

Effetti della restrizione calorica sullo stress ossidativo nell'obesità: sono miglioramenti transitori?

Andrea Bolner¹, Angiola Vanzo², Davide Giavarina³, Giampietro Nordera¹, Ottavio Bosello⁴

¹Centro Stress Ossidativo (CSOx), Vicenza

²Servizio di Igiene degli Alimenti e Nutrizione (SIAN), ULSS8 Berica, Vicenza

³Laboratorio Analisi Ospedale S. Bortolo, ULSS8 Berica, Vicenza

⁴Dipartimento di Medicina, Università di Verona

ABSTRACT

Effect of caloric restriction on oxidative stress in obesity: are these transient improvements?

Background: the effects of caloric restriction (CR) on oxidative stress in obesity has been previously studied using markers that not always were able to describe all the components of the oxidative-inflammatory picture.

Methods: in this study, the redox state of 20 obese was evaluated at baseline and after 30 and 60 days of CR using a complete panel of markers: the majority of them were determined using HPLC methods.

Results: before CR (V0), serum peroxides (dROMs) were very high, total antioxidant barrier (BAP) was at the lower limit of the reference interval and C-reactive protein (hsCRP) was increased; on the opposite, glutathione was well within the reference intervals in both total and reduced form. Despite the imbalance of the dROMs/BAP equilibrium, the markers of oxidative damage, such 3-nitrotyrosine (3NT) and 8-hydroxy-deoxyguanosine (8OHdG), index of a mild oxidative-inflammatory imbalance, were not particularly relevant.

After 30 days of CR (V30), in addition to the slight improvements of glucose, fructosamine and HOMA-IR, hsCRP was decreased, while BAP and total glutathione were increased, with consequent improvement of the oxidative stress-inflammatory balance (oxidative-inflammation). After 60 days of CR (V60) the improvements observed at V30 appeared to be slowing down for glucose and fructosamine, in slight inverse tendency for HOMA-IR and hsCRP, and decreasing for BAP and glutathione. The slight increase of inter-quartile range (IQR) of 3NT showed a lower counter-regulatory antioxidant response capacity, as if the ameliorative effects of CR in the first period had turned off.

Conclusion: the improvements of the oxidative-inflammatory equilibrium appear to be transient in the course of CR. The rearrangements of the gut microbiota during CR and the consequent epigenetic modulations could be responsible for this peculiar trend.

INTRODUZIONE

Numerosi studi hanno dimostrato che l'obesità è associata ad alterazioni dello stato infiammatorio e dell'equilibrio ossido-riduttivo, ovvero del bilanciamento fisiologico tra specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) e componenti della barriera antiossidante (1-7). Ipernutrizione ed elevato contenuto di carboidrati e grassi nella dieta, specialmente se saturi ed isomeri insaturi di tipo trans, possono infatti attivare vie metaboliche in grado di alterare l'omeostasi ed indurre stress ossidativo (8-10).

Lo squilibrio ossidativo sistemico e l'infiammazione subclinica, oltre che dell'obesità, sono condizioni tipiche anche delle malattie ad essa collegate, quali aterosclerosi, insulino-resistenza, diabete di tipo 2 e tumori, per le quali sono state indicate come cofattori patogenetici (11).

Secondo alcuni autori, la restrizione calorica (RC) e l'attività fisica, spesso utilizzate nell'obesità per ottenere calo ponderale e migliorare il quadro clinico, sarebbero efficaci proprio a motivo della loro capacità di contrastare l'alterazione dell'omeostasi ossidativa-infiammatoria (12-13). Pochi sono gli studi condotti in precedenza che

Corrispondenza a: Andrea Bolner, CSOx Vicenza, E-mail bolner.andrea@gmail.com

Ricevuto: 31.10.2019

Revisionato: 16.12.2019

Accettato: 09.01.2020

Pubblicato on-line: 6.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.016

hanno potuto caratterizzare adeguatamente gli elementi del quadro ossidativo-infiammatorio, ovvero le specie radicaliche, la barriera antiossidante endogena ed esogena ed i marcatori di infiammazione e di danno ossidativo (14).

Scopo di questo studio, pertanto, è stato quello di misurare con metodi ad elevata affidabilità analitica i marcatori dell'equilibrio ossidativo-infiammatorio in un gruppo di soggetti obesi sottoposti a RC e di valutare in quale misura la limitazione nutrizionale e l'attività fisica li avrebbero modificati nel corso di due mesi di osservazione. I soggetti in studio sono stati visitati prima dell'inizio del trattamento di RC e, successivamente, dopo 30 e 60 giorni. Ad ogni visita, oltre alle misure antropometriche ed agli indici plasmatici glicemici, lipidici ed infiammatori, sono stati misurati i perossidi totali (dROMs) e il potenziale biologico antiossidante (BAP). Inoltre, mediante HPLC, sono state eseguite le misure di glutazione totale e ridotto e dei marcatori specifici di danno ossidativo 3-nitrotirosina (3NT) e 8-idrossideossiguanosina (8OHdG). Soprattutto queste ultime misure sono state considerate cruciali per la valutazione degli effetti della RC in quanto la variazione del rapporto tra glutazione ridotto (GSH) e totale (GSH+GSSG) e la presenza dei marcatori di danno ossidativo 3NT e 8OHdG si sono già dimostrate in precedenza utili per descrivere l'alterazione dell'omeostasi, la sua tendenza al ripristino o all'eventuale aggravamento (15-16).

METODI

Pazienti

Sono stati arruolati 20 soggetti obesi (7 maschi e 13 femmine, di età compresa tra 26 e 65 anni) afferenti agli ambulatori nutrizionali del Servizio di Igiene degli Alimenti e Nutrizione (SIAN) di Vicenza. Il peso medio iniziale era di 97,1 (12,6) kg, la circonferenza vita di 110,0 (11,5) cm ed il body mass index (BMI) di 34,1 (7,3) kg/m². I criteri di arruolamento, oltre alla diagnosi di obesità, ammettevano alcune comorbidità tipiche: sindrome metabolica (n=5), patologie osteoarticolari (n=4) e cardiovascolari (n=5); erano invece escluse le patologie neoplastiche e neuropsichiatriche, i trattamenti antibiotici, l'assunzione di integratori alimentari e probiotici entro il mese precedente l'inizio dello studio, il consumo di bevande con contenuto di alcool superiore a 20 g/die e l'abuso di lassativi (oltre 2 volte/settimana). Alcuni dei soggetti in studio assumevano farmaci diuretici (n=1), antipertensivi (n=6), ipo-colesterolemizzanti (n=1), e tiroidei (n=2).

Dopo l'anamnesi e le valutazioni clinica ed antropometrica, alla visita basale (V0) è stata prescritta ai pazienti una dieta bilanciata definita secondo le linee guida 2003 dell'Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN) (17): rispetto all'apporto energetico totale, la dieta era composta dal 55% di carboidrati, di cui non più del 10% zuccheri semplici, 15% di proteine e 30% di lipidi; le fibre assunte sono state pari a circa 30 g/die. Per ottenere in

60 giorni l'obiettivo di un calo ponderale pari al 5% rispetto al peso iniziale, la RC è stata fissata inferiore di 500 kcal rispetto al fabbisogno calorico individuale.

Durante il trattamento, ai pazienti è stata prescritta un'attività fisica moderata consistente in almeno 30 minuti di cammino/die per 5 giorni in settimana, secondo le raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (18). Nel corso dello studio, approvato dal Comitato Etico per le Sperimentazioni Cliniche (CESC) di Vicenza, il personale del SIAN ha periodicamente verificato la compliance alla dieta e all'esercizio fisico, durante le visite mensili e mediante contatti telefonici settimanali.

Esami di laboratorio

Le raccolte dei campioni biologici (sangue ed urine) sono state eseguite il giorno precedente l'inizio del programma di RC (V0) e successivamente ripetute dopo 30 (V30) e 60 giorni (V60). I campioni di sangue sono stati raccolti in provette sottovuoto con EDTA, citrato di sodio o senza anticoagulante, secondo quanto richiesto dai singoli metodi analitici. Dopo il campionamento, le provette sono state immediatamente centrifugate a 3 500 rpm per 10 minuti a 4°C ed i campioni di plasma e siero sono stati congelati a -80°C fino all'analisi: con essi sono state stoccate anche aliquote delle seconde urine del mattino.

Le misure di glucosio, trigliceridi, colesterolo totale, HDL, LDL, fruttosamina, insulina, proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hsCRP) e creatinina urinaria sono state eseguite il giorno stesso della raccolta dei campioni con gli analizzatori AU 5800 e Dxl 800 (Beckman Coulter, Milano) e i reagenti ad essi dedicati, secondo le indicazioni del produttore. L'insulino-resistenza è stata calcolata mediante l'algoritmo Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance (HOMA-IR).

Gli esami del quadro ossidativo-infiammatorio sono stati condotti a fine studio su campioni conservati congelati a -80°C. Sono riportati in Tabella 1 gli esami eseguiti, il loro significato, i metodi di analisi utilizzati, il loro grado di imprecisione ed i relativi intervalli di riferimento (40).

Il GSH+GSSG e il GSH e la 3NT sono stati analizzati mediante HPLC utilizzando kit specifici (Eureka Lab Division, Chiaravalle, AN), mentre la 8OHdG è stata misurata con un metodo HPLC e rilevazione elettrochimica come precedentemente descritto (19).

Il sistema cromatografico, controllato da software Unipoint, era composto da due pompe Gilson (modello 306 e 307) e campionatore automatico (modello 234). Le colonne e le fasi mobili utilizzate erano quelle fornite nei kit, senza modifiche. Le misure del glutazione sono state effettuate con fluorimetro Jasco FL-1520, quelle di 3NT con spettrofotometro Jasco UV-875 e quelle di 8OHdG con rivelatore elettrochimico ESA Coulochem II e cella ad alta sensibilità 5 011.

La capacità ossidante del siero, intesa come contenuto totale di perossidi (dROMs), ed il potenziale

Tabella 1

Biomarcatori del quadro ossidativo-infiammatorio e loro significato: sono riportati i metodi di analisi utilizzati, le unità di misura e i rispettivi intervalli di riferimento (40).

Analita	Biomarcatore	Metodo	Precisione inter-saggio (CV%)	Unità di misura	Valori di riferimento
S-Perossidi totali circolanti (dROMs)	potenziale ossidante	colorimetrico	4,8	U carr	<300
S-Potenziale biologico antiossidante (BAP)	barriera antiossidante	colorimetrico	5,1	umol/L	>2200
Sg-Glutazione totale (GSH+GSSG)	barriera antiossidante	HPLC	2,3	umol/L	631-1251
Sg-Glutazione ridotto (GSH)	barriera antiossidante	HPLC	2,3	umol/L	523-1175
Rapporto Glutazione ridotto/totale	barriera antiossidante	calcolo	-	%	80-100
P-3-nitrotirosina (3NT)	ossidazione proteine	HPLC	3,1	ug/L	5-60
U-8-idrossi-deossiguanosina (8-OHdG)	ossidazione nucleobasi	HPLC	2,8	ug/g creat	12-82
S-Proteina C reattiva alta sensibilità (hsCRP)	infiammazione	nefelometria	6,2	mg/L	<1

biologico antiossidante, inteso come contenuto totale di specie antiossidanti (BAP), sono stati determinati con saggi colorimetrici specifici (Diacron, Grosseto), miniaturizzati per spettrofotometro Biohit ELX-800.

L'efficacia del trattamento di RC sul quadro ossidativo dei soggetti in studio è stata valutata in base agli andamenti ed alla significatività statistica delle variazioni dei marcatori di stress ossidativo rispetto al loro valore basale: sono stati considerati come "effetti positivi" gli incrementi di BAP e di glutazione totale, ridotto e rapporto ridotto/totale, e le diminuzioni di dROMS, 3NT e 8OHdG.

Analisi statistica

Per ciascun parametro sono stati calcolati media, deviazione standard, mediana e intervallo interquartile (IQR): a causa dell'evidente asimmetria nella distribuzione della maggior parte dei parametri, tutta la statistica descrittiva è stata riportata nel testo, per omogeneità, come mediana e IQR. Trattandosi di uno studio privo di gruppo di controllo, ciascun soggetto è stato considerato come controllo di sé stesso. I dati ottenuti sono stati valutati sia considerando l'andamento longitudinale degli scostamenti percentuali delle mediane ottenute alle visite V30 e V60 rispetto alla V0, sia mediante il confronto dei dati ottenuti per ciascun soggetto alle tre visite con test non parametrico di Friedman per misure ripetute; il limite di significatività è stato fissato al 5%.

RISULTATI

In condizioni basali, le mediane di tutti i biomarcatori del quadro ossidativo-infiammatorio rientravano negli intervalli di riferimento ad eccezione di hsCRP e dROMs (Tabelle 1 e 2); la mediana di questi ultimi era molto elevata mentre quella della barriera antiossidante BAP era al limite inferiore dell'intervallo. Entrambi i biomarcatori di danno ossidativo 3NT e 8OHdG erano invece nella norma. Dopo 60 giorni di RC, il calo ponderale dei soggetti in studio, pari al 2,3% rispetto al valore basale, è risultato statisticamente significativo e, con esso, anche le diminuzioni della circonferenza vita e del BMI. Nessun parametro biochimico invece, ad eccezione del solo colesterolo HDL, è variato in modo significativo nel corso delle tre visite.

Alla visita V30, le mediane di glucosio, fruttosamina, trigliceridi, hsCRP, GSH ed indice HOMA-IR erano univocamente in diminuzione rispetto a V0 (-4%, -3%, -17%, -27%, -7% e -10% rispettivamente), mentre BAP, dROMs e GSH+GSSG erano in aumento (+10%, +5% e +4%).

Alla successiva visita V60, gli andamenti tendenziali osservati nel primo mese apparivano in rallentamento rispetto a V30 per la fruttosamina (-0,3%) ed in tendenza inversa per glucosio (+2%), HOMA-IR (+7%) e hsCRP (+16%). Solo la mediana dei trigliceridi tendeva a un'ulteriore diminuzione (-6%). Anche BAP e GSH+GSSG erano in calo rispetto alla precedente visita (-5% e -7%) mentre le mediane dei marcatori di danno ossidativo 8OHdG e 3NT non mostravano tendenze tra

Tabella 2

Statistica descrittiva dei dati misurati prima dell'inizio (V0), dopo 30 (V30) e 60 giorni (V60) di Restrizione Calorica (RC); per ciascun parametro sono riportati i valori p ottenuti dal confronto dei dati ottenuti nelle tre visite, eseguito mediante test di Friedman per misure ripetute: sono evidenziate (*) le variazioni risultate significative.

	pre RC (V0)		dopo 30 giorni di RC (V30)		dopo 60 giorni di RC (V60)		p
	mediana	IQR	mediana	IQR	mediana	IQR	
Peso (kg)	97,1	12,6	94,7	14,8	94,9	18,6	0,044*
Circonferenza vita (cm)	110,0	11,5	108,0	12,0	103,3	11,9	0,021*
BMI (kg/m ²)	34,1	7,3	32,1	8,5	31,6	5,7	0,037*
Glucosio (mg/dL)	89,5	18,5	86,0	15,5	87,5	20,3	0,146
Fruttosamina (umol/L)	172,0	27,0	166,5	13,8	166,0	22,8	0,087
Insulina (mUI/L)	6,6	5,7	6,5	7,1	7,1	8,5	0,146
Colesterolo totale (mg/dL)	217,0	58,3	208,0	51,5	225,5	61,0	0,765
Trigliceridi (mg/dL)	114,5	84,3	95,0	58,0	89,5	76,8	0,211
Colesterolo HDL (mg/dL)	47,5	11,3	44,5	21,3	48,5	19,5	0,033*
Colesterolo LDL (mg/dL)	136,5	44,0	135,0	39,3	139,0	38,8	0,594
hsCRP (mg/L)	2,6	2,2	1,9	2,4	2,2	2,0	0,115
HOMA-IR	1,54	1,43	1,39	1,49	1,48	1,70	0,146
GSH+GSSG (umol/L)	842,5	117,8	872,4	197,0	812,2	243,2	0,411
GSH (umol/L)	816,5	152,7	757,3	223,5	767,2	127,8	0,486
GSH/GSH+GSSG (%)	95,5	9,0	90,1	22,7	94,6	13,7	0,801
BAP (umol/L)	2202,9	529,0	2421,8	487,2	2303,7	455,9	0,513
dROMs (U carr)	441,8	63,3	465,2	85,1	449,5	67,4	0,411
3NT (ug/L)	29,7	45,7	35,8	51,1	31,2	89,0	0,128
8OHdG (ug/g creat)	5,2	62,8	5,1	53,7	5,3	61,1	0,986

BMI, indice di massa corporea; hsCRP, proteina C reattiva ad alta sensibilità; HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance; GSH+GSSG, glutazione totale; GSH, glutazione ridotto; BAP, potenziale biologico antiossidante; dROMs, perossidi totali; 3NT, 3-nitrotirosina; 8OHdG, 8-idrossi-deossiguanosina; IQR, intervallo interquartile.

V0 e V60; l'IQR di 3NT, invece, è progressivamente aumentato a causa dell'elevazione delle concentrazioni di questo biomarcatore oltre il limite superiore dell'intervallo di riferimento in 6 soggetti, sia alla V30 che alla V60.

DISCUSSIONE

E' noto che lo stress ossidativo può essere una conseguenza ma anche un fattore in grado di indurre l'obesità (20). Infatti, l'aumentata produzione di ROS ed RNS può stimolare la deposizione di tessuto adiposo bianco (21) ed alterare l'assunzione di cibo (22); a sua volta, lo stesso accumulo di grasso può aumentare i

ROS ed alterare l'equilibrio ossidativo sistemico (23).

Altri fattori possono contribuire alla modificazione dell'omeostasi redox dell'obeso, quali l'alterata produzione post-prandiale di ROS (24), l'iperleptinemia (25), l'infiammazione cronica (26), la disfunzione tissutale (27) e la diminuzione della barriera antiossidante (28).

Era già stato osservato che il calo ponderale diminuiva i marcatori di ossidazione, aumentava le difese antiossidanti e migliorava i rischi metabolici e cardiovascolari associati all'obesità (29). Abbastanza frequentemente però, le osservazioni erano basate su misurazioni di pochi marcatori effettuate con metodi analitici non sempre affidabili (41). Alcuni studi hanno

dimostrato che la carbonilazione delle proteine, la perossidazione dei lipidi ed i marcatori d'infiammazione si riducevano dopo un periodo di RC (30-31) e che la combinazione di una dieta ipoenergetica con un'attività fisica regolare era in grado di potenziare gli effetti positivi sul bilancio ossidoriduttivo (32). Il nostro studio, pur ripercorrendo il disegno di altri precedenti, ha voluto caratterizzare il quadro redox in corso di RC con l'ausilio di un pannello di marcatori più completo che comprendesse sia elementi del comparto ossidante, che di quello riducente, sia marcatori dello stato infiammatorio che di danno ossidativo. Questi ultimi, in particolare, essendo ormai certo il ruolo fisiologico svolto da ROS e RNS nell'ambito della rete informativa intra-ed inter-cellulare (33-34), se misurati con metodi analitici ad elevata affidabilità, possono fornire indicazioni molto utili sulla reale condizione dell'equilibrio redox. Infatti, concentrazioni di radicali liberi oltre i limiti di normalità o una barriera antiossidante poco rappresentata possono non bastare ad evidenziare la presenza e l'entità dello sbilanciamento omeostatico; la comparsa dei marcatori di danno, invece, la può rendere manifesta.

A conferma di quanto riportato da altri autori, il nostro studio ha dimostrato che in condizioni basali (V0), i perossidi totali dROMs, che esprimono indirettamente i livelli sierici di ROS, erano molto elevati. Al contempo, la barriera totale BAP, che esprime la totalità delle difese antiossidanti endogene ed esogene, era al limite inferiore dell'intervallo di riferimento, insufficiente per contrastare in modo efficace livelli di ROS ed RNS tanto elevati. Poiché il glutatione, che è il principale costituente delle difese antiossidanti endogene, era discretamente rappresentato in quasi tutti i soggetti in studio, sia nella forma totale che in quella ridotta, si è ipotizzato che il maggior deficit della barriera dipendesse principalmente dalla sua componente esogena, di prevalente origine alimentare. Nonostante l'evidente sbilanciamento basale dell'equilibrio dROMs/BAP, alla V0 non erano comunque misurabili danni ossidativi. La 3NT infatti, marcatore di nitratura irreversibile dei residui aminoacidici delle catene proteiche, per quanto superiore alla mediana della popolazione di riferimento (35), non eccedeva il limite superiore dell'intervallo (40). Analogamente, la 8OHdG, marcatore di danno ossidativo delle nucleobasi puriniche, non evidenziava alterazioni a carico degli acidi nucleici. A motivo della presenza di bassi livelli dei marcatori di danno, è stato così possibile evidenziare che, nonostante gli aumentati livelli di dROMs e hsCRP nella popolazione in studio, il grado di compromissione dell'equilibrio ossido-riduttivo a livello basale era di grado lieve.

Pur in assenza di significatività statistica, motivata probabilmente dalla bassa numerosità del campione, dopo 30 giorni di RC comparivano segni di miglioramento del metabolismo del glucosio, con univoche diminuzioni della fruttosamina, dell'HOMA-IR e del livello di infiammazione sub-clinica, come evidenziato dal netto calo percentuale della mediana di hsCRP. Non erano evidenti, invece, particolari effetti sui parametri del metabolismo lipidico, fatto salvo per la

diminuzione del valore della mediana dei trigliceridi. La barriera antiossidante endogena è risultata in miglioramento, con aumenti sia di BAP che di GSH+GSSG. Poiché la barriera totale BAP ha mostrato miglioramenti percentualmente superiori rispetto a quelli del glutatione, è probabile che l'aumento sia stato sostenuto soprattutto dalla composizione della dieta che ha garantito un maggior introito antiossidante rispetto all'alimentazione abituale dei soggetti in studio. Gli effetti sui dROMs, invece, non sono apparsi evidenti, forse a motivo della brevità del periodo di osservazione e del loro considerevole livello iniziale. L'attivazione del meccanismo contro-regolatorio di contrasto dei radicali liberi era tuttavia evidenziata dalla diminuzione dei livelli di GSH conseguenti ad un suo probabile maggiore consumo.

Alla V60, dopo altri 30 giorni di RC, non si è osservato ulteriore calo ponderale nonostante la discreta compliance riscontrata. La variazione ponderale complessiva a fine studio è risultata comunque statisticamente significativa, per quanto inferiore rispetto all'obiettivo inizialmente prefissato. Tra V30 e V60, la maggior parte dei parametri del quadro glucidico, lipidico ed infiammatorio ha evidenziato andamenti di segno opposto, peggiorativo, rispetto al primo mese. Tra i biomarcatori del quadro ossidativo-infiammatorio, anche GSH+GSSG e BAP, hanno mostrato un'inversione di tendenza rispetto a V30, con decrementi cui corrispondevano solo lievi diminuzioni dei dROMs. La diminuzione della barriera antiossidante, tanto endogena quanto esogena, poteva essere spiegata, anche in questo caso, con un maggiore consumo delle molecole capaci di neutralizzare le specie radicaliche. Tuttavia, considerato costante l'apporto alimentare antiossidante a motivo del regime dietetico seguito dai soggetti in studio, si poteva ipotizzare che alla V60 si fosse prevalentemente verificata una diminuzione della componente endogena della barriera antiossidante, rappresentata nel nostro studio dal glutatione. Gli incrementi del marcatore di danno nitrosativo 3NT in alcuni pazienti, evidenziati dall'aumento dell'IQR, tendevano proprio a confermare una diminuita capacità di risposta contro-regolatoria nonostante la permanenza del regime di RC, quasi che gli effetti migliorativi del quadro ossidativo-infiammatorio osservati nel primo periodo si fossero spenti. È interessante a tal proposito ricordare i risultati di uno studio condotto da Ott et al. su un gruppo di donne obese sottoposte per un mese ad un regime di RC fortemente ipocalorica (800 kcal/die) e ad un successivo periodo di 2 settimane di dieta per il mantenimento del peso (36). Analogamente a quanto osservato nel nostro studio, dopo un'iniziale diminuzione dell'indice HOMA-IR e della hsCRP, nel corso delle settimane di mantenimento del peso, questi parametri sono tornati ad elevarsi, pur senza significatività statistica. Diversamente dai nostri dati, invece, nello studio di Ott erano significativi tanto i decrementi di colesterolo totale, HDL, LDL e trigliceridi nel periodo di RC quanto i loro successivi incrementi nel periodo di mantenimento. Poiché il microbiota dei soggetti in studio

non era significativamente cambiato durante la RC, Ott concludeva che la transitorietà degli effetti della dieta poteva essere attribuita al temporaneo miglioramento della permeabilità intestinale, come confermato dalle misure di zonulina prima e dopo ciascuno dei due programmi nutrizionali.

In un analogo studio precedente che comprendeva anche un gruppo di controllo e prevedeva periodi di trattamento maggiori, Heinsen et al. avevano misurato in un gruppo di obesi le variazioni del microbiota intestinale conseguenti alla RC (37). A differenza di Ott, Heinsen aveva dimostrato che la RC determinava significative variazioni nel microbiota, con miglioramenti dell'alterato rapporto Firmicutes/Bacteroidetes che però regredivano durante il periodo di mantenimento del peso con tendenza a ritornare al quadro microbico precedente alla RC.

E' interessante osservare che, pur nella diversità del disegno sperimentale e dei parametri misurati, anche nel nostro studio la RC si è dimostrata inizialmente efficace nell'introdurre elementi di miglioramento del quadro fisiopatologico dell'obesità, come del resto atteso sulle basi teoriche in precedenza ricordate. I parametri del metabolismo glucidico miglioravano e, con essi, anche alcuni marcatori dell'omeostasi ossidativa-infiammatoria: diminuiva infatti l'infiammazione e si potenziava la barriera antiossidante, tanto endogena quanto esogena. Tali effetti però, dopo il primo periodo, tendevano a regredire. Nei precedenti studi sopra citati, il fenomeno si era evidenziato dopo la sostituzione del programma di RC con quello di mantenimento del peso ed era correlato a regressioni della permeabilità intestinale (36) ed a rimodellamenti del microbiota intestinale (37). Nel nostro studio invece, la transitorietà degli effetti di miglioramento sui marcatori dell'equilibrio ossidativo-infiammatorio è apparsa evidente anche in assenza di variazioni del regime dietetico, particolarmente con diminuzioni della barriera antiossidante endogena.

Ipotizzando che i soggetti studiati abbiano osservato la RC tanto nella prima (V0-V30) quanto nella seconda fase dello studio (V30-V60), è al momento difficile spiegare la transitorietà degli effetti migliorativi del quadro ossidativo-infiammatorio. Considerati però i dati di Ott ed Heinsen, è suggestivo ipotizzare il coinvolgimento in questo fenomeno del microbiota intestinale. D'altra parte, l'esistenza di stretti legami tra alimentazione, microbiota ed epigenetica sono stati ripetutamente dimostrati. E' ben noto, infatti, che i geni influenzano la composizione del microbiota intestinale, che i geni microbici influenzano l'espressione dei geni umani, che il metabolismo di alcuni microbi intestinali influenza il metabolismo di altri microbi intestinali e che la dieta condiziona sia il microbiota che l'espressione dei geni umani (38-39). Pertanto, le diminuite produzioni di glutazione potrebbero conseguire a riarrangiamenti del microbiota ed a possibili conseguenti modulazioni epigenetiche dell'espressione degli enzimi di sintesi.

Se così fosse, poiché il peggioramento del quadro ossidativo-infiammatorio è intervenuto in corso di RC, si

potrebbe addirittura ipotizzare che il riarrangiamento del microbiota e la tendenza al ritorno allo stato originario non dipendano tanto dal mantenimento o meno della RC quanto, più semplicemente, dal tempo. Poiché questa è soltanto un'ipotesi, ulteriori approfondimenti si rendono oltremodo necessari.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Vanzo A, Bolner A, Nordera G, et al. Obesità, microbiota e stress ossidativo. *Biochimica Clinica* 2017;41:199-207.
2. Warolin J, Coenen KR, Kantor JL, et al. The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy black and white American youth. *Pediatr Obes* 2014;9:43-52.
3. Tran B, Oliver S, Rosa J, et al. Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: an overview of ten years of studies. *Exp Diabetes Res* 2012; doi:10.1155/2012/683680.
4. Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Boehm D, et al. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin Biochem* 2008;41:943-49.
5. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, et al. Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:237-43.
6. Hermsdorff HH, Barbosa KB, Volp AC, et al. Gender-specific relationships between plasma oxidized low-density lipoprotein cholesterol, total antioxidant capacity, and central adiposity indicators. *Eur J Prev Cardiol* 2012;doi:10.1177/2047487312472420.
7. Karouzene N, Merzouk H, Aribi M, et al. Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: a comparison of older with young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:792-99.
8. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005;135:969-72.
9. Dandona P, Ghanim H, Chaudhuri A, et al. Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. *Exp Mol Med* 2010;42:245-53.
10. Serra D, Mera P, Malandrino MI, et al. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal* 2012;doi:10.1089/ars.2012.4875.
11. Crujeiras AB, Díaz-Lagares A, Carreira MC, et al. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic Res* 2013;47:243-56.
12. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012;70:257-65.
13. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab* 2010;12:662-7.
14. Himbert C, Thompson H, Ulrich CM. Effects of intentional weight loss on markers of oxidative stress, DNA repair and telomere length: a systematic review. *Obes Facts* 2017;10:648-65.
15. Kato Y, Dozaki N, Nakamura T et al. Quantification of modified tyrosines in healthy and diabetic human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry.

- J Clin Biochem Nutr 2008;44:66-78.
16. Sies H. On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development. *Curr Opin Toxicol* 2018;7:122-26.
 17. Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN). Linee guida per una sana alimentazione italiana (INRAN) rev. 2003. http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?id=652_01/2020. (ultimo accesso: novembre 2019).
 18. World Health Organization. Global recommendations on physical activity for health. WHO, Geneva, 2010. <https://www.who.int/dietphysicalactivity/global-PA-recs-2010.pdf>, 01/2020. (ultimo accesso: novembre 2019).
 19. Bolner A, Pilleri M, De Riva V, et al. Plasmatic and urinary HPLC-ED determination of the ratio 8-OHdG/2-dG in Parkinson's disease. *Clinical Lab* 2011;57:859-66.
 20. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
 21. Lee H, Lee YJ, Choi H, et al. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* 2009;284:10601-9.
 22. Horvath TL, Andrews ZB, Diano S. Fuel utilization by hypothalamic neurons: Roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:78-87.
 23. Higuchi M, Dusting GJ, Peshavariya H, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and forkhead box o1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev* 2013;22:878-88.
 24. Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4476-79.
 25. Beltowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:168-78.
 26. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 2012;68:701-11.
 27. Serra D, Mera P, Malandrino MI, et al. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal* 2012;doi:10.1089/ars.2012.4875.
 28. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:590-7.
 29. Bigornia SJ, Mott MM, Hess DT, et al. Long-term successful weight loss improves vascular endothelial function in severely obese individuals. *Obesity* 2010;18:754-9.
 30. Solá E, Navarro S, Medina P, et al. Activated protein C levels in obesity and weight loss influence. *Thromb Res* 2009;123:697-700.
 31. Kuennen MR. Interaction between race and weight loss intervention strategy: Effect on markers of inflammation and fat distribution in overweight women. *Obesity* 2012;20:1335-6.
 32. Gutierrez-Lopez L, Garcia-Sanchez JR, Rincon-Viquez Mde J, et al. Hypocaloric diet and regular moderate aerobic exercise is an effective strategy to reduce anthropometric parameters and oxidative stress in obese patients. *Obes Facts* 2012;5:12-22.
 33. Rogers KL, Moorthy B. Role of reactive oxygen species (ROS) in health and disease: mechanisms, target organ toxicities, and biomarkers. *Curr Opin Toxicol* 2018;7:37-43.
 34. Gasparovic AC, Zarkovic N, Bottari SP. Biomarkers of nitro-oxidation and oxidative stress. *Current Opinion Toxicol* 2018;7:73-80,
 35. Bolner A, D'Andrea G, Bosello O, et al. Oxidative stress in chronic headaches: old and new markers. *OAMS* 2015;doi:10.5455/oams.231115.or.091.
 36. Ott B, Skurk T, Hastriter L, et al. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. *Sci Rep* 2017;7:11955. ,
 37. Heinsen FA, Fangmann D, Muller N, et al. Beneficial effects of a dietary weight loss intervention on human gut microbiome diversity and metabolism are not sustained during weight maintenance. *Obes Facts* 2016;9:379-91.
 38. Komaroff AL. The microbiome and risk for obesity and diabetes. *JAMA* 2016;22:E1-E2.
 39. Fabbiano S, Suarez-Zamorano N, Chevalier C, et al. Functional gut microbiota remodeling contributes to the caloric restriction-induced metabolic improvements. *Cell Metab* 2018;28:907-21.
 40. Bolner A, Micciolo R, Bosello O, et al. A panel of oxidative stress markers in Parkinson's disease. *Clin Lab* 2016;62:105-12.
 41. McMurray F, Patten DA, Harper ME. Reactive oxygen species and oxidative stress in obesity: recent findings and empirical approaches. *Obesity* 2016;24:2301-10.