W, Karakas M, Zierer A, et al. Oxidized LDL and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg Study. *Clin Chem* 57: 1196-1200, 2011.
10. Ramos-Arellano LE, Munoz-Valle JF, De la Cruz-Mosso U, et al. Circulating CD36 and oxLDL levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects. *BMC Cardiovasc Disord* 14:54, 2014.
11. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol* 65: 589-600, 2016.
12. Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 55: 1389-1397, 2012.+
13. Hellerstein MK. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr* 53 Suppl 1: S53-65, 1999.ù
14. Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta* 1801: 299-310, 2010.
15. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, et al. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 146: 726-735, 2014.
16. Kotronen A, Seppanen-Laakso T, Westerbacka J, et al. Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes* 58: 203-208, 2009.
17. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118: 829-838, 2008.
18. Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 199-214, 2010.
19. Magkos F, Su X, Bradley D, et al. Intrahepatic diacylglycerol content is associated with hepatic insulin resistance in obese subjects. *Gastroenterology* 142: 1444-1446 e1442, 2012.

20. Schaffler A, Scholmerich J, Buchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2: 273-280, 2005.
21. Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, et al. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in molecular medicine* 14: 72-81, 2008.
22. Stefan N, Staiger H, Haring HU. Dissociation between fatty liver and insulin resistance: the role of adipose triacylglycerol lipase. *Diabetologia* 54: 7-9, 2011.
23. Jacome-Sosa MM, Parks EJ. Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans. *Curr Opin Lipidol* 25: 213-220, 2014.
24. Kotronen A, Seppanen-Laakso T, Westerbacka J, et al. Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum. *Obesity (Silver Spring)* 18: 937-944, 2010.
25. EASL, Marchesini G, Day CP, Dufour J-F, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 64: 1388-1402, 2016.
26. Lonardo A, Nascimbeni F, Targher G, et al. AISF position paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates and future directions. *Dig Liver Dis* 49: 471-483, 2017.
27. Yki-Jarvinen H. Nutritional Modulation of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Nutrients* 7: 9127-9138, 2015.
28. Targher G, Lonardo A, Byrne CD. Nonalcoholic fatty liver disease and chronic vascular complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 14: 99-114, 2018.
29. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 149: 367-378 e365; quiz e314-365, 2015.
30. Eslamparast T, Tandon P, Raman M. Dietary Composition Independent of Weight Loss in the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* 9, 2017.
31. Della Pepa G, Vetrani C, Lombardi G, et al. Isocaloric Dietary Changes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High Cardiometabolic Risk Individuals. *Nutrients* 9, 2017.
32. Rosqvist F, Iggman D, Kullberg J, et al. Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes* 63: 2356-2368, 2014.
33. Zelber-Sagi S, Salomone F, Mlynarsky L. The Mediterranean dietary pattern as the diet of choice for non-alcoholic fatty liver disease: Evidence and plausible mechanisms. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 37: 936-949, 2017.
34. Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Trenell M: Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol* 67: 829-846, 2017.
35. Gepner Y, Shelef I, Schwarzfuchs D, et al. Effect of Distinct Lifestyle Interventions on Mobilization of Fat Storage Pools: The CENTRAL MRI Randomized Controlled Trial. *Circulation*, 2017.

3. EFFETTI DEGLI ACIDI GRASSI SUL MUSCOLO

CELLULE MUSCOLARI SCHELETRICHE E CARDIACHE IN VITRO

Luigi Laviola

Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi, Sezione di Medicina Interna, Endocrinologia, Andrologia e Malattie Metaboliche, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia.

Messaggi chiave

- Gli acidi grassi rappresentano la principale fonte energetica nel muscolo scheletrico e cardiaco.
- L'incremento degli acidi grassi circolanti, soprattutto di quelli saturi, determina aumentato uptake a livello delle cellule muscolari e cardiache e accumulo intracellulare di trigliceridi e di intermedi lipidici tossici (ceramidi e diacilgliceroli).
- Il danno lipotossico è mediato dall'attivazione di molteplici vie di segnale (NFkB, stress chinasi, PKC, PERK), che determinano aumentato stress ossidativo, attivazione di ER stress e apoptosi cellulare.
- Gli acidi grassi mono- e polinsaturi sono in grado di contrastare gli effetti tossici indotti dagli acidi grassi saturi.

Metabolismo degli acidi grassi nelle cellule muscolari scheletriche e cardiache

Gli acidi grassi rappresentano la principale fonte energetica nel muscolo scheletrico e cardiaco, le cui cellule sono corredate da sofisticati sistemi biologici responsabili dell'uptake e della esterificazione e ossidazione. Le principali fonti di acidi grassi sono rappresentate dagli acidi grassi liberi (FFA, free fatty acid) legati all'albumina, derivanti dalla lipolisi del tessuto adiposo, e dagli acidi grassi rilasciati dai trigliceridi (TG) contenuti nei chilomicroni e nelle VLDL (Very Low-Density Lipoprotein) grazie all'attività della lipoproteina lipasi (LPL) (1, 2).

Il processo di uptake degli acidi grassi non è ancora del tutto compreso. Fino a qualche anno fa si riteneva che, in virtù della loro idrofobicità, la diffusione passiva rappresentasse la modalità principale di ingresso degli acidi grassi nelle cellule. Diversi studi hanno invece dimostrato che l'uptake degli acidi grassi si verifica anche grazie a specifici trasportatori di membrana, motivo per cui la loro captazione viene a dipendere non solo dalla loro concentrazione ematica, ma anche

dall'attività dei trasportatori. I trasportatori degli acidi grassi identificati ad oggi comprendono FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase), FABPpm (Plasma Membrane-bound Fatty Acid Binding Protein) e la famiglia dei trasportatori FATP 1-6 (Fatty Acid Transport Protein) (3-5). Si ritiene che FAT/CD36 sia il principale trasportatore degli acidi grassi e che i suddetti trasportatori possano agire insieme oppure in maniera indipendente in modo da incrementare la concentrazione degli acidi grassi sulla superficie cellulare e quindi il loro uptake (6). È stato altresì dimostrato che l'espressione dei trasportatori degli acidi grassi si modifica in risposta a specifici stimoli: la contrazione muscolare, l'insulina, l'attivazione di AMPK (AMP-activated protein kinase) e alcune condizioni patologiche croniche quali l'obesità e il diabete mellito di tipo 2 portano alla maggiore traslocazione di FAT/CD36 dalle vescicole citoplasmatiche alla membrana cellulare (7-9). Ne consegue l'aumento dell'uptake degli acidi grassi, una competizione dei substrati lipidici con il glucosio e l'insorgenza di insulino-resistenza indotta dai lipidi. Una volta entrati nel citosol gli acidi grassi vengono esterificati ad opera dell'enzima FACS (Fatty Acyl CoA Synthase) e indirizzati alla β -ossidazione mitocondriale oppure alla conversione in triacilgliceroli (TAG).

Effetto degli FFA sul metabolismo muscolare – la lipotossicità

In condizioni fisiologiche il tessuto adiposo gioca un ruolo cardine nella regolazione dei livelli di FFA circolanti attraverso l'inibizione del loro rilascio nel torrente circolatorio e l'incremento della clearance dei TAG, in modo da evitare che i tessuti periferici vengano esposti a elevati livelli di lipidi (10). L'obesità viscerale, è caratterizzata soprattutto dalla disfunzione biologica del tessuto adiposo, che si manifesta con riduzione della sensibilità insulinica, ipossia, rilascio di citochine proinfiammatorie ed FFA che andranno ad agire sugli organi e sui tessuti periferici causando alterazioni metaboliche (11). In particolare, l'incremento degli FFA circolanti determina la deposizione di grasso ectopico a livello vascolare, pancreatico, epatico e muscolare (12) e, sebbene questi organi possano inizialmente immagazzinare parte del surplus di lipidi sotto forma

di TAG, i lipidi in eccesso vengono poi indirizzati verso vie metaboliche non ossidative che terminano con l'accumulo di intermedi lipidici tossici, quali ceramidi e diacilgliceroli (DAG, Diacylglycerol) (10) (Figura 1A). Inoltre, è stato anche dimostrato che l'incremento dell'uptake degli FFA porta all'intensificazione della β -ossidazione mitocondriale, alla produzione dei ROS (Reactive Oxygen Species) e al danno cellulare (10). Tutti questi eventi biologici sfociano nell'alterazione delle vie di segnale e delle funzioni biologiche cellulari, condizione nota come lipotossicità (13) (Figura 1A).

Non solo la quantità, ma anche la qualità dei lipidi è importante ai fini dei loro effetti sugli organi e tessuti periferici (14), in quanto diversi tipi di FFA, in termini di grado di saturazione e lunghezza della catena di atomi di carbonio, possono indurre diverse risposte metaboliche. Gli acidi grassi più abbondanti nella circolazione sistemica e nei tessuti sono gli acidi grassi a catena lunga (14-18 atomi di carbonio) e molto lunga (20-26 atomi di carbonio) con diversi gradi di saturazione (15) e, più specificatamente, l'acido palmitico (16:0), l'acido oleico (18:1, n-9) e l'acido linoleico (18:2, n-6). In generale, studi condotti *in vitro* hanno evidenziato che gli FFA saturi (SFA) inducono insulino-resistenza, influenzano l'accumulo di tessuto adiposo e sono associati a disfunzioni metaboliche, a differenza degli FFA mono- e polinsaturi, i quali sono anche in grado di contrastare gli effetti tossici indotti dai saturi (10).

Meccanismi molecolari delle alterazioni metaboliche indotte dalla lipotossicità nelle cellule muscolari e cardiache

Le principali alterazioni metaboliche indotte dalla lipotossicità nelle cellule del muscolo scheletrico e cardiaco sono l'insulino-resistenza e l'alterazione della formazione dei depositi di glucosio indotta dall'insulina (10), per le quali sono stati suggeriti molteplici meccanismi molecolari (Figura 1A). Uno dei primi meccanismi ad essere stati descritti consiste nell'accumulo intracellulare di intermedi lipidici tossici, quali DAG e ceramidi.

Uno studio condotto nei cardiomioblasti di ratto H9C2 ha dimostrato che l'esposizione al

palmitato 0,3 mmol/L per 8 h determina l'accumulo di DAG e che tale accumulo causa l'insorgenza dello stress del reticolo endoplasmatico, responsabile a sua volta della degradazione della perilipina 2 (Plin2), una proteina chiave nella formazione delle gocce lipidiche e quindi nell'immagazzinamento degli FFA in TAG (16). L'accumulo di DAG innesca anche l'attivazione di alcuni membri della famiglia delle PKC (protein kinase C), tra cui PKC θ in grado di catalizzare la fosforilazione in Ser307 di IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1), riducendone l'attivazione da parte dell'insulina (17).

Oltre all'accumulo di DAG, il trattamento col palmitato induce anche la biosintesi della ceramide nelle cellule del muscolo scheletrico e cardiaco. Diverse evidenze sperimentali dimostrano che in questi sistemi cellulari la ceramide è in grado di alterare il signaling insulinico attraverso due distinti meccanismi che coinvolgono la defosforilazione di Akt in corrispondenza del residuo Thr308 e l'inibizione della sua traslocazione sulla membrana plasmatica (18), effetti che dipendono dall'attività della PP2A (Protein Phosphatase 2A) e della PKC ζ , rispettivamente (19). Inoltre, la ceramide è anche un potente induttore della cascata apoptotica nelle cellule del muscolo scheletrico e cardiaco (20, 21). In particolare, è stato recentemente dimostrato che l'esposizione delle cellule progenitrici cardiache umane al palmitato 0,25 mmol/L per 16 h determina un incremento dei livelli di espressione della ceramide sintasi 5 (CerS5, ceramide synthase 5), un'enzima chiave coinvolto nella sintesi *de novo* della ceramide nelle cellule cardiache, nonché un accumulo di ceramide responsabile a sua volta dell'innescare dell'apoptosi attraverso il coinvolgimento della stress chinasi JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (22). Inoltre, sia il DAG che la ceramide attivano dei pathways infiammatori mediante IKK- β (IkB Kinase β) ed NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), con la conseguente produzione di citochine proinfiammatorie, tra cui l'IL-6 (23). Gli SFA sono anche in grado di attivare dei pathways infiammatori sia direttamente, attraverso l'interazione con i membri della famiglia dei TLR (Toll-Like Receptor), sia indirettamente,

attraverso la secrezione di citochine, quali TNF- α , IL-1 β e IL-6 (24). Inoltre, dati recenti dimostrano che nei cardiomioblasti H9C2 gli SFA inducono infiammazione anche andando a legare direttamente una delle proteine richieste per l'attivazione del TLR4, ovvero la proteina accessoria MD2 (Myeloid Differentiation 2) (25).

Per quanto concerne la capacità degli SFA di indurre la secrezione di citochine, l'esposizione dei mioblasti C2C12 differenziati al palmitato 0,5 mmol/L per 12 h determina l'incremento significativo dell'espressione genica della miochina musclin, attraverso l'attivazione del pathway di PERK (Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase), una Ser/Thr chinasi transmembrana coinvolta nella risposta cellulare allo stress del reticolo endoplasmatico (26).

Anche le citochine proinfiammatorie prodotte in risposta all'esposizione a elevate concentrazioni di SFA contribuiscono allo sviluppo dell'insulino-resistenza. In particolare, è stato di recente evidenziato che il trattamento dei mioblasti C2C12 al palmitato 0,75 mmol/L per 16 h risulta in un incremento della produzione di TNF- α , responsabile a sua volta dell'instaurarsi di una condizione di insulino-resistenza come si evince dalla riduzione della capacità dell'insulina sia di fosforilare IRS-1, nel residuo Tyr632, e Akt, nel residuo Ser473, sia di stimolare l'uptake di glucosio (27).

Un'altra conseguenza dell'esposizione delle cellule muscolari a elevati livelli di SFA è rappresentata dall'incremento dei ROS. È stato recentemente dimostrato che nelle cellule muscolari scheletriche di ratto il palmitato induce la produzione dell'anione superossido attraverso l'attivazione della NADH ossidasi e il coinvolgimento del complesso III della catena respiratoria mitocondriale (28).

Anche nei cardiomiociti neonatali di ratto il palmitato è responsabile dell'alterazione della catena di trasporto degli elettroni, attraverso la riduzione dei livelli di cardiolipina, con produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno (29). Una delle conseguenze dello stress ossidativo è data dalla disfunzione e dalla ridotta biogenesi e densità mitocondriale; queste alterazioni, a loro volta, sono responsabili dell'accumulo degli intermedi lipidici tossici, nonché dell'attivazione di molteplici

chinasi, quali NF- κ B, p38 MAPK, JNK e alcune isoforme di PKC (30), che alterano il pathway dell'insulina, inducendo la fosforilazione in Ser/Thr di IRS-1, e quindi l'uptake di glucosio e il suo metabolismo in risposta all'ormone insulinico (31, 32).

Effetti degli acidi grassi mono- e polinsaturi sulle cellule muscolari scheletriche e cardiache

Molteplici studi *in vitro* hanno dimostrato che il pretrattamento o la co-incubazione con acidi grassi insaturi (MUFA, MonoUnsaturated Fatty Acid; PUFA, PolyUnsaturated Fatty Acid) sono in grado di proteggere dalla lipotossicità indotta dagli SFA (Figura 1B). Nelle cellule muscolari i MUFA e i PUFA sono in grado di ridurre la biodisponibilità degli SFA per la sintesi dei metaboliti tossici attraverso l'induzione della sintesi dei TAG (33), l'intensificazione della β -ossidazione mitocondriale (34), l'incremento dell'espressione di proteine coinvolte nei pathways legati all'ossidazione degli acidi grassi (35) e l'aumento del grado di insaturazione dei fosfolipidi di membrana (10). La riduzione dei livelli di DAG e ceramide ha delle ricadute positive non solo sulla vitalità cellulare (22), ma anche sul metabolismo e quindi sull'insulino-resistenza indotta dagli SFA. L'oleato protegge le cellule del muscolo scheletrico L6 dall'insulino-resistenza indotta dal palmitato e questo effetto è legato all'abilità dell'oleato di preservare l'attivazione di PI3-K da parte dell'insulina nelle cellule trattate con il palmitato (36). L'oleato è in grado di ripristinare il signaling insulinico alterato dal palmitato anche attraverso il recupero della fosforilazione di Akt e la riduzione dei livelli di attivazione di p38 MAPK e PKC θ , come evidenziato nei miotubi C2C12 (37). Il pretrattamento con l'oleato previene l'inibizione da parte del palmitato della fosforilazione di Akt in risposta all'insulina anche nei cardiomiociti neonatali di topo (38) e uno dei meccanismi individuati risiede nell'abilità dell'oleato di ridurre l'attivazione di JNK, implicata nell'induzione dell'insulino-resistenza in diversi tessuti (39). Tuttavia, è stato altresì dimostrato che elevate concentrazioni di oleato nei miotubi C2C12 possono alterare il signaling dell'insulina, nonostante i bassi livelli citoplasmatici di DAG e ceramidi e l'incrementata incorporazione del palmitato in TAG,

a causa della β -ossidazione mitocondriale non completa (37).

Anche i PUFA, tra cui l'EPA (eicosapentaenoic acid, C20:5 n-3) e il DHA (docosahexaenoic acid, C22:6 n-3), sono in grado nei mioblasti C2C12 di ripristinare il pathway dell'insulina e l'uptake di glucosio alterati dal palmitato attraverso la riduzione della formazione di DAG e ceramidi e della fosforilazione della PKC θ e l'incremento della β -ossidazione mitocondriale (21). Nei miotubi C2C12 l'acido linoleico, α -linolenico (C18:2 n-3) e γ -linolenico (C18:3 n-6) non solo inibiscono l'insulino-resistenza, ma anche l'infiammazione indotta dal palmitato, come evidenziato dall'incremento sia della fosforilazione di Akt che dell'espressione sulla membrana plasmatica di GLUT4 (Glucose Transporter 4) e dalla riduzione dell'espressione genica dell'IL-6 e del TNF- α , rispettivamente (40).

Conclusioni

L'incremento dell'uptake degli SFA e il conseguente accumulo di DAG e ceramidi causa effetti deleteri sulla vitalità e sul metabolismo delle cellule del muscolo scheletrico e cardiaco. I MUFA e i PUFA, al contrario degli SFA, non inducono danno cellulare e sono anche in grado di proteggere dalla lipotossicità indotta dagli SFA attraverso molteplici meccanismi. Ciò rappresenta un aspetto rilevante ai fini della definizione di nuovi target e approcci terapeutici mirati al miglioramento dell'infiammazione e dell'insulino-resistenza nelle cellule muscolari dei pazienti obesi e/o con diabete mellito di tipo 2.

Figure

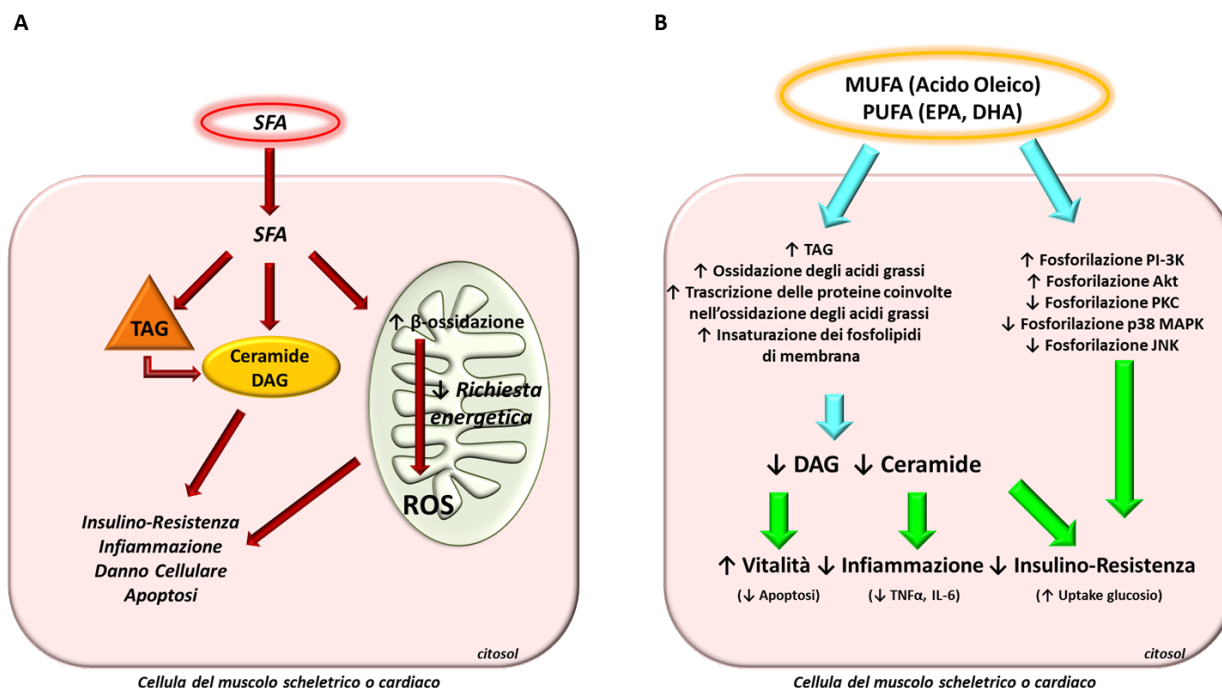


Figura 1. Meccanismi molecolari alla base delle alterazioni metaboliche indotte dalla lipotossicità ed effetti protettivi degli acidi grassi mono- e polinsaturi nelle cellule muscolari e cardiache. (A) L'incremento dei livelli di SFA (Saturated Fatty Acid) nel torrente circolatorio determina un maggiore uptake da parte delle cellule del muscolo scheletrico e cardiaco. Gli SFA vengono immagazzinati sotto forma di TAG (Triacilglycerol) oppure vanno incontro alla β -ossidazione mitocondriale; tuttavia, in caso di eccesso di SFA si può verificare la loro conversione in metaboliti tossici quali DAG (Diacylglycerol) e ceramidi e l'intensificazione della β -ossidazione mitocondriale, la quale, quando non associata a un incremento della richiesta energetica, porta ad una ossidazione non completa e all'aumento dei ROS (Reactive Oxygen Species). Questi eventi sfociano nell'insorgenza di stress ossidativo, insulino-resistenza, infiammazione e apoptosi. (B) I MUFA (Monounsaturated Fatty Acid) e i PUFA (Polyunsaturated Fatty Acid) sono in grado di proteggere dalla lipotossicità indotta dagli SFA (Saturated Fatty Acid) riducendo l'accumulo intracellulare di DAG (Diacylglycerol) e ceramide attraverso l'aumento della sintesi dei TAG (Triacylglycerol), della β -ossidazione mitocondriale, dell'espressione di proteine coinvolte nei pathways legati all'ossidazione degli acidi grassi e del grado di insaturazione dei fosfolipidi di membrana. La riduzione dei livelli di DAG e ceramide ha delle ricadute positive sulla vitalità cellulare (riduzione dell'apoptosi), sull'infiammazione (riduzione della secrezione di citochine proinfiammatorie) e sull'insulino-resistenza. I MUFA e i PUFA sono in grado di ripristinare il signaling insulinico anche attraverso il recupero della fosforilazione di Akt e PI-3K e la downregolazione della fosforilazione di p38 MAPK, JNK e PKC.

Referenze

1. van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease, *Cardiovasc Res* 45: 279–293, 2000.
2. Rasmussen BB, Wolfe RR. Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Ann Rev Nutrition* 19: 463–484, 1999.
3. Koonen DP, Glatz JF, Bonen A, et al. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1736: 163–180, 2005.
4. Harmon CM, Abumrad NA. Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J. Membr Biol* 133: 43–49, 1993.
5. Nickerson JG, Momken I, Benton CR, et al. Protein-mediated fatty acid uptake: regulation by contraction, AMP-activated protein kinase, and endocrine signals. *Applied Physiol. Nutrition Metab. Physiol Appl Nutrition Metab* 32: 865–873, 2007.
6. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 90: 367–417, 2010.
7. Luiken JJ, Coort SL, Koonen DP, et al. Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflugers Arch* 448: 1–15, 2004.
8. Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, et al. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem* 275: 14501–14508, 2000.
9. Bonen A, Parolin ML, Steinberg GR, et al. Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J* 18: 1144–1146, 2004.
10. Tumova J, Andel M, Trnka J. Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. *Physiol Res* 65: 193–207, 2016.
11. De Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 54: 945–955, 2008.
12. Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta* 1801: 311–9, 2010.
13. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 14: 281–287, 2003.
14. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 23: 447–456, 2004.
15. Turner N, Cooney GJ, Kraegen EW, et al. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J Endocrinol* 220: T61–T79, 2014.
16. Akoumi A, Haffar T, Moustherji M, et al. Palmitate mediated diacylglycerol accumulation causes endoplasmic reticulum stress, Plin2 degradation, and cell death in H9C2 cardiomyoblasts. *Exp Cell Res* 354:85–94, 2017.
17. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270–1274, 1999.
18. Summers SA. Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws. *Curr Opin Lipidol* 21: 128–135, 2010.
19. Lipina C, Hundal HS. Sphingolipids: agents provocateurs in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia* 54: 1596–1607, 2011.
20. Turpin SM, Lancaster GI, Darby I, et al. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E1341–E1350, 2006.

21. Pinel A, Rigaudière JP, Laillet B, et al. N-3PUFA differentially modulate palmitate-induced lipotoxicity through alterations of its metabolism in C2C12 muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1861: 12-20, 2016.
22. Leonardini A, D'Oria R, Incalza MA, et al. GLP-1 Receptor Activation Inhibits Palmitate-Induced Apoptosis via Ceramide in Human Cardiac Progenitor Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 102: 4136-4147, 2017.
23. Coll T, Eyre E, Rodríguez-Calvo R, et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 283: 11107-11116, 2008.
24. Wen H, Gris D, Lei Y, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 12: 408-415, 2011.
25. Wang Y, Qian Y, Fang Q, et al. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. *Nat Commun* 8: 13997, 2017.
26. Gu N, Guo Q, Mao K, et al. Palmitate increases musclin gene expression through activation of PERK signaling pathway in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* 467: 521-6, 2015.
27. Haghani K, Pashaei S, Vakili S, et al. TNF- α knockdown alleviates palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 460: 977-82, 2015.
28. Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira Ldos R. et al. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol* 216: 796-804, 2008.
29. Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, et al. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome C release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 276: 38,061–38,067, 2001.
30. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health* 11:30, 2012.
31. Krebs M, Roden M. Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. *Diabetes Obes Metab* 7: 621-632, 2005.
32. Talukdar I, Szeszel-Fedorowicz W, Salati LM. Arachidonic acid inhibits the insulin induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase via p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 280: 40660-40667, 2005.
33. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3077-3082, 2003.
34. Henique C, Mansouri A, Fumey G, et al. Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem* 285: 36818-36827, 2010.
35. Lam YY, Hatzinikolas G, Weir JM, et al. Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: the effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1811: 468-475, 2001.
36. Gao D, Griffiths HR, Bailey CJ. Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6 myotubes. *Br J Nutr* 102: 1557-63, 2009.
37. Capel F, Cheraiti N, Acquaviva C, et al. Oleate dose-dependently regulates palmitate metabolism and insulin signaling in C2C12 myotubes. *Biochim Biophys Acta* 2000-2010, 2016.

38. Perdomo L, Beneit N, Otero YF. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. *Cardiovasc Diabetol* 14:75, 2015.
39. Gorgani-Firuzjaee S, Ahmadi S, Meshkani R. Palmitate induces SHIP2 expression via the ceramide-mediated activation of NF- κ B, and JNK in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 450: 494–9, 2014.
40. Chen PY, Wang J, Lin YC, et al. 18-carbon polyunsaturated fatty acids ameliorate palmitate-induced inflammation and insulin resistance in mouse C2C12 myotubes. *J Nutr Biochem* 26: 521-31, 2015.

INSULINO RESISTENZA IN VIVO

Gianluca Perseghin

Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano Bicocca & Medicina Metabolica, Dipartimento di Medicina Interna e Riabilitazione, Policlinico di Monza, Monza, Italia.

Messaggi chiave

- Ipotesi di Randle: gli acidi grassi competono con il glucosio quali substrati ossidativi necessari per generare energia a livello del muscolo scheletrico
- L'eccesso di disponibilità di acidi grassi inibisce marcatamente anche la capacità dell'insulina di stimolare la velocità di glicogeno sintesi muscolare
- L'effetto inibitorio degli acidi grassi sull'utilizzo ossidativo e non ossidativo del glucosio insulino stimolato a livello muscolare può essere contrastato inducendo la riduzione degli acidi grassi circolanti
- L'effetto deleterio degli acidi grassi a livello del muscolo può essere mediato dall'alterazione della trasmissione del segnale insulinico a livello post-recettoriale
- L'effetto deleterio degli acidi grassi a livello del muscolo può essere mediato da disfunzione mitocondriale.

Ipotesi patogenetica

L'insulino resistenza è definita come un'alterata efficienza con cui l'insulina controlla il metabolismo del glucosio a livello degli organi periferici (1). L'insulino resistenza gioca quindi un ruolo chiave nella patogenesi del diabete di tipo 2, ne costituisce una caratteristica fenotipica comune, può essere determinata decenni prima dell'insorgenza dell'iperglicemia franca ed è il marker di predizione di insorgenza della malattia in soggetti con familiari affetti da diabete (2). Esiste una visione lipocentrica dell'insulino resistenza, secondo la quale, l'alterata azione insulinica è la conseguenza di cronicamente aumentati livelli plasmatici di acidi grassi (3, 4) e a questo concetto ci si riferisce come lipotossicità.

Infatti, aumentate concentrazioni plasmatiche di acidi grassi liberi sono comuni in condizioni di insulino resistenza come l'obesità e il diabete (5), ma anche prima che alterazioni eclatanti dell'omeostasi glucidica siano evidenti come in soggetti a rischio più elevato di sviluppare il diabete nel futuro (6). Anche l'accumulo intra-miocellulare di acidi grassi sotto forma di trigliceridi,

misurato mediante risonanza magnetica in spettroscopia dell' ^1H , si associa al grado di insulino resistenza sistemica (7).

È possibile quindi che un'alterazione precoce del metabolismo degli acidi grassi possa determinare o contribuire alla patogenesi dell'insulino resistenza. A sostegno di questa ipotesi è stato dimostrato che gli effetti deleteri indotti dall'eccesso di disponibilità degli acidi grassi sul metabolismo insulino-mediato di glucosio in soggetti giovani sani (8), sono sovrapponibili alle alterazioni del metabolismo muscolare del glucosio riscontrabili nei pazienti con diabete franco (9) o prediabete (10).

La condizione di bilancio energetico positivo dovuta all'eccesso calorico alimentare, in associazione a fattori ambientali, metabolici e genetici, è probabilmente la causa scatenante dell'accumulo di grassi nei tessuti cui può seguire l'insorgenza d'insulino resistenza nell'organismo in toto. L'ipotesi di base è quindi che alterazioni del metabolismo degli acidi grassi, dovute a (1) aumentato apporto di calorie o grassi nella dieta non gestibile metabolicamente dai vari organi, (2) ridotto controllo della lipolisi e della triglicerido-sintesi a livello del tessuto adiposo con conseguente aumento di flusso di acidi grassi ai tessuti periferici, (3) primitiva ridotta efficienza delle vie ossidative a livello mitocondriale degli acidi grassi negli organi periferici, possano essere responsabili della lipotossicità che in particolare a livello muscolare si manifesta con l'insulino resistenza.

L'ipotesi di Randle e l'utilizzo ossidativo dei substrati

Circa mezzo secolo fa Randle et al. (11, 12) hanno dimostrato prima in vitro poi in vivo in modelli animali che gli acidi grassi competono con il glucosio quali substrati ossidativi necessari per generare energia a livello del muscolo scheletrico. Il meccanismo biochimico è stato ben descritto e prevede che l'ossidazione degli acidi grassi causi un accumulo intra-mitocondriale del rapporto acetil-CoA/CoA e del rapporto NADH/NAD con conseguente inibizione della piruvato deidrogenasi che a sua volta determina incremento della concentrazione del citrato responsabile dell'inibizione

della fosfo-frutto-chinasi con accumulo intracellulare di glucosio-6-fosfato. L'incremento intracellulare di questo substrato chiave nella regolazione del metabolismo del glucosio provoca l'inibizione della esochinasi II che a catena innesca una riduzione della capacità di incorporare il glucosio a livello della cellula muscolare scheletrica (11, 12). Studi successivi a questi famosi esperimenti di Randle hanno poi confermato questa ipotesi anche in vivo nell'uomo, nell'organismo in toto (13-15) e nel muscolo scheletrico utilizzando la tecnica del clamp insulinico combinata ad esperimenti eseguiti localmente a livello dei muscoli dell'avambraccio (16). Questo effetto in vivo nell'uomo a livello del muscolo scheletrico richiede qualche ora (circa 3) prima di manifestarsi pienamente in queste condizioni sperimentali (17, 18) e questo è uno dei motivi per cui alcuni autori che hanno eseguito studi di più breve durata non riuscirono in passato a confermare questo effetto in vivo degli acidi grassi (19-21).

Oltre l'ipotesi di Randle; un effetto che non si limita all'utilizzo ossidativo dei substrati

Studi successivi, eseguiti in vivo e di tipo quantitativo, hanno dimostrato che la riduzione dell'utilizzo ossidativo del glucosio determinata dall'aumentata disponibilità di acidi grassi sperimentalmente indotta poteva spiegare la riduzione di solo 1/3 del ridotto metabolismo muscolare del glucosio (17, 18). L'aumentata disponibilità di acidi grassi doveva quindi alterare anche l'utilizzo non ossidativo del glucosio (9, 22). Infatti Roden et al (8) misurando direttamente la sintesi di glicogeno muscolare utilizzando metodiche di risonanza magnetica nucleare in spettroscopia del ^{13}C durante clamp insulinico in individui sani in condizioni di eccesso di disponibilità di acidi grassi, ha dimostrato una marcata riduzione della capacità dell'insulina di stimolare la velocità di glicogeno sintesi, supportando l'ipotesi di un effetto degli acidi grassi in eccesso che non si limita all'utilizzo ossidativo del glucosio ma anche a quello non ossidativo. I meccanismi per mezzo dei quali questo effetto interessi anche la glicogeno sintesi muscolare è tuttora ragione di un dibattito acceso tra i ricercatori. Nello studio di Roden et al oltre alla

misurazione in vivo e real-time della glicogeno sintesi venne eseguita anche la determinazione del glucosio-6-fosfato intramuscolare alternando alla spettroscopia del carbonio-13, quella del fosforo-31. Il riscontro di livelli intramuscolari ridotti di questo substrato non supportavano l'ipotesi di un deficit dipendente dagli acidi grassi a livello distale, e specificatamente di azione a livello della glicogeno sintetasi (cui dovrebbe corrispondere un aumento del glucosio-6-fosfato intramuscolare). Venne allora ipotizzato che il difetto indotto si manifestasse a livello di uptake intracellulare del glucosio (a livello di Glut-4 ad esempio) o di fosforilazione del glucosio.

La riduzione della disponibilità di acidi grassi determina un miglioramento dell'insulina sensibilità muscolare

Eseguendo un esperimento inverso a quelli descritti finora, esiste la possibilità di ottenere la riduzione della disponibilità di acidi grassi circolanti inibendo in vivo nell'uomo la velocità di lipolisi a livello del tessuto adiposo utilizzando un approccio farmacologico con Acipimox. In soggetti non diabetici, ma con elevato rischio di sviluppare la malattia sulla base di un background familiare (entrambe i genitori affetti da diabete di tipo 2) questo approccio farmacologico, in parallelo alla riduzione degli acidi grassi liberi circolanti, ha indotto un significativo miglioramento del grado di insulina resistenza a livello muscolare di questi individui (23). Questi studi hanno inoltre permesso di dimostrare che l'effetto metabolico benefico indotto dalla riduzione degli acidi grassi non si accompagnava a significative alterazioni dei livelli circolanti dei più comuni modulatori dell'infiammazione sistemica suggerendo che il meccanismo non potesse dipendere dall'infiammazione stessa ma da altri fattori.

Gli acidi grassi in eccesso possono determinare alterazione del segnale insulinico nel muscolo scheletrico

Rimane aperta la domanda relativa a come gli acidi grassi possano indurre queste alterazioni metaboliche nel muscolo scheletrico capaci di ridurre la capacità di metabolizzare appropriatamente il glucosio.

L'inibizione del trasporto del glucosio indotto dagli acidi grassi a livello muscolare potrebbe essere mediata da un effetto diretto sullo specifico trasportatore muscolare (Glut-4) mediante ad esempio un'interferenza nel traffico, produzione e nella fusione a livello di membrana delle vescicole che trasportano a livello intracellulare il Glut-4. Non deve essere però trascurata l'ipotesi che l'effetto sia mediato più a monte, a livello di trasmissione del segnale insulinico. Infatti, ottenendo biopsie muscolari durante studi di incremento della concentrazione degli acidi grassi circolanti come quelli descritti precedentemente, è stato possibile documentare che l'attività dell'insulin receptor substrate-1 (IRS-1) e della PI-3 chinasi ad esso associata potevano venire aboliti (24). Inoltre, la mancata attività di queste proteine coinvolte nella trasmissione del segnale insulinico intracellulare si associava all'attivazione della proteina-chinasi C-theta, nota per essere attivata dal diacil-glicerolo (25).

L'ipotesi che si potrebbe delineare per spiegare come gli acidi grassi determinino a livello muscolare l'insulino resistenza è quindi quella secondo la quale l'incremento di diacilglicerolo e degli acidi grassi CoA a livello muscolare induca l'attivazione di una cascata di fosforilazioni/defosforilazioni sull'IRS-1 che, incapace a questo punto di attivare PI-3 chinasi, indurrebbe la mancata attivazione del trasporto del glucosio e di tutti gli eventi a valle implicati nella regolazione del metabolismo ossidativo e non ossidativo del glucosio (26).

Gli acidi grassi possono determinare disfunzione mitocondriale

Alternativamente, è ben noto che è possibile dimostrare una alterata funzione mitocondriale nel muscolo scheletrico di diversi modelli in vivo nell'uomo di insulino resistenza (27-29). Soggetti non diabetici ma a rischio di diventarlo nel futuro per il background genetico ipotizzato sulla base della loro storia familiare di diabete sono caratterizzati da alterazioni del metabolismo energetico nell'organismo in toto (30) che possono dipendere da uno specifico difetto metabolico muscolare. Infatti, quando indagati con l'utilizzo della risonanza magnetica in spettroscopia del ^{31}P è stato

osservato che oltre all'anomalo accumulo di trigliceridi intramuscolari questi soggetti hanno anche un deficit mitocondriale di fosforilazione ossidativa e una ridotta velocità di sintesi di ATP insulino stimolata (27). Questa disfunzione mitocondriale a livello del muscolo scheletrico era stata proposta come una possibile causa di alterato utilizzo ossidativo degli acidi grassi nei pazienti con diabete di tipo 2 (29), ma anche è stata osservata indipendentemente dal diabete anche in associazione all'insulino resistenza tipica degli individui anziani (31).

In una visione opposta, la disfunzione mitocondriale potrebbe essere secondaria all'eccessivo flusso di acidi grassi dalla periferia, infatti in soggetti sani normali un aumento anche fisiologico degli acidi grassi circolanti sostenuto nel tempo per almeno tre giorni induce una riduzione della sintesi di ATP mitocondriale nel muscolo scheletrico (32). Indipendentemente dal fatto che il deficit mitocondriale possa essere secondario all'eccessiva disponibilità di substrato o al contrario che il deficit mitocondriale possa essere concausa dell'accumulo intramuscolare di lipidi, entrambi i meccanismi possono essere alla base di un ciclo sfavorevole che si auto-mantiene nel tempo che a seguito del danno mitocondriale porta ad una eccessiva produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (33). In questo senso un ruolo importante viene attribuito al PPAR-alpha coattivatore 1 (un regolatore trascrizionale di geni coinvolti nella regolazione della biogenesi mitocondriale e dell'utilizzo ossidativo degli acidi grassi). Sono stati infatti riconosciuti, nell'ipotesi di deficit primario mitocondriale, dei comuni polimorfismi di PPAR-alpha coattivatore 1 sia in una popolazione danese (34) che negli Indiani Pima (35). Inoltre, nell'ipotesi di un deficit secondario ad esempio al diabete, è stato osservato che nel muscolo scheletrico dei pazienti con diabete di tipo 2 esiste una riduzione dell'espressione di geni coinvolti nella regolazione del PPAR-alpha coattivatore 1 (36, 37).

Da ultimo nello sforzo di documentare un esperimento opposto a quelli tradizionali, quando Acipimox è stato utilizzato per inibire la disponibilità sistemica di acidi grassi, questo intervento ha

restaurato la sintesi mitocondriale di ATP del 50% con una stretta correlazione con la riduzione degli acidi grassi circolanti da un lato e con il miglioramento dell'insulino sensibilità dell'organismo in toto, dall'altro (38).

Conclusioni

L'aumentata disponibilità in circolo di acidi grassi è responsabile in vivo nell'uomo di ridotta sensibilità insulinica muscolare che si traduce in una ridotta capacità ossidativa e non ossidativa (glicogeno sintesi) in condizioni di stimolo insulinico. Questo effetto deleterio degli acidi grassi si manifesta e diventa pienamente quantificabile nell'arco di circa 3 ore e ha le stesse caratteristiche del difetto metabolico muscolare che affligge i pazienti con diabete pienamente manifesto. I meccanismi per mezzo dei quali gli acidi grassi innescano insulino resistenza a livello del muscolo scheletrico sono diversi e tutti sperimentalmente documentati con esperimenti in vivo nei modelli animali e nell'uomo. Un'alterazione della trasmissione del segnale insulinico a livello recettoriale e post recettoriale costituisce l'ipotesi probabilmente più robusta anche se non si può escludere un contributo dell'attivazione delle vie metaboliche intracellulari pro-infiammatorie, e più recentemente sono cresciute le evidenze sperimentali a supporto di un danno funzionale e possibilmente morfologico a livello dei mitocondri intramuscolari con conseguente alterazione del metabolismo energetico muscolare ed eccessiva produzione di ROS in questa sede. L'esatta identificazione dei meccanismi capaci di determinare l'insulino resistenza indotta dagli acidi grassi costituisce a tutt'oggi un focus della ricerca particolarmente interessante perché aprirebbe alla prospettiva di poter interferire anche farmacologicamente sia in prevenzione primaria che secondaria del diabete di tipo 2.

Referenze

1. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, et al. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 104: 787-794, 1999.
2. De Fronzo RA. The triumvirate beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37: 667-687, 1988.
3. McGarry JD. What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science* 258: 766-770, 1992.
4. McGarry JD. Dysregulation of fatty acids metabolism in the etiology of type 2 diabetes. Banting Lecture 2001. *Diabetes* 51: 7-18, 2002.
5. Reaven GM. The fourth musketeer – from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia* 38: 3-13, 1995.
6. Perseghin G, Ghosh S, Gerow K, et al. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents. A cross-sectional study. *Diabetes* 46: 1001-1009, 1997.
7. Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, et al. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C NMR spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48: 1600-1606, 1999.
8. Roden M, Price TB, Perseghin G, et al. Mechanism of free fatty acid induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97: 2859-286, 1996.
9. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, et al. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med* 322: 223-228, 1990.
10. Perseghin G, Price TB, Petersen KF, et al. Increased glucose transport/phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin resistant subjects. *N Engl J Med* 335: 1357-1362, 1996.
11. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, et al. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* i: 785-789, 1963.
12. Randle PJ, Garland PB, Newsholme EA, et al. The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 131: 324-333, 1965.
13. Thiebaud D, DeFronzo RA, Jacot E, et al. Effect of long chain triglyceride infusion on glucose metabolism in man. *Metab Clin Exp* 31: 1128-1136, 1982.
14. Ferrannini E, Barrett EJ, Bevilacqua S, et al. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 72: 1737-1747, 1983.
15. Kelley DE, Mokan M, Simoneau J-A, et al. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 92: 91-98, 1993.
16. Yki-Jarvinen H, Puhakainen I, Koivisto VA. Effect of free fatty acids on glucose uptake and nonoxidative glycolysis across human forearm tissues in the basal state and during insulin stimulation. *J Clin Endocrinol & Metab* 72: 1268-1277, 1992.
17. Boden G, Jadali F, White J, et al. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest* 88: 960-966, 1991.
18. Boden G, Chen X, Ruiz J, et al. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 93: 2438-2446, 1994.
19. Bevilacqua S, Bonnadonna R, Buzzigoli G, et al. Acute elevation of free fatty acid levels lead to hepatic insulin resistance in obese subjects. *Metab Clin Exp* 36: 502-506, 1987.
20. Bevilacqua S, Buzzigoli G, Bonnadonna R, et al. Operation of Randle's cycle in patients with NIDDM. *Diabetes* 39: 383-389, 1990.

21. Yki-Jarvinen H, Puhakainen I, Saloranta C, et al. Demonstration of a novel feedback mechanism between FFA oxidation from intracellular and intravascular sources. *Am J Physiol* 260: E680–E689, 1991.
22. Bogardus C, Lillioja S, Stone K, et al. Correlation between muscle glycogen synthase activity and in vivo insulin action in man. *J Clin Invest* 73: 1185–1190, 1984.
23. Bajaj M, Suraamornkul S, Kashyap S, et al. Sustained reduction in plasma free fatty acid concentration improves insulin action without altering plasma adipocytokine levels in subjects with strong family history of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4649–4655, 2004.
24. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103: 253–259, 1999.
25. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, et al. Free fatty acid induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270–1274, 1999.
26. Perseghin G, Petersen KF, Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance; potential links with inflammation. *Int J Obes* 27: S6–S11, 2003.
27. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, et al. Impaired mitochondrial activity in the insulin resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350(7): 664–71, 2004.
28. Abdul-Ghani MA, Jani R, Chavez A, et al. Mitochondrial reactive oxygen species generation in obese non-diabetic and type 2 diabetic participants. *Diabetologia* 52: 574–82, 2009.
29. Kelley DE, He J, Menshikova EV, et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2944–50, 2002.
30. Lattuada G, Costantino F, Caumo A, et al. Reduced whole body lipid oxidation is associated with insulin resistance but not with intramyocellular lipid content in offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48: 741–747, 2005.
31. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300: 1140–1142, 2003.
32. Eldor R, Norton L, Fourcaudot M, et al. Increased lipid availability for three days reduces whole body glucose uptake, impairs muscle mitochondrial function and initiates opposing effects on PGC-1 α promoter methylation in healthy subjects. *PLoS ONE* 12: e0188208, 2017.
33. Schrauwen P, Hesselink MKC. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 1412–1417, 2004.
34. Ek J, Andersen G, Urhammer SA et al. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 44: 2220–2226, 2001.
35. Muller YL, Bogardus C, Beamer BA, et al. A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 promoter is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 52: 1864–1871, 2003.
36. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34: 267–273, 2003.
37. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Nat Acad Sci USA* 100: 8466–8471, 2003.
38. Daniele G, Eldor R, Merovci A, et al. Chronic reduction of plasma free fatty acid improves mitochondrial function and whole-body insulin sensitivity in obese and type 2 diabetic individuals. *Diabetes* 63: 2812–20, 2014.

4. EFFETTI DEGLI ACIDI GRASSI SULL'ENDOTELIO E SULL'APPARATO VASCOLARE

Andrea Natali

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Pisa, Pisa, Italia.

Messaggi chiave

- A livello dell'endotelio gli AG inducono stress ossidativo, infiammazione, minore sintesi e biodisponibilità di NO ed apoptosi.
- Nella cellula muscolare liscia gli AG inibiscono la proliferazione, potenziano l'espressione di LOX-1 ed incrementano l'espressione di MMP-2 ed MMP-9.
- In vivo manipolazioni sperimentali degli AG (soprattutto saturi) sono in grado di indurre disfunzione endoteliale, tuttavia le alterazioni della funzione endoteliale osservate nei soggetti obesi o diabetici non sembrano dipendere dai valori modestamente elevati di AC circolanti.
- Se da un lato nel miocardio disfunzionante l'ossidazione di acidi grassi risulta parzialmente compromessa e ridotta è la flessibilità metabolica, dall'altro sembra che l'inibizione dell'ossidazione lipidica possa esercitare un effetto positivo sull'inotropismo. Se e come i livelli circolanti di AG siano coinvolti in queste alterazioni non è chiaro.
- In termini di prevenzione cardiovascolare la supplementazione con acidi grassi omega 3 non sembra essere efficace nei pazienti con diabete.

Metabolismo lipidico nelle CE

Le lipoproteine di tipo VLDL, ma non i chilomicroni, possono entrare nella cellula endoteliale attraverso un meccanismo di tipo fagocitosi ed andare incontro a lipolisi intracellulare (1), la cellula è poi in grado anche di sintetizzare trigliceridi da acidi grassi (2), i quali si possono depositare sotto forma di gocce lipidiche ed in questo modo può fare da tampone nei confronti dei gradienti plasmatici acuti (3). La cellula possiede anche il corredo enzimatico (ATGL e lipasi ormono-sensibile) per idrolizzare le gocce lipidiche in modo da modulare la fornitura di substrati altamente energetici in base alle esigenze del tessuto vicino (3). La lipasi delle lipoproteine, sintetizzata dal tessuto adiposo e da quello muscolare, viene trasferita sulle cellule endoteliali dove idrolizza i trigliceridi circolanti ad acidi grassi. L'albumina lega la maggior parte di acidi grassi che provengono dall'idrolisi delle lipoproteine ed è indispensabile per prevenire l'effetto tossico degli acidi grassi liberi sulla permeabilità, in loro assenza infatti nel tessuto si ha formazione di

edema e compromissione degli scambi metabolici con il tessuto (1). Gli AG vengono trasportati attraverso la membrana cellulare con due modalità (4): mediante un meccanismo di diffusione passiva (tipo flip/flop), oppure attraverso un ingresso facilitato per mezzo di una o più molecole specializzate presenti sulla membrana (CD36, FATP1-5). Vengono poi ossidati a livello mitocondriale mediante il sistema carnitina/CPT1a. All'interno della cellula, data la loro bassa solubilità acquosa, gli AG sono legati a molecole trasportatrici (FATPs) che regolano la loro biodisponibilità a fini ossidativi ed il loro trasferimento al tessuto più vicino. Nonostante l'ampia disponibilità di substrato la CE è in grado anche di sintetizzare lipidi *de novo* e questo sembra avere un ruolo importante per mantenere la permeabilità e la sintesi di eNOS (5). In termini energetici il contributo dell'ossidazione lipidica è piccolo (circa 10%) e sembra che il loro ruolo sia quello di sostenere il ciclo degli acidi tricarbossilici per la sintesi di biomassa (DNA/RNA) in modo molto selettivo dato che questo processo non sembra possa essere sostenuto dal metabolismo glucidico o della glutammina (5). Un eccesso di AG circolanti è in grado di incrementare lo stress ossidativo intracellulare attraverso l'attivazione della NADPH ossidasi (NOX4) e l'inattivazione di eNOS assieme alla concomitante sintesi *de novo* di diacilglicerolo (DAG) mediata da PKC (6).

Effetti degli acidi grassi sulle cellule endoteliali

L'acido palmitico a concentrazioni fisiologiche (100 $\mu\text{mol/L}$) induce una risposta di tipo infiammatorio (attivazione del segnale NF- κ B, espressione di IL-6 e di ICAM) indotta dall'accumulo intracellulare di superossidi che fa seguito all'attivazione dell'enzima NADPH ossidasi (NOX4) la quale sembra mediata dai recettori tipo toll-4 (7, 8). L'attivazione di NF- κ B è anche responsabile della disfunzione endoteliale, intesa sia come ridotta produzione di ossido nitrico (NO) causata da una ridotta fosforilazione dell'ossido nitrico sintetasi (eNOS), sia come una sua ridotta biodisponibilità dovuta all'eccesso di radicali liberi di ossigeno (7). Alla formazione di superossidi concorre anche la produzione autocrina e paracrina di prostanoidi da parte dell'enzima ciclo

ossigenasi COX-2 (9). Alla ridotta funzione dell'enzima eNOS concorre anche l'alterazione della regolazione del calcio intracellulare (più elevato a riposo e meno responsivo agli agonisti) la quale sembra secondaria ad un accumulo di PKC (10). La sovraesposizione a radicali di ossigeno indotta dagli AG è poi anche causa di apoptosi (11, 12). L'effetto dei diversi tipo di acidi grassi sull'apoptosi sembra, stranamente, proporzionale al numero di doppi legami (PUFA>MUFA>S) e, cosa interessante, è stato riprodotto anche cimentando cellule HUVEC con il plasma di soggetti con valori elevati di AG (327 $\mu\text{mol/L}$), mentre non si verificava con il plasma degli stessi soggetti contenente valori bassi di AG (56 $\mu\text{mol/L}$) (13). Anche il sistema renina angiotensina (Figura 1) partecipa alla trasduzione degli effetti negativi degli AG sull'endotelio, anche se in modo indiretto. Gli AG infatti, inducono l'attivazione del RAS nei monociti e nei polimorfonucleati circolanti i quali interferiscono negativamente con le cellule endoteliali attraverso il rilascio dell'enzima mielo perossidasi (14). I monociti incubati con AG mostrano un incremento dei radicali liberi dell'ossigeno ed una maggiore espressione di molecole di adesione (CD11b) (15).

Acidi grassi e cellule muscolari lisce

Gli AG saturi come il palmitico e lo stearico promuovono l'apoptosi anche nelle cellule muscolari lisce vascolari, un effetto che risulterebbe attenuato dagli AG mono insaturi come il palmitoleico e l'oleico (16). Recentemente in uno studio molto accurato (17) sono stati ulteriormente chiariti gli effetti dei diversi AG senza che emergessero differenze sostanziali. Infatti, in cellule muscolari lisce di aorta di ratto sia gli acidi grassi saturi (palmitico) che mono insaturi (oleico) inibiscono la proliferazione mediante induzione di autofagia, inoltre entrambi potenziano l'espressione del recettore responsabile dell'ingresso di LDL ossidate (LOX-1) ed incrementano l'espressione di MMP-2 ed MMP-9. Nel loro insieme tali studi suggeriscono che entrambe le classi di AG, agendo

sul rimodellamento vascolare e l'ingresso di LDL ossidate, possano contribuire alla crescita e alla destabilizzazione della placca aterosclerotica.

Acidi grassi e funzione endoteliale nell'uomo

Nelle investigazioni cliniche la funzione endoteliale può essere studiata in 4 distretti: le arterie coronariche, l'arteria brachiale, l'arteria femorale e nel microcircolo sottocutaneo. È possibile esplorare la funzione di piccoli vasi di resistenza misurando la risposta del flusso (di solito con pletismografia o il metodo della diluizione) ad una sostanza infusa nel vaso in grado di indurre il rilascio di ossido nitrico (acetilcolina, metacolina, bradichinina). Alternativamente si può valutare la funzione delle arterie di conduttanza misurando la variazione del diametro del vaso (ecografia, angiografia) che viene indotta dall'accelerazione del flusso prodotta applicando una brusca vasodilatazione (ischemia, papaverina) a valle del vaso (flow-mediated dilatation o FMD). In tutti i casi è necessario sempre misurare anche la risposta non-endotelio mediata (cioè delle cellule muscolari lisce) applicando sostanze che rilasciano direttamente NO come il sodio nitroprussiato od i nitroderivati. Questo per verificare l'integrità della risposta della muscolatura liscia del vaso altrimenti non è possibile stabilire se l'eventuale ridotta risposta dipenda interamente e solo dalla disfunzione dell'endotelio.

Il primo lavoro che ha dimostrato l'effetto negativo degli AC sulla funzione vasodilatante endoteliale è quello del gruppo di Alain Baron ad Indianapolis. I livelli di AG sono stati triplicati e decuplicati mediante l'infusione di una miscela di lipidi (con eparina per attivare la lipoprotein lipasi) a 2 velocità diverse oppure raddoppiati mediante la soppressione della secrezione insulinica con somatostatina. In tutti e tre gli esperimenti la risposta di flusso (diluizione termica) alla metacolina (intra femorale) si è ridotta di poco (del 20%) senza una chiara evidenza di dose-risposta (18). Qualche anno dopo il gruppo di Angelo Avogaro a Padova ha dimostrato che l'effetto negativo (questa volta più sostanzioso, del 40%) era presente sia infondendo acidi grassi a catena

lunga che quelli a catena media; da notare che in questo studio i livelli di AG erano decuplicati rispetto al basale (19). Per quanto concerne i meccanismi, in questo studio il pretrattamento con ASA (per bloccare la COX-2) non modificava la risposta mentre in uno studio successivo il gruppo di Roden M. in Vienna(20) ha dimostrato che la vitamina C previene l'effetto negativo degli AG a suggerire il ruolo preponderante dell'accumulo di radicali di ossigeno non mediato dalla COX-2. Un ruolo del sistema renina angiotensina sembra suggerito dalla singolare osservazione che oltre alla vitamina C anche una singola dose di perindopril oppure di losartan era in grado di prevenire la disfunzione endoteliale mediata dagli AG (21). È interessante notare che gli stessi di cui sopra ed anche altri (22) hanno segnalato un incremento di flusso basale in risposta all'infusione di lipidi con eparina a suggerire che l'effetto sul tono vascolare basale possa essere opposto a quello stimolato.

Se gli elevati livelli di AG che si riscontrano nelle condizioni di insulino resistenza siano responsabili della disfunzione endoteliale, che ad essa spesso si associa, non è chiaro. L'unico studio che ha affrontato questa domanda è quello del gruppo di Stehouwer (Amsterdam) ed ha dato un esito sostanzialmente negativo (23). Mentre in soggetti magri l'infusione di lipidi ed eparina induceva disfunzione endoteliale, in soggetti obesi né la risposta microcircolatoria all'acetilcolina né quella al nitroprussiato venivano modificate dalla somministrazione di acipimox (un farmaco in grado di ridurre significativamente gli acidi grassi circolanti). Anche in cronico la riduzione farmacologica degli AG non sembra influenzare la funzione endoteliale. In soggetti con dislipidemia ed aterosclerosi la terapia ipolipemizzante aggressiva con fibrati e/o niacina non ha effetto sulla funzione endoteliale dei vasi di conduttanza (24, 25). Dati indiretti di conferma alla scarsa rilevanza degli acidi grassi nella patogenesi della disfunzione endoteliale emergono anche da studi in cui l'intervento era mirato a migliorare la sensibilità insulinica e si è andati a cercare se il gradiente plasmatico di concentrazione di AG potesse

giustificare il miglioramento osservato. Lo abbiamo fatto noi nello studio con il rosiglitazone (26), lo ha fatto la Yki Yarvinen nello studio con l'insulina (27) e lo hanno fatto negli studi di intervento sullo stile di vita (28): in nessun caso le variazioni di AG plasmatici correlavano con il miglioramento della funzione endoteliale. Un'altra osservazione molto interessante è quella fatta dal gruppo di Vienna (Roden M) che ha dimostrato che la terapia cronica con PPAR-gamma agonisti (Rosiglitazone) non solo è in grado di prevenire l'effetto negativo degli AG sulla funzione endoteliale (29), ma anche attenua l'incremento di AG indotto dall'infusione di trigliceridi ed eparina.

Infine, ci sono i dati con la dieta. Tra gli AG assunti con la dieta quelli che sembrano avere un effetto peggiore sulla funzione endoteliale sono i saturi in ragione proporzionale al numero di doppi legami (30); tuttavia, la manipolazione dell'introito alimentare del rapporto tra insaturi e saturi non è in grado di ripristinare la FE nei soggetti in cui è compromessa (31). Neppure la supplementazione con EPA+DHA (32) modifica la FE, mentre l'incremento selettivo di omega-3 sembra indurre un effetto positivo (33). Mediante lo stesso approccio (FMD) si è visto come l'ingestione di acidi grassi saturi (stearato) provochi una riduzione della risposta del 20%, mentre i PUFA, non solo la migliorano (+20%), ma sono in grado di prevenire l'effetto negativo dei grassi saturi quando vengano ingeriti contestualmente (34). Una distinzione importante sembra emergere tra gli AG in merito al loro effetto sulla funzione endoteliale: da una parte i cattivi (AG saturi e mono insaturi) e dall'altra i buoni (poli insaturi).

Acidi grassi e funzione cardiaca

In modelli animali la disfunzione contrattile miocardica si associa a una minore ossidazione di acidi grassi e un maggior utilizzo di glucosio a fini energetici (35). Inoltre, nel miocardio disfunzionante, non si verifica lo shift ossidativo da acidi grassi a glucosio che è presente nel miocardio sano in risposta ad uno stimolo inotropico (36). Se questo sia un meccanismo di adattamento (maggiore

efficienza energetica dei carboidrati) oppure sia causa di progressione di malattia non è chiaro. Alcuni piccoli studi suggeriscono che inibire l'ossidazione di AG possa produrre un miglioramento della funzione contrattile in modelli animali e nei pazienti con scompenso. La condizione di disglucemia, sembra indurre un'esasperazione di questa alterazione metabolica: lo shift a carboidrati è più accentuato in condizioni di riposo e la flessibilità metabolica miocardica in risposta agli stimoli è ancora più ridotta (37). Se questo possa essere causato dall'eccesso di AG che si associa alla disglucemia oppure alle altre alterazioni che caratterizzano la condizione, non è chiaro.

I trial clinici cardiovascolari di intervento

Sebbene studi epidemiologici abbiano riscontrato associazione tra i livelli di omega 3 e l'incidenza di malattie CV nella popolazione generale, dati più recenti (38) e i risultati degli studi di intervento non hanno fino ad oggi dato grandi soddisfazioni. Nei pazienti con diabete ad esempio lo studio ORIGIN non ha dimostrato che la supplementazione di omega 3 polinsaturi in soggetti con elevato rischio CV sia in grado di prevenire gli eventi maggiori (39). Una recente revisione sistematica della società americana di cardiologia (AHA) (40) ha rivisto a ribasso anche la raccomandazione di livello IIa del 2002 nella prevenzione della morte improvvisa (-10%) in soggetti con malattia CV che è stata retrocessa a IIb; e inoltre ha definito come non raccomandato l'uso di omega 3 nella prevenzione dell'ictus o della fibrillazione atriale.

Conclusioni

In termini potenziali gli AG, soprattutto quelli saturi, sono in grado di produrre danno a livello dell'endotelio, tuttavia la mia impressione è che questo in vivo si verifichi solo in condizioni estreme di dieta o di attivazione della lipolisi endogena come ad esempio nelle condizioni di stress acuto. Non credo che i valori modestamente elevati di AG che caratterizzano condizioni più

croniche come l'obesità, il diabete e l'insulino-resistenza possano essere i principali responsabili della disfunzione endoteliale che comunemente si osserva in quei pazienti. L'endotelio riconosce un gran numero di effettori negativi e positivi (Figura 2) ed è dalla loro globale attivazione/interazione che si determina lo stato funzionale, influenzato anche dalle caratteristiche dello specifico settore circolatorio (vasi di conduttanza, resistenza, e microcircolo) e del tessuto irrorato (miocardio, cervello, muscolo scheletrico, tessuto adiposo).

Figure

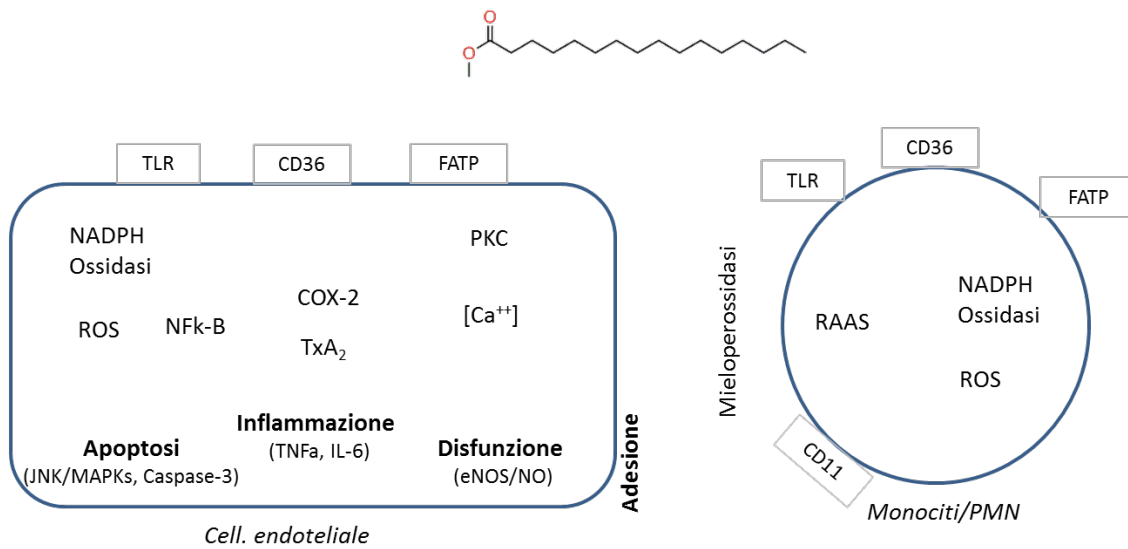


Figura 1. Schema dei meccanismi molecolari attraverso cui gli acidi grassi modulano la funzione endoteliale.

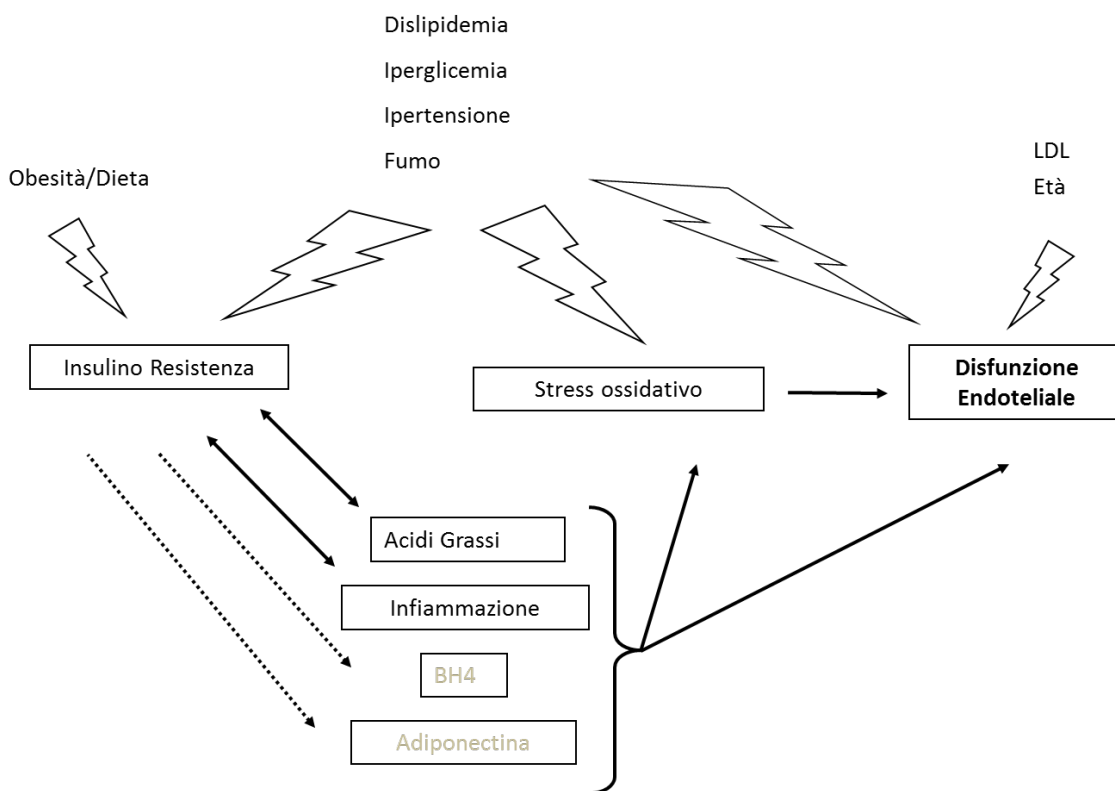


Figura 2. Schema dell'insieme dei fattori che sono in grado di influire in modo negativo sulla funzione endoteliale. Le frecce tratteggiate indicano un'interazione negativa, quelle continue una relazione positiva.

Referenze

1. Hulsmann WC, Dubelaar ML. Aspects of fatty acid metabolism in vascular endothelial cells. *Biochimie* 70: 681-686, 1988.
2. Astanina K, Koch M, Jungst C, et al. Lipid droplets as a novel cargo of tunnelling nanotubes in endothelial cells. *Sci Rep* 5: 11453, 2015.
3. Kuo A, Lee MY, Sessa WC. Lipid Droplet Biogenesis and Function in the Endothelium. *Circ Res* 120: 1289-1297, 2017.
4. Mashek DG, Coleman RA. Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. *Curr Opin Lipidol* 17: 274-278, 2006.
5. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, et al. Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev* 98: 3-58, 2018.
6. Li H, Li H, Bao Y, et al. Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor-kappaB pathway in rat aorta. *Int J Cardiol* 152: 218-224, 2011.
7. Kim F, Pham M, Luttrell I, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res* 100: 1589-1596, 2007.
8. Maloney E, Sweet IR, Hockenbery DM, et al. Activation of NF-kappaB by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1370-1375, 2009.
9. Gao Z, Zhang H, Liu J, et al. Cyclooxygenase-2-dependent oxidative stress mediates palmitate-induced impairment of endothelium-dependent relaxations in mouse arteries. *Biochem Pharmacol* 91: 474-482, 2014.
10. Tang Y, Li G. Chronic exposure to high fatty acids impedes receptor agonist-induced nitric oxide production and increments of cytosolic Ca²⁺ levels in endothelial cells. *J Mol Endocrinol* 47: 315-326, 2011.
11. Lu Y, Qian L, Zhang Q, et al. Palmitate induces apoptosis in mouse aortic endothelial cells and endothelial dysfunction in mice fed high-calorie and high-cholesterol diets. *Life Sci* 92: 1165-1173, 2013.
12. Piro S, Spampinato D, Spadaro L, et al. Direct apoptotic effects of free fatty acids on human endothelial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 96-104, 2008.
13. Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, et al. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB J* 18: 146-148, 2004.
14. Azekoshi Y, Yasu T, Watanabe S, et al. Free fatty acid causes leukocyte activation and resultant endothelial dysfunction through enhanced angiotensin II production in mononuclear and polymorphonuclear cells. *Hypertension* 56: 136-142, 2010.
15. Zhang WY, Schwartz E, Wang Y, et al. Elevated concentrations of nonesterified fatty acids increase monocyte expression of CD11b and adhesion to endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 514-519, 2006.
16. St-Denis C, Cloutier I, Tanguay JF. Key fatty acid combinations define vascular smooth muscle cell proliferation and viability. *Lipids* 47: 1073-1084, 2012.
17. Cheng CI, Lee YH, Chen PH, et al. Free Fatty Acids Induce Autophagy and LOX-1 Upregulation in Cultured Aortic Vascular Smooth Muscle Cells. *J Cell Biochem* 118: 1249-1261, 2017.
18. Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, et al. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest* 100: 1230-1239, 1997.
19. de Kreutzenberg SV, Crepaldi C, Marchetto S, et al. Plasma free fatty acids and endothelium-dependent vasodilation: effect of chain-length and cyclooxygenase inhibition. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 793-798, 2000.

20. Pleiner J, Schaller G, Mittermayer F, et al. FFA-induced endothelial dysfunction can be corrected by vitamin C. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2913-2917, 2002.
21. Watanabe S, Tagawa T, Yamakawa K, et al. Inhibition of the renin-angiotensin system prevents free fatty acid-induced acute endothelial dysfunction in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2376-2380, 2005.
22. Kearney MT, Chowienczyk PJ, Brett SE, et al. Acute haemodynamic effects of lipolysis-induced increase of free fatty acids in healthy men. *Clin Sci (Lond)* 102: 495-500, 2002.
23. de Jongh RT, Serne EH, Ijzerman RG, et al. Free fatty acid levels modulate microvascular function: relevance for obesity-associated insulin resistance, hypertension, and microangiopathy. *Diabetes* 53: 2873-2882, 2004.
24. Andrews TC, Whitney EJ, Green G, Kalenian R, Personius BE. Effect of gemfibrozil +/- niacin +/- cholestyramine on endothelial function in patients with serum low-density lipoprotein cholesterol levels <160 mg/dl and high-density lipoprotein cholesterol levels <40 mg/dl. *Am J Cardiol* 80: 831-835, 1997.
25. Warnholtz A, Wild P, Ostad MA, et al. Effects of oral niacin on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: results of the randomized, double-blind, placebo-controlled INEF study. *Atherosclerosis* 204: 216-221, 2009.
26. Natali A, Baldeweg S, Toschi E, et al. Vascular effects of improving metabolic control with metformin or rosiglitazone in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 1349-1357, 2004.
27. Vehkavaara S, Makimattila S, Schlenzka A, et al. Insulin therapy improves endothelial function in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 545-550, 2000.
28. Volek JS, Ballard KD, Silvestre R, et al. Effects of dietary carbohydrate restriction versus low-fat diet on flow-mediated dilation. *Metabolism* 58: 1769-1777, 2009.
29. Mittermayer F, Schaller G, Pleiner J, et al. Rosiglitazone prevents free fatty acid-induced vascular endothelial dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2574-2580, 2007.
30. De Caterina R, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 71: 213S-223S, 2000.
31. Sanders TA, Hall WL, Maniou Z, et al. Effect of low doses of long-chain n-3 PUFAs on endothelial function and arterial stiffness: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 94: 973-980, 2011.
32. Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM, Harris WS, et al. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* 93: 243-252, 2011.
33. Goodfellow J, Bellamy MF, Ramsey MW, et al. Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 35: 265-270, 2000.
34. Newens KJ, Thompson AK, Jackson KG, et al. DHA-rich fish oil reverses the detrimental effects of saturated fatty acids on postprandial vascular reactivity. *Am J Clin Nutr* 94: 742-748, 2011.
35. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: 1093-1129, 2005.
36. Neglia D, De Caterina A, Marraccini P, et al. Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3270-3278, 2007.
37. Trico D, Baldi S, Frascerra S, et al. Abnormal Glucose Tolerance Is Associated with a Reduced Myocardial Metabolic Flexibility in Patients with Dilated Cardiomyopathy. *J Diabetes Res* 2016: 3906425, 2016.

38. Del Gobbo LC, Imamura F, Aslibekyan S, et al. omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Biomarkers and Coronary Heart Disease: Pooling Project of 19 Cohort Studies. *JAMA Intern Med* 176: 1155-1166, 2016.
39. Investigators OT. Cardiovascular and Other Outcomes Postintervention With Insulin Glargine and Omega-3 Fatty Acids (ORIGINALE). *Diabetes Care* 39: 709-716, 2016.
40. Siscovick DS, Barringer TA, Fretts AM, et al. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation* 135: e867-e884, 2017.

5. RELAZIONE TRA ACIDI GRASSI DELLA DIETA E DIABETE

Rosalba Giacco

Istituto di Scienze dell'Alimentazione del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Avellino, Italia.

Messaggi chiave

- La qualità piuttosto che la quantità dei grassi della dieta influenza il rischio di sviluppo di diabete mellito tipo 2 (DM2).
- Il consumo degli acidi grassi n-6 PUFA e dei MUFA contenuti nell'olio di oliva si associa ad una riduzione del rischio di DM2 mentre nessun effetto è osservato con il consumo di n-3 PUFA a lunga catena.
- Il consumo di SFA non si associa ad un aumento del rischio di DM2 negli studi di popolazione; tuttavia, un'associazione positiva è riportata per le maggiori fonti di SFA, come le carni rosse e quelle processate.
- Il consumo di acidi grassi trans prodotti industrialmente aumenta il rischio di DM2 mentre evidenze limitate indicano un possibile ruolo protettivo sia degli SFA minori che degli acidi grassi trans derivanti dai ruminanti.
- La qualità degli acidi grassi della dieta influenza il profilo di rischio cardio-metabolico; in particolare la sostituzione degli SFA e dei CHO con i MUFA migliora il profilo lipidico, la pressione arteriosa e il controllo glicemico.

Introduzione

I grassi della dieta influenzano il rischio di sviluppo di Diabete Mellito tipo 2 (DM2) e il profilo di rischio cardio-metabolico nei pazienti con malattia conclamata. Sebbene una dieta a basso contenuto in grassi sia stata per anni raccomandata ai pazienti affetti da diabete mellito e ai soggetti non diabetici, i risultati degli studi epidemiologici sull'associazione dei grassi totali della dieta con il rischio di sviluppo di DM2 o con l'insulino-sensibilità sono abbastanza controversi. Alcuni studi riportano che un consumo elevato di grassi con la dieta si associa a obesità, a un aumento della massa grassa e a un'alterata distribuzione del grasso corporeo, fattori capaci di peggiorare la sensibilità insulinica, di influenzare il metabolismo del glucosio e incrementare il rischio di DM2 (1, 2). Altri studi, condotti in modelli animali e sull'uomo, mostrano che è la qualità dei grassi piuttosto che la quantità ad influenzare il rischio (3, 4); essa, infatti, influenza la sensibilità insulinica indipendentemente dall'obesità oltre che il profilo lipidico plasmatico, la pressione arteriosa, la funzione endoteliale e l'infiammazione subclinica.

Effetti della quantità dei grassi della dieta sul rischio di sviluppo di Diabete Mellito tipo 2

Nelle scorse decadi studi condotti su piccoli campioni di popolazione mostravano un'associazione positiva tra consumo di grassi totali, grassi saturi (SFA) e rischio di DM2 (1, 5). In particolare, nel San Luis Valley Diabetes Study i soggetti che sviluppavano DM2 avevano un consumo più alto di grassi totali (>43% vs <39%) e SFA, e un rischio di circa sei volte più elevato per un incremento di 40 g/die di grassi totali (5). Tale effetto era confermato nelle coorti Olandese e Finlandese del Seven Countries Study, durante un follow-up di 20 anni (1) e da uno studio di Vessby et al. (6) che mostrava un aumento del rischio di DM2 nei soggetti che presentavano una percentuale più alta di SFA e acido palmitoleico (16:1 omega-7) negli esteri del colesterolo sierico e una concentrazione più bassa di acido linoleico (18:2 omega-6). Tale associazione non è stata, però, confermata negli studi prospettici condotti su grandi coorti e con un lungo follow-up: il Nurses'Health Study (7), l'Iowa Women's Healthy Study (8) e l'European Prospective Study (EPIC) (9), e da uno studio d'intervento controllato nel quale la riduzione dei grassi della dieta dal 34% a 26% dell'energia totale giornaliera in soggetti con alterata tolleranza al glucosio non influenzava il rischio di DM2 durante i 5 anni di follow-up (10). Al contrario, altri studi controllati di lunga durata hanno mostrato che un ridotto intake di grassi totali e di SFA, in combinazione con una modesta riduzione del peso corporeo, associato a un incremento delle fibre vegetali e a un modesto incremento dell'attività fisica, riduce il rischio di DM2 in soggetti con ridotta tolleranza al glucosio (11, 12). In particolare, nel Finnish Diabetes Prevention Study, il più alto rischio di DM2 si associa a una dieta ricca in grassi e povera in carboidrati (CHO), mentre una dieta ridotta in grassi e più ricca in CHO ha un effetto protettivo (13).

Effetti della qualità dei grassi della dieta sul rischio di sviluppo di Diabete Mellito tipo 2

Acidi grassi saturi e trans

Gli acidi grassi saturi contenuti prevalentemente negli alimenti sono: l'acido laurico (C12:0), l'acido miristico (C14:0), l'acido palmitico (C16:0) e l'acido stearico (C18:0). Tali acidi grassi si trovano principalmente in prodotti di origine animale quali burro, latte e derivati, carne, carne processata, uova e in alcuni prodotti vegetali quali cioccolato, burro di cacao e oli di palma e di cocco. Con l'eccezione degli studi sopra riportati (1-6), nessuna associazione tra consumo di SFA e rischio di DM2 è stata osservata nelle coorti del Nurses'Health Study (7), dell'Iowa Women's Healthy Study (8), dell'European Prospective Study (EPIC) (9) e del Women Health Initiative (14). Tuttavia, è stata osservata un'associazione positiva tra le maggiori fonti di grassi saturi, come le carni rosse e processate, e il rischio di DM2 (15, 16) e un'associazione inversa con il consumo di yogurt e prodotti lattiero-caseari a basso contenuto in grassi (17). Recentemente, lo studio PREDIMED ha mostrato (18) che il più alto consumo di SFA e di grassi animali raddoppia il rischio di DM2 sia nell'analisi eseguita su tutti i partecipanti allo studio che in quella effettuata nei soggetti assegnati al trattamento con dieta Mediterranea. L'associazione del consumo degli SFA con il rischio di DM2 è supportata da diversi studi epidemiologici che analizzano il rapporto degli acidi grassi nei fosfolipidi plasmatici e negli esteri del colesterolo, biomarcatori d'intake dei grassi della dieta. Questi studi riportano che i livelli di SFA totali, di acido palmitico e di acido stearico presenti nei fosfolipidi e negli esteri del colesterolo correlano positivamente con il rischio di DM2 (19-22). Nonostante le evidenze disponibili, l'associazione dei livelli sierici degli acidi grassi saturi (miristico, palmitico e stearico) con il rischio di DM2 va interpretata con cautela in quanto questi oltre che di origine alimentare possono derivare dalla lipogenesi de novo a partire dai CHO e dall'alcool e, pertanto, non possono essere considerati in senso stretto marcatori d'intake di SFA. Un'associazione inversa è, invece, stata osservata tra i livelli dei fosfolipidi sierici degli SFA minori,

quale l'acido pentadecanoico (C15:0) e l'acido eptadecanoico (C17:0), (acidi grassi a catena dispari contenuti nel latte e derivati, nel pesce e nei prodotti marini) e rischio di DM2 sia negli studi caso-controllo (19,23) che in quelli prospettici (24). Complessivamente i risultati di questi studi suggeriscono un ruolo protettivo degli acidi grassi saturi a catena dispari sul rischio di DM2. Gli acidi grassi trans di origine industriale sono contenuti nelle margarine, negli alimenti fritti in oli parzialmente idrogenati e nei prodotti da forno. Esiste una forte evidenza che il consumo di questi acidi grassi aumenta il rischio di malattie cardiovascolari; meno chiaro è, invece, il loro effetto sul rischio di DM2. L'analisi combinata di cinque studi non ha mostrato alcuna associazione significativa tra acidi grassi trans e rischio di DM2. Tale risultato va interpretato con cautela in quanto questi studi presentano una notevole eterogeneità. Infatti, due di essi riportano una forte associazione (7, 25) e tre nessuna (8, 26, 27). Inoltre, l'analisi combinata di 3 studi, che esclude quelli con bias e riduce l'eterogeneità, mostra un incremento del 28% del rischio (28). Per quanto riguarda, invece, gli acidi grassi trans derivanti dai ruminanti, quale l'acido trans-palmitoleico contenuto nei prodotti lattiero-caseari, l'analisi degli studi che valuta l'associazione dei livelli sierici di tale acido con il rischio di DM2 mostra una riduzione del rischio dal 24 al 54% (23, 29). I risultati complessivi degli studi su acidi grassi trans e rischio di DM2 sembrano suggerire, quindi, un effetto negativo degli acidi grassi trans ottenuti industrialmente e un ruolo protettivo degli acidi grassi trans derivanti dai ruminanti.

Acidi grassi n-6 PUFA (acido linoleico)

L'acido linoleico (C18:2) è un acido grasso polinsaturo n-6 a media catena, essenziale, contenuto negli oli di semi di mais, di girasole, di soia, di cotone e di cartamo. Gli studi mostrano che un incremento dell'intake di acido linoleico dal 3% al 6%, in sostituzione dei CHO o degli SFA, riduce del 20% il rischio di DM2 (7, 8, 9, 27) e tale associazione è confermata dall'analisi dei livelli di acido linoleico nei fosfolipidi sierici (20-22).

Acidi grassi n-3 PUFA

Appartengono agli acidi grassi polinsaturi n-3 a lunga catena l'acido eicosapentaenoico C20:5 (n-3) (EPA) e l'acido docosaesaenoico C22:6 (n-3) (DHA). Essi sono contenuti prevalentemente nei pesci (salmone, aringhe, sgombero, trota, tonno etc.) e solo in piccole quantità nelle carni di selvaggina. I risultati degli studi epidemiologici non concordano sull'effetto degli n-3 PUFA a lunga catena sul rischio di DM2. Infatti, alcuni studi mostrano che un incremento del consumo di questi acidi grassi di origine marina incrementa del 20-40% il rischio di DM2 (8, 30, 31), mentre i risultati di due metanalisi non mostrano alcuna associazione (32, 33). L'assenza di associazione è confermata anche dagli studi che valutano i livelli sierici di n-3 PUFA a lunga catena suggerendo che tali acidi grassi non hanno alcuna influenza sullo sviluppo di diabete tipo 2. L'acido alfa-linolenico (C18:3) n-3 (ALA) è un acido grasso polinsaturo essenziale n-3 a media catena, contenuto nell'olio di colza, di semi di lino e di noci e in piccole quantità nelle verdure a foglie verdi. Una metanalisi di studi prospettici mostra che per un incremento del consumo di ALA pari a 0.5 g/die il rischio di DM2 si riduce del 7% senza, però, raggiungere la significatività statistica. Tale trend si osservava anche quando si valutavano i livelli circolanti di ALA (6). Un solo studio mostra una relazione inversa tra i livelli di ALA nei fosfolipidi sierici e il rischio di DM2 (20), mentre la metanalisi di Wu et al (33) non mostra alcuna associazione. L'insieme di queste evidenze suggerisce, quindi, un'assenza di effetto sul rischio di DM2 sia degli acidi grassi n-3 a lunga che dell'acido alfa-linolenico.

Acidi grassi MUFA

Gli acidi grassi monoinsaturi (o acidi grassi monoenoici) sono: l'acido oleico C18:1 (cis-9) contenuto nell'olio di oliva, l'acido palmitoleico C16:1 (cis-9) presente nei grassi del latte, negli oli di pesce, nell'olio di colza e nel foie gras, l'acido vaccenico C18:1 (trans-11) presente nel grasso bovino,

l'acido elaidico C18:1 (trans-9) contenuto nelle masse grasse degli erbivori e in particolare dei ruminanti e l'acido gadoleico C20:1 (cis-9) presente nell'olio di colza. Gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) non influenzano il rischio di DM2 negli studi osservazionali, ciò potrebbe essere dovuto al fatto che questi studi non tengono conto della differente origine dei MUFA, animale o vegetale (7). Infatti, i MUFA di origine animale rispetto a quelli di origine vegetale, si associano a un elevato intake di SFA. Una recente metanalisi di studi prospettici mostra che i soggetti nei quali il consumo di olio di oliva, ricco in acido oleico, è elevato, il rischio di DM2 è del 16% più basso e si riduce del 9% per un incremento di 10 g/die di olio d'oliva (34). Ovviamente, questa metanalisi non permette di escludere che altre componenti contenute nell'olio di oliva, ad esempio i polifenoli, possano contribuire alla riduzione del rischio. Tuttavia, l'ipotesi che i MUFA possano avere un effetto protettivo è supportata da uno studio d'intervento in soggetti sani nei quali il trattamento con una dieta ricca in MUFA, rispetto a una ricca in SFA, migliora la sensibilità insulinica solo dopo tre mesi d'intervento (35).

È da sottolineare che fino ad oggi quasi la totalità degli studi epidemiologici ha valutato il rischio di DM2 in relazione all'intake o al livello sierico di un singolo acido grasso. Recentemente, invece, è stato pubblicato uno studio che ha valutato l'associazione di una combinazione di ben 27 acidi grassi contenuti nei fosfolipidi plasmatici sul rischio di DM2 (36). Lo studio mostra un pattern di acidi grassi caratterizzato da alte concentrazioni di acido linoleico, di acido stearico, di acidi grassi a catena dispari e di acidi grassi saturi a lunga catena e basse concentrazioni di acido α -linolenico, di acido palmitico e di acidi grassi monoinsaturi a lunga catena. Questo pattern si associa ad un più basso rischio di DM2 e correla inversamente con gli indici di adiposità e d'insulino-resistenza, con i livelli sierici di trigliceridi e con l'intake di soft drink e di alcool, e positivamente con i livelli sierici di HDL-col e con l'intake di grassi polinsaturi, di fibre e di caffè. I risultati di questo studio suggeriscono che la combinazione dei livelli degli acidi grassi sierici,

piuttosto che la concentrazione di un singolo acido grasso o di una sottoclasse di acidi grassi, permette di predire in modo più affidabile il rischio di DM2. L'applicazione di questo approccio negli studi futuri potrà contribuire a chiarire il ruolo della qualità dei grassi della dieta sul rischio di diabete tipo 2.

Effetti degli acidi grassi sui markers di rischio cardiometabolico: studi d'intervento

I grassi della dieta possono influenzare il profilo di rischio cardio-metabolico nel paziente diabetico.

Le attuali raccomandazioni nutrizionali per il paziente diabetico fissano il limite massimo di consumo dei grassi al 35% dell'energia totale giornaliera nei soggetti normopeso e al 30% nei pazienti obesi/sovrappeso. Tale quantità, però, è stata stimata sulla base del rischio di malattia coronarica associato al consumo di grassi e sui risultati di studi condotti su popolazioni generali giacché gli studi eseguiti sui pazienti diabetici sono veramente pochi. Le evidenze, comunque, suggeriscono che il rischio cardio-metabolico è influenzato dalla qualità dei grassi piuttosto che dalla quantità (37). Nonostante la scarsità degli studi nei pazienti diabetici, è verosimile che l'effetto dei grassi sia lo stesso di quello osservato nei soggetti sani. Nei soggetti non diabetici la riduzione degli SFA abbassa il colesterolo LDL mentre il consumo di grassi trans incrementa il colesterolo totale e delle LDL e riduce quello delle HDL senza alcun effetto sui trigliceridi (38). Uno dei pochissimi studi condotti su pazienti diabetici mostra che la riduzione degli SFA dal 17% all'8% e l'incremento dei MUFA dal 15% al 23% dell'energia non ha alcun effetto sul controllo glicemico ma riduce significativamente i trigliceridi delle VLDL in fase postprandiale (39).

Maggiori evidenze sono disponibili sugli effetti del consumo dei MUFA. Essi, come componente della dieta Mediterranea, hanno mostrato di migliorare il controllo glicemico e diminuire i fattori di rischio cardio-metabolici nei pazienti diabetici (40). Tali benefici sono osservati anche nei trials

clinici nei quali i MUFA sono studiati come una componente della dieta Mediterranea. Una metanalisi di studi d'intervento a lungo termine su soggetti affetti da diabete e/o da alterata tolleranza glucidica, insulino-resistenti, mostra che la dieta ad alto contenuto in MUFA ($\geq 12\%$ dell'energia totale giornaliera) rispetto a una a basso contenuto (MUFA $\leq 12\%$), riduce significativamente l'HbA1c (41). Un'altra metanalisi osserva che la dieta ricca in MUFA (Proteine 17%, CHO 39.4%, Grassi totali 43.1% e MUFA 24.5%), rispetto a una dieta ricca in CHO (Proteine 17.3%, CHO 54.1%, Grassi totali 27.6% e MUFA 11.0%), riduce la glicemia a digiuno, i trigliceridi, il peso corporeo, la pressione arteriosa sistolica, aumenta il colesterolo HDL ma non riduce l'HbA1c (42). Nella stessa metanalisi, la dieta ricca in MUFA, confrontata con la dieta ricca in PUFA, ha un beneficio maggiore sulla glicemia a digiuno. Inoltre, anche nei soggetti sani la sostituzione del 5% dei CHO della dieta con i MUFA riduce l'HbA1c, l'insulinemia due ore dopo il carico di glucosio e migliora l'HOMA index (43). Pertanto, nonostante qualche discrepanza legata all'eterogeneità delle caratteristiche degli studi, delle diete utilizzate, della durata del trattamento e delle caratteristiche metaboliche della popolazione studiata, tutte le metanalisi mostrano un effetto benefico dei MUFA sul profilo di rischio cardiovascolare. Per quanto riguarda l'effetto dei MUFA sul metabolismo lipidico, gli studi di metabolomica riportano che la sostituzione di acido palmitico con l'acido oleico abbassa i livelli di colesterolo totale e delle LDL e la quota di ossidazione degli acidi grassi a digiuno (44).

Gli studi che valutano gli effetti di un supplemento di n-3 PUFA a lunga catena (EPA e DHA) in pazienti diabetici mostrano una riduzione significativa dei livelli plasmatici dei trigliceridi e del colesterolo VLDL e un aumento dei livelli del colesterolo LDL. Nessun effetto è riportato, invece, sui livelli plasmatici di colesterolo HDL, HbA1c, glicemia e insulina a digiuno o sul peso corporeo (45). Recentemente, uno studio ha, però, mostrato che la supplementazione di PUFA n-3 a lunga catena riduce la glicemia a digiuno e l'HbA1c, la circonferenza vita, la pressione arteriosa sistolica e

diastolica e la pentosidina, un biomarker dei prodotti di glicosilazione avanzata in pazienti diabetici tipo 2 (46). La supplementazione di acido alfa-linolenico nella dieta non ha mostrato, invece, alcun effetto sul controllo metabolico nei pazienti diabetici (47).

Conclusioni

I risultati degli studi osservazionali indicano che la dieta ad alto contenuto in grassi non influenza il rischio di sviluppo di diabete tipo 2 mentre quelli sugli effetti delle varie classi di acidi grassi non sono sufficienti a far trarre conclusioni definitive e sono necessari ulteriori studi. Tuttavia, vi sono buone evidenze che il consumo di PUFA, in particolare di acido linoleico, riduca il rischio di DM2 mentre l'effetto dei MUFA necessita di essere investigato in studi che tengano conto della loro fonte alimentare: animale o vegetale.

Scarse e non conclusive sono le evidenze circa il ruolo nocivo degli SFA sul rischio di DM2 mentre più consistenti sono quelle relative all'effetto dannoso prodotto dagli acidi grassi trans ottenuti industrialmente. Evidenze limitate indicano un ruolo protettivo degli SFA minori e degli acidi grassi trans derivanti dai ruminanti sul rischio di diabete e nessuna influenza degli n-3 PUFA a lunga catena e dell'ALA.

Gli effetti della qualità dei grassi della dieta sul rischio di diabete tipo 2 potranno essere meglio chiariti se gli studi futuri utilizzeranno la misurazione di una combinazione di acidi grassi piuttosto che di un singolo acido grasso come marcatore di consumo dei grassi della dieta. Le evidenze sull'effetto della qualità degli acidi grassi sul profilo di rischio cardio-metabolico sono consistenti e mostrano che la sostituzione degli SFA e dei CHO con i MUFA migliora il profilo lipidico, pressorio e il controllo glicemico, mentre la sostituzione con i PUFA, a fronte di un beneficio sul profilo lipidico, ha un limitato/scarso effetto sul controllo glicemico. La supplementazione degli acidi grassi n-3 a lunga catena, infine, migliora la trigliceridemia ma non il compenso glicemico.

Referenze

1. Feskens EJ, Virtanen SM, Räsänen L, et al. Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. A 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes Care* 18(8): 1104-12, 1995.
2. Marshall JA, Hamman RF, Baxter J. High-fat, low-carbohydrate diet and the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus: the San Luis Valley Diabetes Study. *Am J Epidemiol* 134 (6): 590-603, 1991.
3. Lichtenstein AH, Schwab US. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis* ;150 (2): 227-43, 2000.
4. Fickova M, Hubert P, Crémel G, et al. Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes. *J Nutr* 128 (3): 512-9, 1998.
5. Marshall JA, Hoag S, Shetterly S, et al. Dietary fat predicts conversion from impaired glucose tolerance to NIDDM. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care* 17 (1): 50-6, 1994.
6. Vessby B, Aro A, Skarfors E, et al. The risk to develop NIDDM is related to the fatty acid composition of the serum cholesterol esters. *Diabetes* 43 (11): 1353-7, 1994.
7. Salmerón J, Hu FB, Manson JE, et al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr* 73(6): 1019-26, 2001.
8. Meyer KA, Kushi LH, Jacobs DR Jr, et al. Dietary fat and incidence of type 2 diabetes in older Iowa women. *Diabetes Care* 24(9): 1528-35, 2001.
9. Harding AH, Day NE, Khaw KT, et al. Dietary fat and the risk of clinical type 2 diabetes: the European prospective investigation of Cancer-Norfolk study. *Am J Epidemiol* 159(1): 73-82, 2004.
10. Swinburn BA, Metcalf PA, Ley SJ. Long-term (5-year) effects of a reduced-fat diet intervention in individuals with glucose intolerance. *Diabetes Care* 24(4): 619-24, 2001.
11. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344(18): 1343-50, 2001.
12. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346(6): 393-403, 2002.
13. Lindström J, Peltonen M, Eriksson JG, et al. Finnish Diabetes Prevention Study (DPS). Improved lifestyle and decreased diabetes risk over 13 years: long-term follow-up of the randomised Finnish Diabetes Prevention Study (DPS). *Diabetologia* 56(2): 284-93, 2013.
14. Tinker LF, Bonds DE, Margolis KL, et al. Women's Health Initiative. Low-fat dietary pattern and risk of treated diabetes mellitus in postmenopausal women: the Women's Health Initiative randomized controlled dietary modification trial. *Arch Intern Med* 168(14): 1500-11, 2008.
15. Pan A, Sun Q, Bernstein AM, et al. Changes in red meat consumption and subsequent risk of type 2 diabetes mellitus: three cohorts of US men and women. *JAMA Intern Med* 173(14): 1328-35, 2013.
16. Micha R, Michas G, Mozaffarian D. Unprocessed red and processed meats and risk of coronary artery disease and type 2 diabetes--an updated review of the evidence. *Curr Atheroscler Rep* 14(6): 515-24, 2012.
17. Drouin-Chartier JP, Brassard D, Tessier-Grenier M, et al. Systematic Review of the Association between Dairy Product Consumption and Risk of Cardiovascular-Related Clinical Outcomes. *Adv Nutr* 7(6): 1026-1040, 2016.

18. Guasch-Ferré M, Becerra-Tomás N, Ruiz-Canela M, et al. Total and subtypes of dietary fat intake and risk of type 2 diabetes mellitus in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) study. *Am J Clin Nutr* 105(3): 723-735, 2017.
19. Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, et al. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2(10): 810-8, 2014.
20. Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, et al. ARIC Study Investigators. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 78(1): 91-8, 2003.
21. Hodge AM, English DR, O'Dea K, et al. Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 86(1): 189-97, 2007.
22. Kröger J, Zietemann V, Enzenbach C, et al. Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, desaturase activity, and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Am J Clin Nutr* 93(1): 127-42, 2011.
23. Krachler B, Norberg M, Eriksson JW, et al. Fatty acid profile of the erythrocyte membrane preceding development of Type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18(7): 503-10, 2008.
24. Yakoob MY, Shi P, Willett WC, et al. Circulating Biomarkers of Dairy Fat and Risk of Incident Diabetes Mellitus Among Men and Women in the United States in Two Large Prospective Cohorts. *Circulation* 133(17): 1645-54, 2016.
25. Similä ME, Kontto JP, Valsta LM, et al. Carbohydrate substitution for fat or protein and risk of type 2 diabetes in male smokers. *Eur J Clin Nutr* 66(6): 716-21, 2012.
26. Song Y, Manson JE, Buring JE, et al. A prospective study of red meat consumption and type 2 diabetes in middle-aged and elderly women: the women's health study. *Diabetes Care* 27(9): 2108-15, 2004.
27. van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, et al. Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care* 25(3):417-24, 2002.
28. de Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 351: h3978, 2015.
29. Mozaffarian D, de Oliveira Otto MC, Lemaitre RN, et al. trans-Palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 97(4): 854-61, 2013.
30. Djoussé L, Gaziano JM, Buring JE, et al. Dietary omega-3 fatty acids and fish consumption and risk of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 93(1): 143-50, 2011.
31. Kaushik M, Mozaffarian D, Spiegelman D, et al. Long-chain omega-3 fatty acids, fish intake, and the risk of type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 90(3): 613-20, 2009.
32. Wallin A, Di Giuseppe D, Orsini N, et al. Fish consumption, dietary long-chain n-3 fatty acids, and risk of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 35(4): 918-29, 2012.
33. Wu JH, Micha R, Imamura F, et al. Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr* 107 Suppl 2: S214-27, 2012.
34. Schwingshackl L, Lampousi AM, Portillo MP, et al. Olive oil in the prevention and management of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies and intervention trials. *Nutr Diabetes* 7(4):e262, 2017.

35. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, et al; KANWU Study. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* 44(3): 312-9, 2001.
36. Imamura F, Sharp SJ, Koulman A, et al. A combination of plasma phospholipid fatty acids and its association with incidence of type 2 diabetes: The EPIC-InterAct case-cohort study. *PLoS Med* 14(10): e1002409, 2017.
37. Wheeler ML, Dunbar SA, Jaacks LM, et al. Macronutrients, food groups, and eating patterns in the management of diabetes: a systematic review of the literature, 2010. *Diabetes Care* 35(2): 434-45, 2012.
38. Ooi EM, Watts GF, Ng TW, et al. Effect of dietary Fatty acids on human lipoprotein metabolism: a comprehensive update. *Nutrients* 7(6): 4416-25, 2015.
39. Rivellese AA, Giacco R, Annuzzi G, et al. Effects of monounsaturated vs. saturated fat on postprandial lipemia and adipose tissue lipases in type 2 diabetes. *Clin Nutr* 27: 133–141, 2008.
40. Lasa A, Miranda J, Bulló M, et al. Comparative effect of two Mediterranean diets versus a low-fat diet on glycaemic control in individuals with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr* 68(7): 767-72, 2014.
41. Schwingshackl L, Strasser B, Hoffmann G. Effects of monounsaturated fatty acids on glycaemic control in patients with abnormal glucose metabolism: a systematic review and meta-analysis. *Ann Nutr Metab* 58(4): 290-6, 2011.
42. Qian F, Korat AA, Malik V, Hu FB. Metabolic Effects of Monounsaturated Fatty Acid-Enriched Diets Compared With Carbohydrate or Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Diets in Patients With Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Diabetes Care* 39(8): 1448-57, 2016.
43. Imamura F, Micha R, Wu JH, et al. Effects of saturated fat, polyunsaturated fat, monounsaturated fat, and carbohydrate on Glucose-Insulin Homeostasis: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled feeding trials. *PLoS Med* 13(7): e1002087, 2016.
44. Kien CL, Bunn JY, Stevens R, et al. Dietary intake of palmitate and oleate has broad impact on systemic and tissue lipid profiles in humans. *Am J Clin Nutr* 99(3): 436-45, 2014.
45. Hartweg J, Perera R, Montori V, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD003205, 2008.
46. Kurt A, Andican G, Siva ZO, et al. The effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on AGEs and sRAGE in type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Biochem* 72(4): 679-687, 2016.
47. Jovanovski E, Li D, Thanh Ho HV, et al. The effect of alpha-linolenic acid on glycemic control in individuals with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Medicine (Baltimore)* 96(21): e65, 2017.

6. EFFETTI SULLA COMPOSIZIONE CORPOREA

Frida Leonetti

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma Sapienza, Roma, Italia.

Messaggi chiave

- L'obesità è una condizione caratterizzata da eccessivo accumulo di grasso corporeo misurato attraverso l'indice di massa corporea che ne permette la classificazione in tre gradi. La sua incidenza sta notevolmente aumentando negli ultimi anni, ponendola come fattore di rischio per diverse patologie, soprattutto diabete mellito tipo 2. Per tale motivo si parla di "diabesità".
- Il tessuto adiposo gioca un ruolo cruciale nel metabolismo degli acidi grassi. Dalla sua lipolisi deriva la produzione di acidi grassi liberi (FFA), usati come fonte energetica in diversi organi fondamentali, come il cuore. Tale processo avviene in maniera differente nei diversi tipi di tessuto adiposo (grasso sottocutaneo superficiale e grasso viscerale, quest'ultimo associato ad un aumentato rischio CV).
- Esistono due principali tipi di FFA: saturi (SFA) e insaturi (monoinsaturi o MUFA e polinsaturi o PUFA). Essi influenzano in modo diverso il metabolismo lipidico. In particolare il consumo di SFA aumenta l'attività lipogenetica del fegato favorendo l'aumento di peso corporeo e l'accumulo di grasso viscerale. Il consumo di MCT (SFA a catena media) aumenta la termogenesi, il senso di sazietà e lo spostamento del grasso da depositi viscerali ad altri tipi di fat depots. Il consumo di PUFA nei vari studi presenti in letteratura ha fatto emergere dati contrastanti.
- Effetti degli FFA sul DM1: è stato visto che il consumo di n-3 PUFA è protettivo nei confronti dello sviluppo di autoimmunità associata al DM1, mentre il consumo di SFA e MUFA sono associati al rischio della sua insorgenza.
- Effetti degli FFA sul DM2: diversi studi hanno dimostrato che un ridotto consumo di SFA e un aumentato consumo di MUFA con la dieta determina una significativa riduzione della resistenza insulinica, meccanismo fisiopatologico che sta alla base dello sviluppo della patologia diabetica.

Introduzione

L'obesità è una condizione caratterizzata da un anormale ed eccessivo accumulo di grasso corporeo che può influire negativamente sullo stato di salute di un individuo e, di conseguenza, sull'aspettativa di vita (1).

Dal momento che la valutazione della massa grassa non è di facile attuazione, il grado di grasso corporeo viene di norma misurato attraverso l'indice di massa corporea (Body Mass Index o BMI= Kg/m^2) che ha consentito la seguente classificazione: normopeso quei soggetti con BMI compreso tra 18,5 e 24,9 Kg/m^2 ; sottopeso con BMI < 18,5 Kg/m^2 , sovrappeso con BMI ≥ 25 Kg/m^2 , obesi con BMI ≥ 30 Kg/m^2 . L'obesità a sua volta si divide in: I grado, con BMI compreso tra 30 e 34,9 Kg/m^2 , II grado tra 35 e 39,9 Kg/m^2 , III grado con BMI ≥ 40 Kg/m^2 . Negli Stati Uniti si inquadrano i soggetti

con BMI $\geq$ 50 kg/m² come “superobesi” e quelli con BMI $\geq$ 60 Kg/m² come “super-superobesi”. Si parla, inoltre, di obesità patologica riferendosi ai soggetti che presentano un’obesità di terzo grado e ai soggetti che, pur presentando una BMI $\geq$ 50 Kg/m², manifestano anche delle comorbidità associate che si possono definire delle vere e proprie complicanze dell'eccedenza ponderale. Tuttavia, è importante tener presente che dal valore di BMI $>$ 25 Kg/m² è stata rilevata un’aumentata morbilità per malattie metaboliche e cardiovascolari. L’incidenza e la prevalenza dell’obesità sono andate progressivamente aumentando negli ultimi anni, tanto da far parlare di “pandemia” dell’obesità. Secondo i dati forniti dall’Organizzazione mondiale della sanità (Oms), il numero di persone obese nel mondo è raddoppiato a partire dal 1980: nel 2014 oltre 1,9 miliardi di adulti erano in sovrappeso, tra cui oltre 600 milioni obesi. Secondo il rapporto Osserva salute 2016, che fa riferimento ai risultati dell’Indagine Multiscopo dell’Istat “Aspetti della vita quotidiana” emerge che, in Italia, nel 2015, più di un terzo della popolazione adulta (35,3%) è in sovrappeso, mentre una persona su dieci è obesa (9,8%); complessivamente, quindi il 45,1% dei soggetti di età $\geq$ 18 anni è in eccesso ponderale (2, 3). L’obesità è un fattore di rischio per una serie di condizioni e patologie croniche, come le malattie ischemiche del cuore, l’ictus, l’ipertensione arteriosa, le patologie respiratorie, le osteoartriti e alcuni tipi di cancro (corpo dell’utero, colon e mammella) e soprattutto il diabete di tipo 2. L’associazione del DM2 con l’obesità rende le sue implicazioni ancora più rilevanti. Il rischio relativo di sviluppare DM2 nei pazienti obesi è aumentato, infatti, di 6 volte negli uomini e di 12 volte nelle donne, tanto da rendere necessaria, da parte dell’Organizzazione Mondiale della Sanità, l’introduzione del concetto di “diabesità”. La diabesità rappresenta una pandemia dei nostri tempi con una prevalenza e un impatto socio-economico-sanitario destinato a crescere. Nel 2010 si stimava che i diabetici nella popolazione

adulta rappresentassero circa l'8,3%, dato che si proietta ad aumentare al 9,9% nel 2030. Inoltre, si stima che il 23% dei pazienti con obesità patologica sia anche affetto da DM2 (4).

Definizione e descrizione della composizione corporea

Per composizione corporea si intende la misurazione dei diversi componenti che costituiscono il corpo umano. Le componenti principali che si analizzano nella determinazione della composizione corporea sono:

- Massa magra (FFM o Fat Free Mass);
- Massa grassa (FM o Fat Mass);
- Acqua corporea totale (TBW), distinguibile in acqua intracellulare (ICW) ed extracellulare (ECW).

La FFM rappresenta circa l'88% della massa corporea maschile e l'85% di quella femminile. Dal punto di vista anatomico, la FFM è costituita da componente muscolare e componente scheletrica, che rappresentano rispettivamente il 45% e il 15% nell'uomo, 36% e 12% nella donna.

La FM, ossia la massa grassa, include tutti i lipidi estraibili dai tessuti corporei. Essa rappresenta in media il 15% della massa corporea totale nell'uomo e il 23% nella donna, e a sua volta, si divide in:

1. tessuto adiposo essenziale (necessario per diverse funzioni fisiologiche dell'organismo); 2. tessuto di deposito (a distribuzione variabile). La distribuzione del grasso di deposito può essere la seguente: sede centrale (addominale/viscerale), maggiormente presente nel sesso maschile, che si associa a un maggior rischio cardiovascolare CVD, oppure sede periferica, maggiormente presente nel sesso femminile, soprattutto dopo la menopausa.

La TBW (Total Body Water), infine, rappresenta mediamente il 60% della massa corporea; essa è sostanzialmente la componente prevalente principale della FFM. Il 60% circa dell'acqua corporea totale (TBW) si trova a livello intracellulare (ICW o Intra Cellular Water), mentre il restante 40% è

extracellulare (ECW o Extra Cellular Water). L'ICW, essendo il costituente principale della cellula, è altresì anche un indicatore della massa metabolicamente attiva dell'organismo e pertanto le sue modificazioni intervengono nella regolazione del metabolismo cellulare e delle funzioni corporee. L'ECW, invece, comprende l'acqua interstiziale (che rappresenta il 14% del peso corporeo), plasmatica (4% del peso corporeo), linfatica (1% del peso corporeo) e transcellulare (1% del peso corporeo).

La determinazione della composizione corporea può essere effettuata attraverso differenti metodiche:

- Tecniche antropometriche: BMI, circonferenza vita e fianchi;
- Tecniche fisiche: plicometria, bioimpedenziometria, densitometria per pesata idrostatica, TAC, MRI, DEXA.

Tessuto adiposo e acidi grassi liberi

Il tessuto adiposo gioca un ruolo dinamico e critico nel metabolismo degli acidi grassi. Gli adipociti che costituiscono il tessuto adiposo non sono tutti uguali. Essi si possono suddividere in due tipi:

1. *Adipocita uniloculare* o "adipocita tipo bianco": è una cellula di forma tondeggiante. Il citoplasma è quasi totalmente occupato da un'unica goccia lipidica priva di membrana che schiaccia il nucleo alla periferia della cellula e riduce il citoplasma a un anello. La membrana plasmatica presenta estroflessioni e invaginazioni il cui numero varia con l'attività funzionale dell'adipocita;
2. *Adipocita multiloculare* o "adipocita tipo bruno": è una cellula poligonale più piccola dell'uniloculare. Il citoplasma non contiene un'unica e voluminosa goccia lipidica, ma più gocce lipidiche distribuite e isolate nel citoplasma, per questa ragione il nucleo è in posizione centrale. I mitocondri sono più numerosi della varietà uniloculare e sono presenti

proteine termogeniche come la termogenina. Questa dotazione permette la dissipazione sotto forma di calore corporeo dell'energia provocata dall'ossidazione degli acidi grassi, a spese di una minor produzione di ATP.

Gli adipociti producono e secernono una vasta gamma di proteine e altre molecole come leptina, adiponectina, fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) e interleuchina-1 β (IL-1 β). Lo stoccaggio e la mobilitazione del grasso sono attività altamente coordinate che si verificano costantemente negli adipociti, non solo in risposta all'eccessiva introduzione di cibo. I Chilomicroni (derivati da grassi alimentari che non vengono immediatamente ossidati) sono immagazzinati principalmente nel tessuto adiposo come trigliceridi. La lipolisi del tessuto adiposo determina la produzione di acidi grassi liberi (FFA), a loro volta usati come combustibile per tessuti e organi che possono ossidarli (cuore, fegato e muscolo scheletrico) producendo grandi quantità di adenosina trifosfato (ATP). La lipolisi degli adipociti, che ha come risultato la liberazione di FFA, è potentemente regolata dall'insulina e dalle catecolamine. Questo processo avviene in modi diversi negli individui obesi e in quelli magri, a seconda della posizione anatomica del tessuto adiposo, comunemente indicata come "depositi di grasso" o "fat depots".

Anatomia del tessuto adiposo

I depositi di grasso possono essere raggruppati in modo funzionale e anatomico in: grasso corporeo inferiore, grasso sottocutaneo superiore e grasso viscerale / intra-addominale. Negli adulti con peso corporeo normale, la maggior parte del grasso corporeo totale è costituita da grasso sottocutaneo superiore e grasso corporeo inferiore. Il grasso corporeo inferiore è anatomicamente designato come adiposità sotto il legamento inguinale e la cresta iliaca posteriore superiore, e comprende anche il tessuto adiposo trovato tra i muscoli (noto come "marmorizzazione" o "marbling"). Anche se il grasso corporeo inferiore, in generale, non è

associato a un aumento del rischio cardiovascolare, l'incremento del marbling è legato ad anomalie metaboliche. Il grasso addominale si divide in sottocutaneo superficiale e profondo. Quest'ultimo è correlato con il grasso viscerale e con un numero maggiore di anomalie metaboliche. Il grasso viscerale e quello marmorizzato sono i principali markers ectopici della disfunzione adiposa (5-7).

Gli acidi grassi modificano la composizione corporea: come?

Il grasso alimentare è il macronutriente più ricco di energia, quindi, il suo consumo può influenzare l'equilibrio energetico e, di conseguenza, il peso corporeo, la composizione corporea e la quantità di grasso totale (8, 9). Anche se esso ha un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'obesità, l'effetto del tipo di grasso alimentare introdotto con la dieta sull'accumulo di grasso corporeo è diverso (10, 11). Diversi acidi grassi (FFA) possono variare il metabolismo verso una via di ossidazione o stoccaggio e quindi possono avere un effetto diverso sull'obesità (12, 13), anche influenzando sazietà e sensazione di appetito (14, 15).

Il consumo di FFA *saturi* a lunga catena (SFA) e trans-FFA, è collegato all'obesità e in particolare all'accumulo di grasso addominale (16, 17). Il consumo di FFA *insaturi*, sia FFA *polinsaturi* (PUFA) che *monoinsaturi* (MUFA), sono legati all'inibizione dell'appetito, all'aumento del dispendio energetico e del tasso di ossidazione del grasso, quindi, inducono effetti positivi sul grasso addominale e corporeo totale rispetto ai precedenti due tipi. Sebbene il grasso corporeo in eccesso possa essere per lo più modulato dal controllo dei fattori ambientali legati all'obesità, anche la predisposizione genetica gioca un ruolo fondamentale nel suo sviluppo (18, 19). I diversi tipi di FFA influenzano in modo diverso sia la funzione che il livello di espressione di geni relativi al metabolismo lipidico, e quindi sono in grado di modulare il rischio di sviluppare obesità. Un elevato consumo di SFA per lo più attiva i geni lipogenici, quindi aumenta l'attività lipogenetica del fegato e favorisce l'attivazione di geni che inducono la sintesi *de novo* di molecole coinvolte nella

lipogenesi. Al contrario, il consumo di PUFA e MUFA è correlato alla *downregulation* di geni correlati alla lipogenesi e all'*upregulation* di geni che si occupano dell'ossidazione, quindi inducono una riduzione, nel sangue, dei livelli di trigliceridi circolanti e una riduzione dei depositi di grasso.

Tipi di acidi grassi e loro effetti sulla composizione corporea

Le diete ipocaloriche non necessariamente inducono una riduzione della massa grassa di una specifica regione corporea. Fino a poco tempo fa, la principale raccomandazione dietetica per quanto riguarda la qualità del grasso da introdurre è stata quella di ridurre le quantità di SFA e aumentare l'introito di FFA insaturi. Ciò si è tradotto in consumi più elevati di PUFA omega-6 (n-6 PUFA), specialmente nelle diete occidentali.

I diversi tipi di grassi introdotti con la dieta inducono effetti specifici sul peso corporeo e sulla massa grassa come spiegato in precedenza (20-22).

Abbiamo visto come il consumo di SFA a lunga catena aumenti l'adiposità corporea e sposti l'accumulo di grasso verso depositi viscerali con conseguente aumento del BMI, rapporto vita-fianchi e massa grassa e relativo aumento del rischio CVD (23). Al contrario, il consumo di FFA a catena media (MCT), cioè SFA che contengono 8-12 atomi di carbonio, aumenta il dispendio energetico, la termogenesi, l'ossidazione dei grassi e il senso di sazietà; allo stesso tempo riduce l'accumulo di grasso. La spiegazione sta nelle ridotte dimensioni della catena di questi FFA rispetto a quelli a catena lunga. Questa caratteristica li rende più solubili e la maggior parte di essi può essere assorbito rapidamente senza necessità di esterificazione e incorporazione in chilomicroni, e rapidamente metabolizzati per la produzione di energia attraverso la β -ossidazione nel fegato. Queste differenze nell'assorbimento e nel metabolismo fanno degli MCT una fonte di energia veloce che potrebbe potenzialmente risultare positiva per la perdita di peso. Sebbene i risultati riguardo l'efficacia di MCT siano inconcludenti e la dose richiesta per controllare il peso corporeo non è stata ancora stabilita, diversi studi a breve e a lungo termine hanno mostrato un effetto

positivo di MCT sull'aumento del dispendio energetico che potrebbe quindi ridurre il peso corporeo e la deposizione di grasso. Le evidenze indicano anche che il consumo di MCT determina uno spostamento del tessuto adiposo totale dalla zona addominale ad altri "fat depots" specifici. Il consumo di PUFA con la dieta è associato alla presenza di adipociti di dimensioni più piccole. Tuttavia in letteratura è emersa qualche contraddizione sul consumo di n-3 e n-6 PUFA. Uno studio ha dimostrato che l'aggiunta di n-3 PUFA a una very low-calory diet facilita la perdita di peso in un gruppo di donne obese rispetto alla sola dieta; tuttavia, Munro e Garg hanno dimostrato un'assenza di effetto benefico dell'aggiunta di n-3 PUFA a una very low-calorie diet sia sulla perdita che sul mantenimento del peso. Crochemore et al. hanno dimostrato che l'assunzione di piccole dosi di n-3 PUFA possono avere maggiori effetti positivi sulla riduzione del peso corporeo e della circonferenza vita, rispetto a dosi più alte (1,5 g/die rispetto a 2.5 g/die per 30 giorni). Un altro studio ha messo in evidenza come la supplementazione di acido linoleico coniugato (n-6 PUFA) in quantità di 3 g/die a n-3 PUFA (3 g/die) riesca a prevenire la deposizione di grasso addominale, aumenti la quota di massa magra e i livelli di adiponectina, rispetto a un gruppo di controllo che assumeva 4,8 g/die di olio di palma e 1,2 g/die di olio di soia. Bjermo et al. hanno dimostrato che la sostituzione di SFA con n-6 PUFA nella dieta è correlata a benefici cardiovascolari ma non influenza il peso corporeo. Diete in cui il 10% dell'energia totale era costituita da PUFA non si sono rilevate migliori rispetto ad altre contenenti il 5%, nella perdita di peso o nella modulazione dei depositi di grasso addominale; tuttavia entrambe si sono dimostrate efficienti nella riduzione del peso corporeo e della massa grassa.

Effetto degli acidi grassi sul diabete mellito di tipo 1

Il diabete di tipo 1 (DM1) è una malattia autoimmune caratterizzata dalla distruzione delle cellule beta pancreatiche. Gli acidi grassi possono svolgere un ruolo nello sviluppo dell'autoimmunità

associata al diabete di tipo 1, possono modulare il sistema immunitario e le reazioni infiammatorie. Studi epidemiologici hanno evidenziato che l'assunzione di n-3 PUFA protegge dall'insorgenza di autoimmunità associata al DM1 (24-26). Al contrario, il consumo di acidi grassi saturi (SFA) e acidi grassi monoinsaturi (MUFA) sono stati associati al rischio d'insorgenza di autoimmunità associata al DM1. In uno studio finlandese condotto su bambini affetti da DM1 è emerso che alti livelli sierici di acidi grassi derivati dal latte di mucca sono associati ad un rischio più elevato di autoimmunità delle isole. Questo è in linea con l'associazione osservata tra consumo di grassi del latte e aumento del rischio di autoimmunità insulare. Durante la prima infanzia, infatti, il latte materno e gli alimenti per lattanti sono le principali fonti alimentari di acidi grassi e quindi il tipo di latte è probabilmente il determinante più importante dello stato degli acidi grassi. Il latte materno non è stato trovato associato con il rischio di autoimmunità delle isole beta pancreatiche in studi di coorte. D'altro canto, il consumo di latte vaccino durante l'infanzia è correlato ad aumento del rischio di DM1 in diverse serie di coorti prospettiche (27-29).

Effetto degli acidi grassi sul diabete mellito di tipo 2

L'insulino-resistenza, definita come un difetto nella capacità dell'insulina di far agire il glucosio sui tessuti target, precede lo sviluppo di diabete mellito tipo 2 (DM2). Questa condizione si può associare ad iperglicemia dovuta a insufficiente secrezione di insulina da parte delle cellule beta del pancreas. L'aumento del tessuto adiposo nei soggetti obesi determina un aumento del rilascio in circolo di FFA, ormoni, citochine proinfiammatorie, e tutta una serie di altri fattori che sono coinvolti nell'insulino-resistenza. Aumentati livelli di FFA in circolo causano insulino-resistenza e disfunzione beta-cellulare, e ciò li rende protagonisti del legame tra obesità e sviluppo di DM2. Diversi studi, come già detto in precedenza, hanno dimostrato che soggetti che hanno ridotto il consumo di SFA e aumentato quello di MUFA con la dieta, hanno avuto un significativo miglioramento della sensibilità insulinica (spiegando gli effetti benefici della dieta Mediterranea

sull'obesità e il DM2). La dieta Mediterranea è infatti caratterizzata da basso introito di SFA e alto introito di MUFA (acido oleico soprattutto). Capire i meccanismi molecolari responsabili degli effetti benefici dell'acido oleico potrebbe promuoverne l'utilizzo per la prevenzione del DM2 o per ritardarne l'insorgenza (30-32). Tra i diversi meccanismi studiati, interessante risulta essere la capacità dell'acido oleico di stimolare la secrezione di Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) da parte delle cellule L dell'intestino, stimolando così, in maniera indiretta, la secrezione insulinica. Altro dato interessante è rappresentato dalla capacità dell'acido oleico di impedire la riduzione dell'attività di AMPK (Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase) causata dall'acido palmitico. AMPK è un target terapeutico riconosciuto per DM2, in particolare della Metformina, e per questo si parla di "effetti simil-Metformina" di questo FFA. È verosimile pensare quindi, anche se non vi sono lavori specifici a riguardo nei pazienti diabetici, che questi effetti possano indirizzare a una riduzione dell'accumulo di grasso viscerale a favore della maggior deposizione di grasso sottocutaneo e comunque periferico, migliorando la sensibilità insulinica.

Conclusioni

È ormai comunemente accettato che la quantità totale di grassi introdotta con la dieta ha un impatto sull'insulino-sensibilità solo se supera il 37% dell'energia totale. Al di sotto di questo valore, un fattore critico dell'induzione dell'insulino-resistenza non è la quantità di grassi introdotta, ma la composizione degli acidi grassi assunti. Abbiamo visto come l'introduzione di diversi tipi di acidi grassi con la dieta possa influenzare la composizione corporea, in particolare la qualità dei "fat depots" (viscerale e sottocutaneo) e, indirettamente, il maggiore o minor rischio CV di un determinato soggetto. Ulteriori studi dovranno essere effettuati per indagare i meccanismi molecolari che sottendono gli effetti dei diversi tipi di FFA e sulla loro capacità di promuovere o prevenire lo sviluppo di patologie quali il diabete mellito.

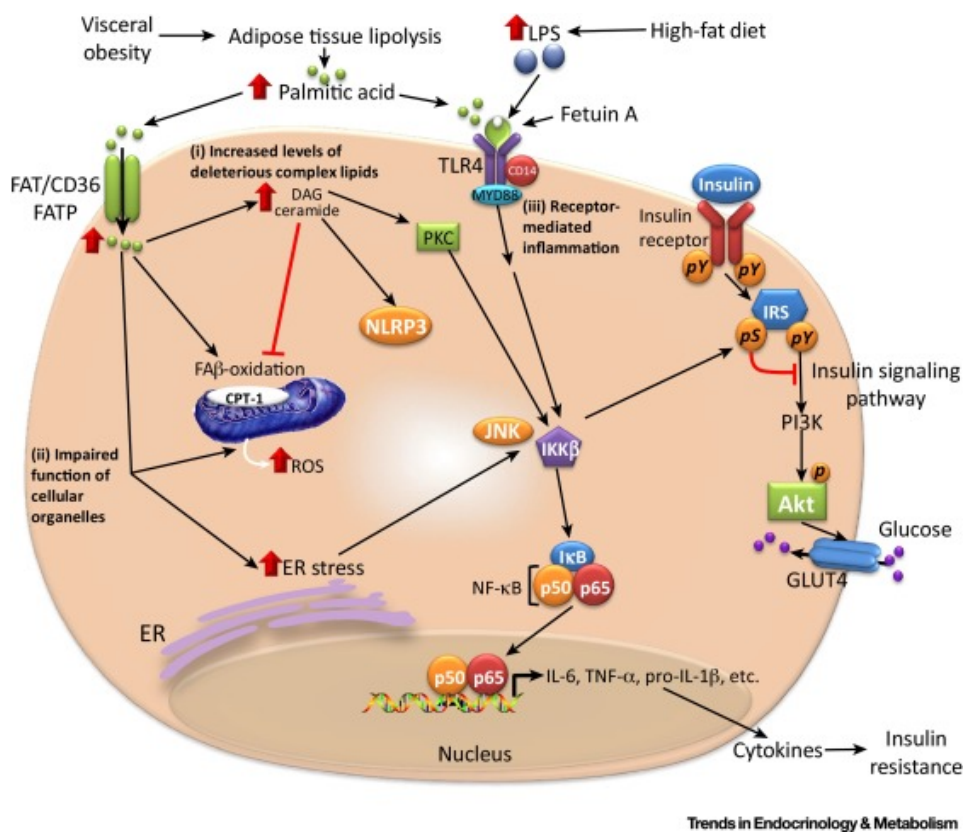


Fig 1: meccanismo dell'acido oleico nel migliorare la resistenza insulinica rispetto all'acido palmitico a livello cellulare

Referenze

1. (WHO, 2016) (Haslam & James, 2005).
2. Domenico Cucinotta, Italian Diabetes Monitor, Il management dell'obesità e del diabete di tipo 2; 2016.
3. www.salute.gov.it/portale/salute/p1_5.jsp?id=175&area=Malattie_endocrine_e_metaboliche.
4. IBDO Italian Barometer Report 2016.
5. Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, et al. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest* 83(4): 1168-73, 1989.
6. Bjorntorp P, Bergman H, Vamauskas E. Plasma free fatty acid turnover rate in obesity. *Acta Med Scand* 185(4): 351-6, 1969.
7. Bjorntorp P, Bergman H, Vamauskas E, et al. Lipid mobilization in relation to body composition in man. *Metabolism* 18(10): 840-51, 1969.
8. Hammad SS, Jones PJ. Dietary Fatty Acid Composition Modulates Obesity and Interacts with Obesity-Related Genes. *Lipids* 52(10): 803-822, 2017.
9. Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, Tebar FJ, et al. Relation between degree of obesity and site-specific adipose tissues fatty acid composition in a Mediterranean population. *Nutrition* 27(2): 170-6, 2011.
10. Ebbert JO, Jensen MD. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients* 5(2): 498-508, 2013.
11. Depres JP, Moorjani S, Lupien PJ, et al. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 10(4): 497-511, 1990.
12. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11 Suppl 1): S57-63, 2008.
13. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56(4):1010-3, 2007.
14. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav* 94(2): 206-18, 2008.
15. Tchoukalova YD, Koutsari C, Votruba SB, et al. Sex and depot dependent differences in adipogenesis in normal weight humans. *Obesity (Silver Spring)* 18(10): 1875-80, 2010.
16. Parry SA, Hodson L. Influence of dietary macronutrients on liver fat accumulation and metabolism. *J Investig Med* 65(8): 1102-1115, 2018.
17. Green JC, Hodson L. The influence of dietary fat on liver fat accumulation. *Nutrients* 6(11): 5018-33, 2014.
18. Houten SM, Wandres RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta oxidation. *J Inher Metab Dis* 33(5): 469-77, 2010.
19. Mitterndorfer B, Magkos F, Fabbrini E, et al. Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and woman. *Obesity (Silver Spring)* 17(10): 1872-7, 2009.
20. Jia Q, Xia Y, Zhang Q, et al. Dietary patterns are associated with prevalence of fatty liver disease in adults. *Eur J Clin Nutr* 69(8): 914-21, 2015.
21. Xiao C, Lewis GF. Regulation of chylomicron production in humans. *Biochim Biophys Acta* 1821(5): 736-46, 2012.
22. Nestel PJ, Havel RJ, Bezmal A. SITES OF INITIAL REMOVAL OF CHYLOMICRON TRIGLYCERIDE FATTY ACIDS FROM THE BLOOD. *J Clin Invest* 41(10): 1915-21, 1962.
23. Lillioja S, Bogardus C, Mott M, et al. Relationship between insulin mediated glucose disposal and lipid metabolism in man. *J Clin Invest* 75(4):1106-15, 1985.

24. Castro-Correia C, Sousa S, Norberto S, et al. The fatty acid profile in patients with newly diagnosed diabetes: why it could be unsuspected. *Int J Pediatr* 2017: 6424186, 2017.
25. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 3: S14-9, 2002.
26. Luo P, Wang MH. Eicosanoids, β -cell function, and diabetes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 95(1-4): 1-10, 2011.
27. Bi X, Li F, Liu S, et al. ω -3 polyunsaturated fatty acids ameliorate type 1 diabetes and autoimmunity. *J Clin Invest* 127(5): 1757-1771, 2017.
28. Wallberg M, Cooke A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol* 34(12): 583-91, 2013.
29. Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, et al. How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or β -cell suicide revisited. *Diabetes* 60(5): 1370-9, 2011.
30. Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, et al. Palmitic and Oleic Acid: the Yin and the Yang of fatty acids in type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab pii: S1043-2760(17)30170-4*, 2017.
31. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* 126(1): 12-22, 2016.
32. Martinez Gonzalez MA, Estruch R, Corella D, et al. Prevention of diabetes with Mediterranean diets. *Ann Intern Med* 161(2): 157-8, 2014.