

Department of Internal Medicine
Division of Geriatrics and Nutritional Sciences
Section of Applied Physiology

Relazione esperienza di ricerca alla Washington University di St. Louis per II trance
borsa di studio Associazione Alumni.

Borsista: Dott.ssa Beatrice Bertozzi

Durata: Febbraio 2014- ad oggi

Durante questi mesi ho avuto la possibilita' di lavorare presso la Washington University di St.Louis nel team di ricerca del Dott. Luigi Fontana, come nutrizionista. Questa opportunita' mi ha dato modo di addentrarmi nel campo della ricerca cosi' da conoscere questo "mondo" e apprezzarne i vari aspetti. L'obiettivo principale di tale ricerca e' lo studio e l'utilizzo della nutrizione come strumento di prevenzione delle malattie correlate all'invecchiamento. Il filo conduttore dei trials clinici a cui sto lavorando e' quello della *Calorie Restriction (CR)*.

Studi sui topi di laboratorio hanno dimostrato che la CR con un adeguato apporto di vitamine e minerali ha potenti effetti protettivi contro le piu' comuni malattie croniche associate all'invecchiamento^{1, 2}. Risultati precedenti ottenuti da studi eseguiti qui alla Washigthon University di st.Louis hanno dimostrato che gli esseri umani che praticano CR beneficiano della maggior parte degli adattamenti che si verificano in animali da laboratorio. Tra questi la riduzione di livelli di infiammazione cronica e di diversi ormoni, tra cui l'insulina, leptina, T3, il testosterone, e l' estrogeno³. Soggetti di mezza eta' e anziani che praticato CR sono fisiologicamente piu' giovani della loro eta' cronologica, considerando varie misure di funzionalita' cardiovascolare^{2,3}. Risultano inoltre fortemente protetti contro l'arteriosclerosi, diabete e ipertensione.

Sebbene quindi sia chiaro che la CR abbia grandi benefici per la salute negli esseri umani, e' comunque vero che risulta troppo difficile da praticare per poter essere considerata fattibile a lungo termine per la stragrande maggioranza delle persone.

Fino a poco tempo fa la CR cronica era l'unico intervento scientificamente dimostrato capace di rallentare l'invecchiamento e che avesse un ruolo nella protezione contro le malattie croniche negli animali da laboratorio^{1, 2}. Tuttavia, alcune scoperte recenti suggeriscono fortemente che il digiuno intermittente (IF) ha

Department of Internal Medicine
Division of Geriatrics and Nutritional Sciences
Section of Applied Physiology

effetto negli animali da laboratorio nell' aumenta la durata della vita massima (lifespan) e ancora piu' importante, si e' dimostrato allunghi il periodo di vita in salute (health span) di questi animali⁴. L'effetto dell'IF nei roditori dipende dall'eta' in cui gli animali iniziano il digiuno e dalla loro specie, comunque i dati dimostrano un aumento della lifespan fino all' 80%⁵. Inoltre, il digiuno due volte a settimana per 24 ore durante tutta la vita adulta dimostra un significativo aumento della durata della vita in altre specie di animali da laboratorio⁶. L'ipotesi formulata sui dati ad oggi ottenuti e' che, l'IF inneschi risposte cellulari e molecolari di adattamento che aumentano la sensibilita' all'insulina, riducono il danno ossidativo e l'infiammazione, ottimizzano il metabolismo energetico e rafforzano la resistenza allo stress⁴. Inoltre, in ratti non obesi e' stato dimostrato che IF protegge contro il diabete, tumori, malattie cardiache e neurodegenerative^{4,7}.

Per quanto riguarda l'uomo, Il digiuno e' stato ed e' tuttora praticato in modo sicuro in tutto il mondo in diversi rituali religiosi (cristiani, ebrei, indu e buddisti tradizionalmente digiunano in designati giorni dell'anno). Tuttavia, poco si sa sugli effetti dell'IF e del suo ruolo di prevenzione sulla salute dell'uomo.

Partendo da questi presupposti quindi gli studi clinici a cui sto lavorando sono volti a studiare la fattibilita' e l'impatto metabolico e molecolare del digiuno intermittente come pratica alternativa alla CR.

1. Intermittent Fasting (IF) Study

Trial clinico randomizzato il suo scopo e' studiare gli effetti del digiuno Intermittente sull'uomo. La durata dello studio per ogni singolo partecipante e' di 1 anno. Per la raccolta dei dati sono stati effettuati al Baseline, 6 mesi e a 12 mesi test antropometrici, metabolici, cardiovascolari e molecolari. L'obiettivo principale e' valutare se IF sia in grado di ridurre i livelli di infiammazione cronica, monitorando la riduzione della proteina C-reattiva (hsCRP) quale principale outcome di riferimento. L'obiettivo secondario dello studio e' quello di valutare se l'IF riproduca gli effetti metabolici, molecolari e cardiovascolari della Restrizione Calorica, attraverso il monitoraggio del peso e della composizione corporea, la misurazione di parametri ormonali (insulina, IGF-1, IGFBP-3, testosterone, estradiolo, sex hormone binding globulin (SHBG), TSH, T3, leptina, adiponectina), e markers dello stress ossidativo, cosi' come del profilo lipidico, della tolleranza al glucosio e della pressione ematica.

Department of Internal Medicine
Division of Geriatrics and Nutritional Sciences
Section of Applied Physiology

In base al valore di BMI (Body Mass Index) e' stato chiesto ai partecipanti di digiunare 3 giorni non consecutivi a settimana (BMI > 28 kg/m²) o 2 giorni non consecutivi a settimana (BMI tra 25 e 27.9 kg/m²). E' previsto, all'inizio dell'intervento, un primo meeting di counseling nutrizionale durante il quale viene spiegato l'IF e insegnato ai partecipanti cosa e' possibile mangiare durante una giornata di digiuno. E' fornita inoltre, ad ogni partecipante, una bilancia per il peso corporeo che e' misurato settimanalmente. Come nutrizionista, lavoro in stretto contatto con ogni paziente, controllando l'andamento della perdita di peso e rispondendo ad eventuali dubbi e domande. E' il mio ruolo sostenere il paziente durante questa fase di life style change incoraggiando la preparazione di ricette sane e provvedendo a informazioni nutrizionali. Durante un giorno di digiuno intermittente, e' chiesto ai partecipanti di saltare la prima colazione, pranzo, cena, snack e qualunque bevande a contenuto calorico. Possono essere consumate pero' verdure non amidacee a volonta', cotte e/o crude, sottoforma di insalata, zuppe, pinzimonio, grigliate...non e' previsto un limite alla quantita' di verdure che possono essere consumate mentre si e' chiesto di controllare il condimento, usando fino a 2 cucchiaini di olio extra vergine di oliva al giorno.

Risultati Preliminari:

Il numero di pazienti previsti dal protocollo dello studio (n.50) e' stato arruolato e randomizzato. Ad oggi pero' solo un piccolo numero di partecipanti ha completato l'anno di intervento. Pertanto i dati di seguito presentati mostrano gli effetti del digiuno intermittente tra il gruppo di intervento (IF) e di controllo dopo 6 mesi dal baseline test (BL).

I risultati fino ad ora ottenuti, dimostrando gli effetti positivi dell'IF sull'uomo, sono senza dubbio soddisfacenti e promettenti. Risultati dopo 12 mesi di intervento saranno necessari per confrontare gli effetti dell'IF dopo 1 anno rispetto ai 6 mesi e per valutare se l'IF possa essere considerato un intervento fattibile a lungo termine per l'uomo.



Department of Internal Medicine
 Division of Geriatrics and Nutritional Sciences
 Section of Applied Physiology

	IF (n=13)	Controls (n=14)	Among-group p*
Age, ys	51.4 (8.7)	50.5 (7.4)	0.36
Males (%)	41.7	33	0.66
Ht, cm	170.67 (9.78)	172.67 (11.00)	0.63
Wt, Kg			
BL	81.08 (11.06)	90.67 (13.71)	0.06
6 mo FU	76.25 (13.18)	91.67 (15.18)	0.01
Change	-4.83 (3.90)	1.00 (3.44)	<0.0001
Within-group P	0.001	0.28	
BMI, Kg/m²			
BL	27.25 (2.01)	29.87 (2.75)	0.01
6 mo FU	25.58 (2.54)	30.07 (3.49)	0.01
Change	-1.67 (1.37)	0.20 (1.32)	0.001
Within-group P	0.001	0.57	
Waist, cm			
BL	99.92 (7.00)	103.13 (10.45)	0.37
6 mo FU	89.67 (11.11)	104.13 (10.22)	0.02
Change	-10.25 (7.84)	1.00 (7.58)	0.001
Within-group P	0.001	0.62	
FM, g			
BL	29998 (3650.38)	35748.13 (7003.29)	0.02
6 mo FU	25905.92 (4391.08)	37043.87 (8782.03)	<0.0001



Department of Internal Medicine
 Division of Geriatrics and Nutritional Sciences
 Section of Applied Physiology

Change	-4092.16 (2984.98)	1295.73 (3637.62)	<0.0001
Within-group P	0.19	0.001	
TOTRegionFat%			
BL	36.75 (6.38)	39.40 (6.46)	0.30
6 mo FU	34.00 (5.59)	40.13 (7.07)	0.02
Change	-2.75 (2.63)	0.73 (2.49)	0.002
Within-group P	0.27	0.004	
TOTTissueFat%			
BL	38.00 (6.40)	40.67 (6.42)	0.29
6 mo FU	35.00 (5.59)	41.40 (7.12)	0.02
Change	-3.00 (2.63)	0.733 (2.52)	0.001
Within-group P	0.002	0.28	
Mean SBP, mmHg			
BL	125.17 (15.95)	119.33 (14.14)	0.32
6 mo FU	115.67 (13.49)	119.00 (13.57)	0.53
Change	-9.50 (10.97)	-0.33 (10.77)	0.04
Within-group P	0.01	0.91	
Mean DBP, mmHg			
BL	79.33 (10.39)	77.33 (8.39)	0.59
6 mo FU	73.25 (9.08)	76.60 (7.77)	0.32
Change	-6.08 (8.16)	-0.73 (6.33)	0.07
Within-group P	0.03	0.66	
	IF	Controls	Among-group p*
	(n=13)	(n=14)	
Glucose, mg/dl			



Department of Internal Medicine
 Division of Geriatrics and Nutritional Sciences
 Section of Applied Physiology

BL	94.00 (11.27)	94.47 (11.36)	0.92
6 mo FU	91.33 (9.413)	93.00 (8.05)	0.62
Change	-2.67 (7.88)	-1.47 (10.75)	0.75
Within-group P	0.27	0.61	
<hr/>			
TChol, mg/dl			
BL	191.25 (29.29)	177.13 (16.92)	0.13
6 mo FU	182.00 (27.67)	187.93 (21.90)	0.54
Change	-9.25 (16.68)	10.80 (19.98)	0.01
Within-group P	0.08	0.06	
<hr/>			
TG, mg/dl			
BL	122.83 (64.81)	124.87 (53.71)	0.93
6 mo FU	100.00 (67.94)	137.60 (61.89)	0.15
Change	-22.83 (57.65)	12.733 (32.16)	0.05
Within-group P	0.20	0.15	
<hr/>			
HDL, mg/dl			
BL	60.17 (26.94)	46.93 (8.64)	0.08
6 mo FU	62.42 (22.43)	48.60 (8.31)	0.04
Change	2.25 (10.45)	1.67 (4.37)	0.85
Within-group P	0.47	0.16	
<hr/>			
LDL, mg/dl			
BL	106.67 (28.54)	105.20 (14.94)	0.87
6 mo FU	99.50 (26.83)	111.93 (19.07)	0.17
Change	-7.17 (10.91)	6.73 (17.54)	0.02
Within-group P	0.04	0.16	
<hr/>			



Department of Internal Medicine
Division of Geriatrics and Nutritional Sciences
Section of Applied Physiology

YSI 0', mg/dl			
BL	95.17 (9.62)	97.67 (10.43)	0.53
6 mo FU	94.64 (10.15)	97.53 (7.71)	0.42
Change	-0.27 (9.82)	-0.13 (9.21)	0.97
Within-group P	0.93	0.96	

YSI 30', mg/dl			
BL	152.00 (18.26)	140.33 (24.59)	0.18
6 mo FU	152.09 (12.90)	135.53 (20.72)	0.03
Change	0.18 (17.25)	-4.8 (21.81)	0.54
Within-group P	0.97	0.41	

YSI 60', mg/dl			
BL	154.33 (27.54)	130.93 (39.37)	0.09
6 mo FU	155.91 (31.34)	135.67 (29.62)	0.11
Change	2.09 (31.62)	4.73 (30.22)	0.83
Within-group P	0.83	0.55	

YSI 90', mg/dl			
BL	139.83 (28.60)	121.20 (36.61)	0.16
6 mo FU	129.36 (18.07)	119.80 (26.68)	0.32
Change	-10.27 (28.58)	-1.4 (28.38)	0.44
Within-group P	0.26	0.85	

YSI 120', mg/dl			
BL	117.33 (26.15)	109.47 (27.35)	0.46
6 mo FU	118.73 (17.12)	110.87 (23.39)	0.36
Change	1.36 (20.34)	1.40 (19.59)	0.81
Within-group P	0.60	0.79	

Department of Internal Medicine
Division of Geriatrics and Nutritional Sciences
Section of Applied Physiology

2. IF and Mediterranean Diet Study

Trial clinico randomizzato il cui scopo è determinare gli effetti del digiuno intermittente a prescindere dalla qualità della dieta. Infatti questo studio associa all'IF due diete qualitativamente diverse, quali le così definite, *Mediterranean diet* e *Western diet*. L'outcome primario dello studio è quindi, determinare se IF, indipendentemente dalla qualità della dieta, riduce il livello di infiammazione cronica. A tale scopo, la proteina C-reattiva (hsCRP) è utilizzata come marker di riferimento. L'obiettivo secondario dello studio è quello di valutare se l'IF, indipendentemente dalla qualità della dieta, riproduca gli effetti metabolici, molecolari e cardiovascolari della Restrizione Calorica, attraverso il monitoraggio del peso e della composizione corporea, la misurazione di parametri ormonali (insulina, IGF-1, IGFBP-3, testosterone, estradiolo, sex hormone binding globulin (SHBG), TSH, T3, leptina, adiponectina), e markers dello stress ossidativo, così come del profilo lipidico, della tolleranza al glucosio e della pressione ematica. È previsto anche un test molecolare tramite lo studio genetico di biopsie muscolari del colon.

Lo studio clinico è iniziato da pochi mesi. Si prevede di arruolare n.40 pazienti i quali saranno assegnati tramite randomizzazione ad uno dei seguenti interventi: (1) Mediterranean Diet group, a cui verrà servita la dieta Mediterranea per 8 settimane, che continuerà ad essere consumata per ulteriori 8 settimane con l'aggiunta del IF due giorni a settimana. (2) control group, al quale è chiesto di seguire le usuali abitudini alimentari (Western diet) per 8 settimane; successivamente il gruppo di controllo continuerà a seguire la Western diet con l'aggiunta dell'IF due giorni a settimana per 8 settimane.

Il trial clinico è iniziato da pochi mesi, e solo 4 partecipanti hanno terminato le 16 settimane di intervento previste dal protocollo. Sarà pertanto possibile ottenere i primi risultati concreti quando almeno la metà dei partecipanti avrà concluso il periodo di studio.

St.Louis, 2 Giugno 2015

Dott.ssa Beatrice Bertozzi

Department of Internal Medicine
Division of Geriatrics and Nutritional Sciences
Section of Applied Physiology

Bibliografia

1. Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 126: 913-922, 2005.
2. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*. 2010; 328(5976):321-6.
3. Fontana L, Klein S. Aging, adiposity, and calorie restriction. *JAMA*. 2007;297(9):986-94.
4. Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:7-13.
5. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider NL Effects of intermittent feeding upon growth and life span in rats. *Gerontology* 1982;28:233-241.
6. Kendrick DC. The effects of infantile stimulation and intermittent fasting and feeding on life span in the black-hooded rat. *Dev. Psychobiol*. 1973;6:225-234.
7. Stranahan AM, Mattson MP. Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13:209-216.