

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E  
TECNOLOGIE ALIMENTARI

**Dieta di sostituzione con alimenti a base di grano khorasan  
KAMUT® in pazienti affetti da diabete di tipo 2:  
Valutazione dell'effetto sull'espressione genica in campioni  
di sangue intero**

Tesi di laurea in  
**Nutrizione umana**

Relatore  
Prof.ssa Alessandra Bordoni

Correlatore  
Dott.ssa Francesca Danesi

Presentata da  
Giulia Ragazzini

Sessione II  
Anno Accademico 2016-2017



*Ai miei genitori,  
Daniela e Angelo*



## Sommario

1. I cereali antichi .....	7
1.1 Origine e diffusione.....	7
1.2 Aspetti botanici e filogenetici .....	9
1.2.1 Ciclo vegetativo e morfologia .....	11
1.2.2 Esigenze ambientali e tecniche colturali .....	13
1.3 Composizione e aspetti nutrizionali .....	15
1.3.1 Macronutrienti .....	16
1.3.2 Micronutrienti.....	19
1.3.3 Componenti fitochimici.....	20
1.3.4 Studi in vitro e in vivo sulle proprietà salutistiche .....	22
1.4 Il Grano khorasan KAMUT® .....	23
1.4.1 Origine e diffusione.....	24
1.4.2 Aspetti tecnologici del KAMUT® .....	26
1.4.3 Aspetti nutrizionali.....	27
1.4.4 Studi in vitro e nell'animale da esperimento.....	29
1.4.5 Studi sull'uomo .....	30
2. Diabete mellito .....	32
2.1 Epidemiologia .....	33
2.2 Attività insulinica .....	33
2.2.1 Sintesi e secrezione di insulina.....	34
2.2.2 Segnale insulinico e trasporto dei nutrienti .....	36
2.3 Il diabete mellito di tipo 2 .....	39
2.3.1 Meccanismo dell'insulino-resistenza (IR) .....	40
2.3.2 Sviluppo e progressione del T2DM .....	42
3. Scopo della tesi.....	44
4. Metodi .....	47
4.1 Frumenti utilizzati per la preparazione dei prodotti testati nella sperimentazione clinica..	47
4.2 Reclutamento dei pazienti .....	48
4.3 Disegno sperimentale .....	49
4.4 Analisi dell'espressione genica .....	50
4.4.1 Estrazione e purificazione di RNA da sangue intero di pazienti con T2DM.....	50
4.4.2 Quantificazione dell'RNA totale.....	52

4.4.3 Retrotrascrizione .....	53
4.4.4 Real-time PCR (qPCR) .....	54
4.4.5 Analisi statistica .....	57
5. Risultati e discussione .....	58
Bibliografia.....	70

# ***1. I cereali antichi***

I cereali, tra le colture ad uso alimentare, rappresentano un gruppo tra i più importanti nell'economia agricola mondiale poiché svolgono un ruolo fondamentale sia nell'alimentazione umana, con la produzione di cariossidi amidacee da cui si ottengono farine utilizzate in numerose preparazioni alimentari, che in quella animale essendo utilizzati come foraggio e granella.

Il termine cereale deriva da Cerere, la dea romana delle messi e del pane che rendeva la terra fertile ed era perciò connessa con la crescita dei cereali.

I **cereali antichi** hanno origine 10-12.000 anni fa ed hanno favorito lo sviluppo delle prime civiltà. In particolare, l'orzo e il farro monococco fungevano da sostentamento per le popolazioni terrestri primordiali.

Si contano circa 10.000 specie di cereali e quasi tutte appartenenti alla famiglia delle *Graminaceae* (o *Poaceae*), ma solo 30 di queste nutrono la popolazione mondiale. Tra le più diffuse ed antiche vi sono riso (*Oryza sativa*), frumento duro e tenero (*Triticum aestivum* spp. *Aestivum*, *Triticum durum*), mais (*Zea mays*), ed in misura minore, orzo (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), segale (*Secale cereale*), miglio (per esempio *Pennisetum glaucum*, *Setaria italica*, *Panicum miliaceum*, *Eleusine coracana*), panico, farro, sorgo (*Sorghum bicolor*).

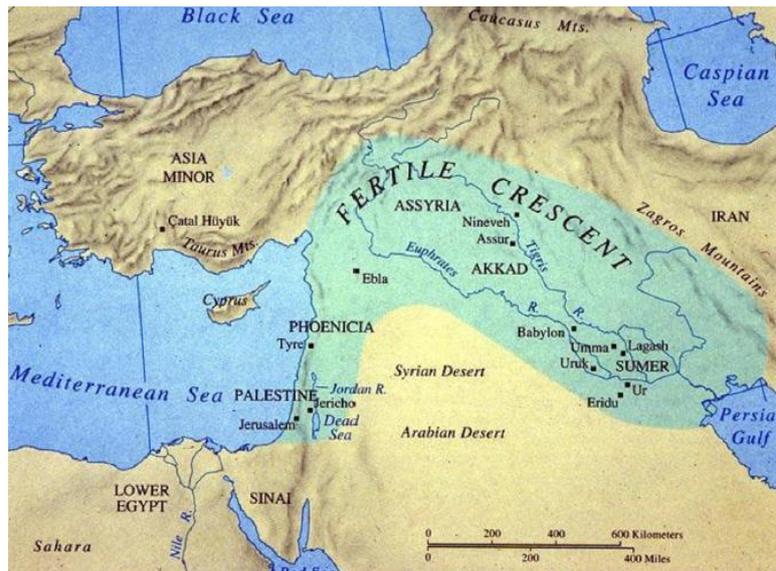
## **1.1 Origine e diffusione**

Nel Paleolitico, l'uomo è vissuto cacciando e raccogliendo frutti e radici selvatiche; solo circa 10.000 anni fa diede avvio alle pratiche di coltivazione delle piante addomesticando quelle che gli servivano come sostentamento, dando inizio di fatto all'agricoltura (Viggiani, 2007). Determinante per la nascita dell'agricoltura è stata la presenza di specie spontanee, soprattutto graminacee ma anche leguminose, che dopo essere state addomesticate rappresentarono una fonte importante di proteine grazie alla loro complementarietà, in quanto sia cereali che legumi sono carenti di alcuni amminoacidi essenziali (i cereali di lisina e treonina, i legumi di cisteina e metionina), mentre la loro combinazione è in grado di fornirli in modo adeguato. Inoltre il grano è semplice da coltivare, particolarmente su larga scala e può essere conservato dopo raccolta.

Tra i grani antichi, il frumento conserva il maggior numero di capostipiti, che appartengono principalmente ai generi *Triticum* e *Aegilops*. Grazie alla capacità di autoimpollinazione, il frumento è stato facilitato nella selezione di varietà distinte; il frumento einkorn (*T. monococcum* spp. *monococcum*, farro piccolo o grano monococco), il frumento emmer (farro medio o grano dicocco) e la spelta costituiscono un ponte tra i grani selvatici e i grani moderni (*Triticum durum* e *Triticum aestivum*) (Arzani & Ashraf, 2017). Il primo frumento coltivato dall'uomo è

stato l'einkorn, che ha rappresentato insieme all'orzo e al grano dicocco, la base dell'alimentazione delle popolazioni agricole in Europa (Zaharieva *et al.*, 2010).

Queste specie primordiali coltivate, dal punto di vista geografico, hanno origine circa nell'8.000 a.C. in una vasta area del Medioriente che si estende dalla penisola del Sinai e dal delta del Nilo fino agli odierni territori dell'Iraq, Palestina, Libano e Turchia, che per la sua forma e per il clima particolarmente adatto alla coltivazione è storicamente conosciuta come "Mezzaluna Fertile".



**Figura 1.1 Mezzaluna fertile** (Arzani & Ashraf, 2017).

Alcune evidenze archeologiche mostrano che i frumenti (farro piccolo, medio e spelta), in particolare, hanno origini in Turchia nel 9.000 a.C. (Piperno *et al.*, 2004) e grazie alla pratica dell'agricoltura si diffusero velocemente dalla regione della Mezzaluna fertile verso l'Europa e in particolare dall'Anatolia arrivarono in Grecia, Cipro e India nel 6.500 a.C. (Diamond, 1998) e successivamente in Italia, Francia, Spagna e Germania nel 5.000 a.C. In Italia il ritrovamento di reperti archeologici in diverse regioni (Puglia, Sicilia, Toscana) ha confermato la presenza di coltivazioni di frumento intorno al 7.000 a.C (Lev-Yadun *et al.*, 2000).

Nel 3.000 a.C. i grani primordiali raggiunsero l'Inghilterra e la Scandinavia e dopo un millennio si diffusero in Cina. Queste coltivazioni hanno riscontrato un'espansione così globale per l'elevata resa per area unitaria, una buona crescita in un clima temperato e un tempo medio di crescita di circa 120 giorni.

In realtà il *farrum* dei romani corrisponde al solo *T. turgidum* spp. *dicoccum*, ma si è voluto estendere il termine farro anche al grano monococco ed al grano spelta perché queste tre specie

hanno le cariossidi “vestite”, in cui le glume e le glumelle aderendo alla cariosside, necessitano di una operazione denominata “sbramatura” per liberare il chicco.

I grani moderni sono invece costituiti da ceppi omogenei che sono il risultato di programmi intensivi di coltivazione, finalizzati all’ottenimento di rese maggiori e qualità panificatorie reologiche per produrre prodotti da forno con caratteristiche più apprezzabili. In particolare, a partire dalla seconda guerra mondiale, la selezione dei frumenti è stata improntata all’incremento della qualità proteica dei grani, al fine di ottenere farine con migliori qualità tecnologiche. Ciò ha fatto sì che alcune varietà locali e antiche di grano siano state in parte dimenticate, se non perdute, portando ad un decremento della variabilità genetica e ad un impoverimento delle proprietà nutrizionali del grano, derivante dalla sostituzione di grani antichi locali con varietà moderne (Dinu et al., 2018). In tempi recenti, si sta però espandendo l’esigenza di conservare e mantenere le colture locali e la biodiversità; alcune varietà antiche sono state così reintrodotte e la loro coltivazione si sta nuovamente diffondendo (Cooper 2015).

## 1.2 Aspetti botanici e filogenetici

I frumenti sono i cereali più coltivati al mondo, in termine di superficie. Dal punto di vista botanico, il frumento tenero, quello duro e le altre tipologie antiche appartengono alla famiglia delle Poacee (Graminacee fino a pochi anni fa) e ad un unico gruppo (genere), a cui il naturalista svedese Carlo Linneo ha dato il nome latino *Triticum*.

Relativamente alla ploidia nel genere *Triticum* si riscontrano diversi livelli, le cui forme più importanti sono diploide, tetraploide ed esaploide (Arzani & Ashraf, 2017). I tre livelli di ploidia si ritrovano anche nei frumenti antichi (Figura 1.2):

- **Frumento einkorn:** farro piccolo o grano monococco (*T. monococcum* spp. *monococcum*), diploide;
- **Frumento emmer:** farro medio o grano dicocco (*T. turgidum* spp. *dicoccum*), tetraploide;
- **Spelta:** (*T. aestivum* spp. *spelta*), esaploide.

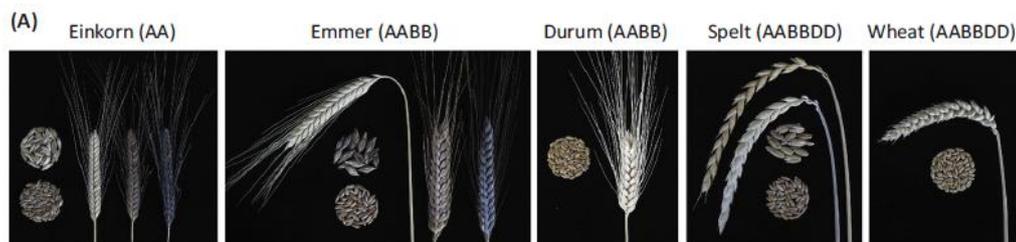
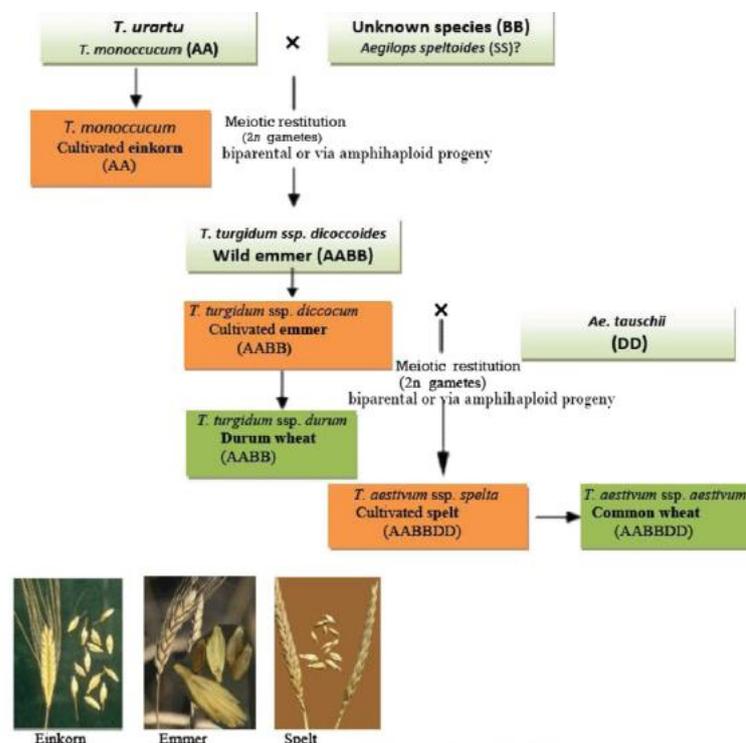


Figura 1.2 Farro (*T. monococcum*, *T. dicoccum*, *T. turgidum*), spelta, grano duro e tenero con la loro corrispondente formula genomica (Longin et al., 2016).

Negli esaploidi sono compresi i frumenti teneri, utilizzati per la produzione di pane, mentre i tetraploidi includono i frumenti cosiddetti duri (*T. turgidum* spp. *durum*), per la consistenza della cariosside, e specie a cariosside vestita e nuda. Il gruppo dei frumenti duri include molte sottospecie, tra le quali le più conosciute nell'area mediterranea sono a cariosside nuda:

- *T. turgidum* spp. *durum*, il grano duro;
- *T. turgidum* spp. *turgidum*;
- *T. turgidum* spp. *turanicum*, il grano turanico o “khorasan”;
- *T. turgidum* spp. *polonicum*, il grano polonico (caratterizzato dalla cariosside più lunga delle glumelle, quindi sporgente in modo evidente).

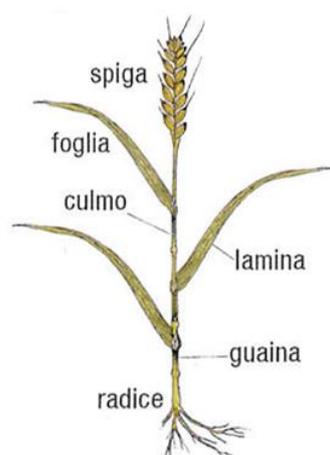
Il grano emmer proviene da un processo denominato poliploidizzazione: due specie selvatiche diploidi con genomi distinti, *Triticum urartu* con genoma AA e *Aegilops speltoides* con genoma BB (Figura 1.3), hanno dato origine al tetraploide *Triticum turgidum* spp. *dicoccoides* progenitore appunto dell'emmer, la cui forma domesticata è *Triticum turgidum* spp. *dicoccum* (genoma AABB) (Arzani & Ashraf, 2017; Pogna, 2007).



**Figura 1.3. Filogenesi delle specie addomesticate di *Triticum* spp., incluse einkorn, emmer, spelta, grano duro e grano tenero (Arzani & Ashraf., 2017).**

### **1.2.1 Ciclo vegetativo e morfologia**

Le *Graminaceae* hanno un ciclo di sviluppo suddiviso in fasi fenologiche, regolate da fattori endogeni ed esogeni, che determinano modificazioni a livello morfologico e funzionale di alcuni organi (Landserg, 1977). La germinazione è la prima fase di sviluppo, avviene in condizioni di temperatura di poco superiore a zero gradi (3-4°C). La cariosside assorbe acqua e si rigonfia, determinando l'emissione della prima piumetta. Poco dopo si sviluppano la radichetta primaria e altre radici seminali e il fusticino si allunga fino a raggiungere la superficie del terreno. Successivamente si ha la fase di accestimento, caratterizzata dallo sviluppo dell'apparato radicale secondario e dall'emissione di nuovi germogli, per cui da una pianta generata da un seme si sviluppa un insieme di culmi di accestimento che porterà alla formazione di più spighe (Borràs-Gelonch *et al.*, 2012). L'accestimento inizia in autunno, si arresta temporaneamente in inverno e riprende con la primavera. Il rachide è l'asse principale della spiga ovvero l'infiorescenza del frumento (Figura 1.4). All'inizio della levata, nodi e internodi, con all'apice gli abbozzi della spiga, si trovano ravvicinati in prossimità del suolo avvolti dalle foglie. Con l'innalzarsi della temperatura si assiste all'allungamento degli internodi con un veloce aumento dell'altezza dei culmi.



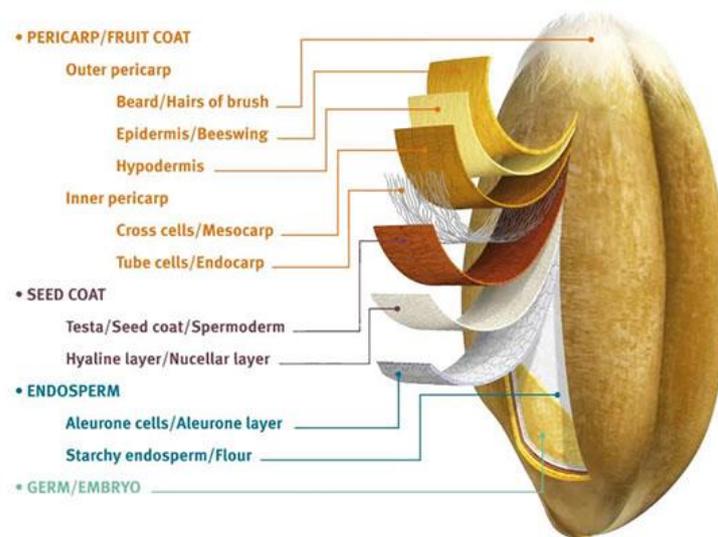
**Figura 1.4. Rappresentazione della spiga di un cereale**

Dopo la levata si verifica la spigatura, che avviene con la fuoriuscita dell'infiorescenza dalla guaina dell'ultima foglia; dopo un breve intervallo inizia la fioritura. Ogni spiga può essere costituita da circa 18-20 spighette formate da più fiori, ma non tutti portano alla formazione di cariossidi; in ottime condizioni soltanto due fiori per spighetta risultano in media allegati, con una produzione potenziale di circa 35-40 cariossidi per spiga. Avvenuta la fecondazione, si forma l'embrione e inizia l'accumulo di sostanze di riserva nell'endosperma delle cariossidi che

in seguito si ingrossano fino a raggiungere il volume dei granelli maturi. La maturazione può svolgersi in quattro fasi successive (Francia, 2013):

1. maturazione lattea: le cariossidi di color verde raggiungono il massimo volume;
2. maturazione cerosa: le cariossidi perdono acqua ma contemporaneamente continuano ad essere accumulate in esse sostanze di riserva; il colore diviene giallognolo e solamente alcune parti della pianta sono ancora turgide e vitali;
3. maturazione piena o fisiologica: tutta la pianta ha esaurito la capacità di compiere fotosintesi ed appare ingiallita e secca; cessa l'accumulo di sostanze di riserva nei semi; continua la perdita d'acqua da parte delle cariossidi (l'acqua si aggira attorno al 25-30%);
4. maturazione di morte: l'umidità si porta su valori dell'11-13% che consentono una mietitura ottimale. La maggior parte delle sostanze accumulate nelle cariossidi viene sintetizzata dopo la spigatura dall'ultima foglia a bandiera, dalla spiga stessa e dall'ultimo internodo.

Il frutto dei cereali è una cariosside (Figura 1.5), secca, costituita anatomicamente da tre regioni principali: i tegumenti (sia del frutto che del seme), l'embrione (comunemente definito germe) e l'endosperma amilaceo o mandorla farinosa. Ognuna di queste regioni è composta da più strati e possiede un'organizzazione strutturale ed una composizione chimica diversa e specifica per meglio rispondere alla propria funzione biologica (Lucisano & Pagani, 1997). L'embrione, o germe, è collocato alla base del seme e consiste in un abbozzo della futura pianta (asse embrionale) e in una regione (scutello) in grado di fornire principi nutritivi alla pianta durante la germinazione, rappresenta il 3% circa in peso della cariosside, ricco di proteine, lipidi, zuccheri solubili e vitamine, viene separato durante la macinazione unitamente ai crusconi.



*Figura 1.5 Illustrazione di cariosside di frumento*

L'endosperma, o mandorla farinosa, è la parte preponderante del chicco (82% del peso), costituisce la riserva energetica per la formazione di una nuova pianta; in tale regione vengono in particolare accumulate amido e proteine ma anche altri zuccheri e vitamine. Nell'endosperma si possono distinguere una regione esterna denominata strato aleuronico, ricco in proteine, che rappresenta il 7-8% circa del chicco, ed una regione centrale denominata mandorla o albume, in cui si accumulano amido e proteine.

I tegumenti sono un insieme di rivestimenti a protezione del seme dagli attacchi di patogeni fungini, insetti e da scambi di umidità, sono costituiti da sei strati cellulari che si dividono in tegumenti del frutto (pericarpo) e tegumenti del seme (testa e tessuto nucellare). Rappresentano circa il 10% in peso della cariosside ed hanno una composizione particolarmente ricca in fibre cellulosiche ed emi-cellulosiche, sali minerali e fitati (Lucisano & Pagani, 1997). I tegumenti insieme allo strato aleuronico e gran parte dell'embrione vengono separati dal resto della cariosside durante il processo di molitura e vanno a determinare la crusca (14-20% della cariosside). Nel caso di sfarinati non integrali questa viene scartata, determinando una perdita di sostanze nutritive, come proteine, vitamine e sali minerali, oltre che di componenti bioattivi, come acidi grassi omega-3, oligosaccaridi prebiotici, fitosteroli e polifenoli (Slavin, 2003).

In epoca preindustriale, i cereali venivano generalmente consumati interi ed erano presenti tutte le sezioni di cui è composto il chicco: la crusca esterna, il germe interno e l'endosperma. Gli avanzamenti nei processi di molitura e lavorazione hanno consentito la separazione e la rimozione della crusca, quindi della parte esterna del seme, ricca di fibre, e del germe, ricco di micronutrienti e lipidi che si perdono durante la raffinazione. Le farine ottenute dal processo di raffinazione, infatti, non contengono tutte le parti del seme ma sono formate sostanzialmente da endosperma ricco di amido, che consente di ottenere prodotti da forno con proprietà tecnologiche e reologiche migliori.

### ***1.2.2 Esigenze ambientali e tecniche colturali***

Il frumento è una specie longidiurna, microterma, la cui fioritura inizia nell'inverno avanzato. Le massime produzioni di frumento si hanno in climi temperato-freschi con temperature di circa 20°C (Altuhaish & Yahya, 2014). Lo zero di vegetazione corrisponde a 0°C tra germinazione e spigatura e a 6°C tra fioritura e maturazione. La temperatura massima di accrescimento è 30°C, mentre le ottimali sono comprese tra i 18 e i 20 gradi (Wheeler *et al.*, 1996). La resistenza al freddo è molto bassa tra germinazione ed emergenza, per poi aumentare fino a livelli massimi in fase di pieno accostamento.

Il frumento trova le condizioni ideali in terreni tendenzialmente argillosi, con buona struttura e buon contenuto di sostanza organica; pH attorno alla neutralità e presenta anche discreta tolleranza alla salinità (Toderi e D'Antuono, 2001). L'acqua è un fattore preponderante per la produttività della coltura. Per il frumento, il periodo maggiormente critico è la spigatura: qualora lo stress idrico colpisca la pianta in tale periodo la produttività può risultare notevolmente decurtata principalmente a causa di una riduzione del numero di semi per spiga (Edmeades *et al.*, 1989; Monneveux *et al.*, 2012). Gli altri stadi fenologici che risentono di uno stress idrico risultano essere la fase di levata, quando per evitare necrosi e sterilità dei culmi di accestimento è importante che vi sia una buona disponibilità idrica, e la fase di maturazione della cariosside, periodo in cui viene determinata la dimensione della granella (Araus *et al.*, 2002; Farooq *et al.*, 2009).

La concimazione rappresenta l'intervento agronomico più importante per la produzione e la qualità della granella. Sebbene siano molti gli elementi nutritivi di cui il frumento necessita, i cosiddetti macroelementi (azoto, fosforo, potassio) sono considerati i più importanti. Altri elementi, quali calcio, molibdeno, zolfo, rivestono grande importanza nella fisiologia della coltura ma sono di solito presenti nel suolo in quantità sufficienti. L'assorbimento di tali elementi nutritivi avviene in modo variabile e raggiunge il suo massimo durante la fase di levata, al termine della quale risulta assorbito non meno del 70-80 % del fabbisogno totale (Bonciarelli, 1994).

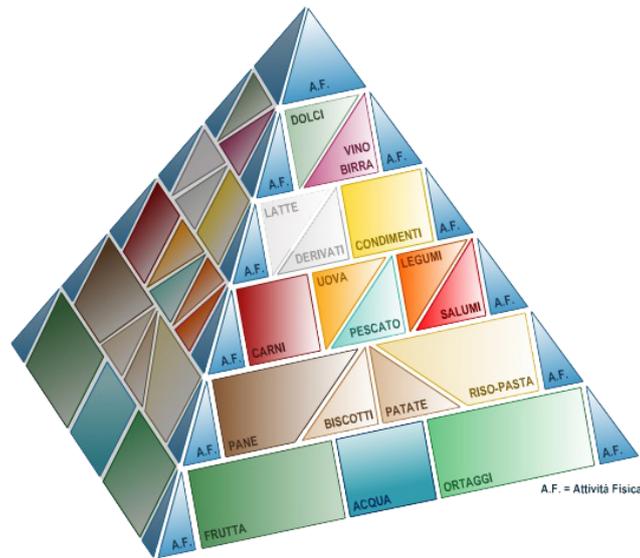
L'azoto ricopre un ruolo cruciale, poiché entra a far parte di numerose molecole come aminoacidi, acidi nucleici, clorofilla, citochinine, poliammine, metaboliti secondari, fondamentali durante tutto il ciclo biologico dei vegetali (Maffei, 1999). Esso è considerato fondamentale anche per il fatto che i livelli di azoto nel terreno non sono quasi mai in grado di soddisfare a pieno le esigenze nutritive della coltura (Camerini, 2013).

Per quanto riguarda invece il fosforo, la concentrazione di questo elemento nei tessuti della pianta è maggiore nelle piante giovani: è necessario che fin dalle prime fasi di vita la pianta trovi un terreno ben dotato in fosforo, sebbene ne assorba la quota maggiore durante la fase di levata, al termine della quale ha già soddisfatto circa il 75% delle proprie esigenze. A maturità, maggiori concentrazioni di fosforo si trovano nella granella piuttosto che nella paglia (Toderi & D'Antuono, 2001).

Il potassio come il fosforo è presente in concentrazione maggiore nelle piante giovani; a maturità invece si trova concentrato prevalentemente nella paglia piuttosto che nella granella. La quota principale di questo elemento è assorbita tra la fase di levata ed i 30-40 giorni precedenti la maturazione (Toderi & D'Antuono, 2001).

### 1.3 Composizione e aspetti nutrizionali

In un'alimentazione equilibrata la maggiore percentuale di energia introdotta deve derivare dai carboidrati; non stupisce, quindi, che nella piramide alimentare (Figura 1.6) i prodotti a base di cereali si trovino in basso, insieme agli alimenti di origine vegetale, che devono essere consumati con maggiore frequenza.



*Figura 1.6 La piramide alimentare italiana (tratto da Università “la Sapienza” di Roma, 2005)*

Nell'ambito del progetto HEALTHGRAIN, che ha messo a confronto grani antichi e modernizzandoli in diversi laboratori utilizzando gli stessi metodi analitici, sono stati determinati i micronutrienti in 150 tipi di pane ottenuti da grani di origine differente e 25 linee di grani duro, spelta, farro e grano einkorn (Shewry & Hey, 2015). Oltre ai dati del progetto summenzionato, altri autori hanno di recente condotto una revisione della letteratura, e la composizione nutrizionale di 3 tipologie di grani antichi e del grano moderno è riportata in tabella 1.1 (Arzani & Ashraf, 2017).

<i>Componente (peso secco)</i>	<i>Frumento einkorn</i>	<i>Farro emmer</i>	<i>Spelta</i>	<i>Grano moderno</i>
<b>Carboidrati digeribili (g/100 g)</b>	64,5	71	65,9	73
<b>Amido (g/100 g)</b>	62,3	65	63,8	68,5
<b>Amilosio (g/100 g)</b>	23,8	25,1	-	28,4
<b>Fibra dietetica (g/100 g)</b>	9,8	9,8	12	13,4
<b>Proteine (g/100 g)</b>	15,5-22,8	13,5-19,05	16,3-17,5	12,9-19,9
<b>Lipidi (g/100 g)</b>	3,5	2,16	2,39	2,8
<b>Ceneri (g/100 g)</b>	2,3	2,3	2,1	1,9
<b>Fosforo (g/Kg)</b>	5,2	5,12	4,7	4,18
<b>Potassio (g/Kg)</b>	4,29	4,39	4,17	5
<b>Zolfo (g/Kg)</b>	1,9	1,88	1,8	1,4
<b>Magnesio (g/Kg)</b>	1,63	1,67	1,5	1,44
<b>Calcio (g/Kg)</b>	0,42	0,36	0,39	0,43
<b>Ferro (g/Kg)</b>	49	49	50	38
<b>Zinco (g/Kg)</b>	53	54	47	35
<b>Manganese (g/Kg)</b>	28	24	27	26
<b>Rame (g/Kg)</b>	4	4,1	5	3,9
<b>Sodio (g/Kg)</b>	7	12	10	10

*Tabella 1.1 Valori medi o intervalli dei macronutrienti e micronutrienti di farine derivanti da cereali integrali coltivati, quali farro, grano emmer, spelta, grano moderno per panificazione (Arzani & Ashraf, 2017)*

### **1.3.1 Macronutrienti**

I **carboidrati** sono il costituente preponderante delle cariossidi dei cereali e sono presenti principalmente come amido. L'amido è composto dall'amilosio e dall'amilopectina, ha essenzialmente funzioni di riserva per la pianta ed è localizzato esclusivamente nell'endosperma della cariosside. Costituisce circa il 65-70% della farina e il rapporto amilosio/amilopectina influenza la qualità panificatoria e la shelf-life dei prodotti derivati (Cannella *et al.*, 2007; Lafiandra *et al.*, 2008). Dal punto di vista nutrizionale, l'amilosio viene più facilmente idrolizzato dagli enzimi amilolitici quali  $\alpha$ -amilasi e  $\beta$ -amilasi a maltosio, mentre l'amilopectina, a causa della struttura più fitta, viene degradata al 60% a maltosio e destrine (Arzani & Ashraf, 2017).

Il miglioramento genetico ha fatto in modo che le varietà moderne, per un più elevato livello di ploidia, abbiano un maggiore contenuto di amido, che dal punto di vista puramente produttivo significa avere una maggiore resa. Al contrario, grani antichi come spelta, farro e frumento einkorn, hanno un minor contenuto di amido in rispetto al grano moderno (Brandolini *et al.*, 2008; Caballero *et al.*, 2008; Haghayegh & Schoenlechner, 2010). In confronto con il grano

tenero, il frumento einkorn mostra un quantitativo inferiore di amido resistente (valore medio: 655 vs 685 g/kg peso secco (DM) e 25.6 contro 30-88 g/kg DM rispettivamente (Hidalgo & Brandolini, 2012). Tuttavia il contenuto di amilosio è risultato maggiore di quello di amilopectina.

La **fibra alimentare** è una miscela estremamente complessa di polisaccaridi diversi, quali cellulosa (1,7-3,1%), principalmente presente nella crusca dei cereali, emicellulose, lignina (0,7-2,0% sul peso secco), pectine,  $\beta$ -glucani (0,5-1,0% sul peso secco), arabinoxilani (5,5-7,4% sul peso secco) e altri componenti (Andersson *et al.*, 2013). Il grano integrale contiene dall'11,5% al 15,5% di fibra sul peso secco; gli strati esterni del chicco, formati prevalentemente da pericarpo, sono ricchi di lignina (12%), cellulosa (30%) e un complesso di arabinoxilani (60%) (Barron *et al.*, 2007). In aggiunta ai polisaccaridi della parete cellulare, vi sono altri due gruppi di carboidrati che contribuiscono alla frazione della fibra alimentare del grano e sono i fruttoligosaccaridi (FOS) in quantità di 0,8-1,9% su peso secco (Andersson *et al.*, 2013) e sono concentrati nella crusca (Haska *et al.*, 2008). Inoltre, una frazione di amido presente nell'endosperma, chiamata amido resistente (RS), resiste alla digestione del tratto gastro-intestinale superiore, raggiunge il colon dove viene sottoposto alla fermentazione microbica (Topping, 2007; Shewry *et al.*, 2015). Durante il processo di fermentazione si formano vari sottoprodotti, principalmente acidi grassi a corta catena (*short-chain fatty acids*, SCFA), quali acidi acetico, propionico e butirrico, e gas. L'acido butirrico è la principale fonte di energia per le cellule della mucosa del colon, ha effetti sulla differenziazione cellulare e sull'apoptosi, e si ipotizza possa offrire una protezione nei confronti del tumore del colon-retto (Quaglia, 2001). L'acido acetico e l'acido propionico sono invece assorbiti, raggiungono il fegato e i tessuti periferici con effetti sulla regolazione del metabolismo glico-lipidico; in particolare, l'acido acetico sembrerebbe diminuire l'insulino-resistenza (Johnston *et al.*, 2004) e l'acido propionico la sintesi di colesterolo e la lipogenesi (Nishina & Freeland, 1990; Venter *et al.*, 1990).

In tabella 1.2 è sintetizzato il contenuto dei vari tipi di fibra dietetica di einkorn, farro e spelta (frumenti antichi), frumento tenero e frumento duro (frumenti moderni).

<b>Componente (peso secco)</b>	<i>Grano einkorn</i>	<i>Farro emmer</i>	<i>Spelta</i>	<i>Grano tenero</i>	<i>Grano duro</i>
<b>Fibra dietetica totale (TDF)</b>	10,8	9,2	11,18	14,96	13,1
<b>Fibra insolubile</b>	6,9	-	9,6	11,3	10,6
<b>Fibra solubile</b>	1,7	-	1,6	1,7	1,6
<b>Arabinoxilani</b>	-	-	5,74	6,9	-
<b><math>\beta</math>-glucani</b>	0,39	0,36	0,64	0,72	0,37

**Tabella 1.2 Contenuto dei principali componenti di fibra dietetica contenuti in frumenti antichi integrali (einkorn, emmer, spelta) e specie moderne (Grausgruber et al., 2004; Gebruers et al. (2008); Escarnot et al. (2010); Brandolini et al. (2011); Escarnot et al. (2015).**

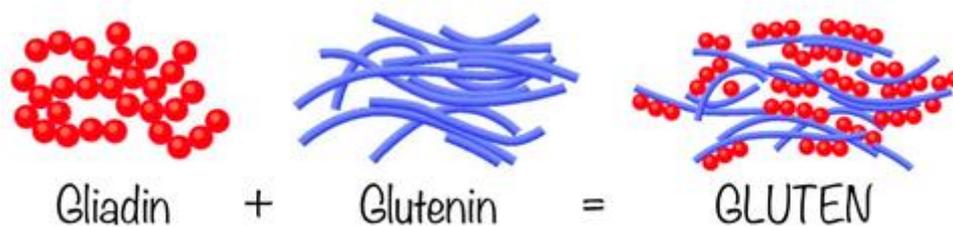
I dati sono espressi come %/peso secco della cariosside integrale

Studi epidemiologici hanno provato che la regolare assunzione di cereali integrali influisce positivamente sullo stato di salute poiché riduce il rischio di diabete mellito di tipo 2 (T2DM), previene l'insorgenza di obesità (Ye et al., 2012; Thorup et al., 2014), riduce l'incidenza del cancro del colon-retto (Yao et al., 2014; Threapleton et al., 2013) e ipertensione (Wang et al., 2007) e il rischio di insorgenza della sindrome metabolica (Giacco et al., 2014). È stato inoltre riportato che il consumo di prodotti di orzo o di segale integrali migliorano la concentrazione di glucosio ematico post prandiale e la risposta insulinica (Sandberg et al., 2016; Nilsson et al., 2008), e incrementano l'attività degli ormoni intestinali implicati nella regolazione dell'appetito e del metabolismo quali *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) e/o *peptide YY* (PYY), correlati ad un maggiore senso di sazietà e minore appetito (Sandberg et al., 2016; Nilsson et al., 2008).

La quantità e la struttura delle **proteine** presenti nei cereali sono i fattori principali che determinano l'attitudine delle farine e delle semole a fornire un buon pane o una buona pasta (Cannella et al., 2007). Sebbene interessanti per quantità in quanto la loro percentuale nella sostanza secca oscilla tra il 9% ed il 15% circa dell'intero chicco, esse risultano essere carenti di alcuni amminoacidi essenziali, come la lisina e il triptofano. Il contenuto in proteine, benché sia un carattere ereditario per circa il 50%, risulta essere influenzato anche dalle condizioni di coltivazione come qualità e struttura del terreno, clima, pratiche agronomiche (concimazioni, diserbo, irrigazione, ecc.). Inoltre tende a diminuire all'aumentare delle rese (Cannella et al., 2007; Ashraf, 2014).

Il contenuto proteico del frumento è maggiore in farine integrali derivanti da grani antichi rispetto alle controparti moderne (Marconi & Cubadda, 2005; Brandolini et al., 2008; Shewry et al., 2013), in particolare le proteine del frumento einkorn sono più alte rispetto a quelle di grani moderni (Hidalgo et al., 2009) (Tabella 1.1).

Le proteine presenti nella cariosside possono essere suddivise in 4 differenti gruppi a seconda della loro solubilità: albumine e globuline (solubili) rappresentano circa il 20% delle proteine totali, gliadine e glutenine (insolubili) rappresentano il rimanente 80% (Figura 1.7). Gliadine e glutenine sono le proteine responsabili della formazione del glutine, reticolo viscoelastico implicato in maniera preponderante nella determinazione delle proprietà reologiche dei prodotti da forno.



*Figura 1.7 Proteine gliadine e glutenine implicate nella formazione del glutine*

Quando sono sottoposte alla digestione gastro-intestinale, le componenti proteiche vengono scisse in peptidi di varia lunghezza e, dal momento che il glutine è ricco di prolina, si generano strutture compatte, solitamente difficili da digerire ed espellere (Arentz-Hansen *et al.*, 2000).

Negli individui affetti da celiachia, una enteropatia autoimmune, le gliadine presenti nel glutine determinano una reazione immunitaria che causa lesioni a livello dell'intestino tenue con alterata funzionalità dei villi, iperplasia delle cripte epiteliali e infiltrazione leucocitaria (Di Niro *et al.*, 2012). La celiachia ha eziologia multifattoriale e dipende da fattori ambientali quali l'esposizione alle gliadine del glutine, ma anche da una predisposizione genetica.

Di recente è stata inoltre identificata una nuova patologia conosciuta come sensibilità al glutine non-celiachia (NCGS, *non-celiac gluten sensitivity*). La patogenesi della NCGS non è ben definitiva, tuttavia recenti studi suggeriscono che vi sia l'intervento del sistema immunitario innato (Hollon *et al.*, 2015). Il fattore scatenante pare sia il glutine e anche di altri componenti proteici e non contenuti nel grano, che hanno effetti dannosi per la mucosa intestinale degli individui affetti da questa patologia (Nanayakkara *et al.*, 2016; Volta *et al.*, 2017).

I **lipidi** sono presenti in quantità ridotta nella cariosside (circa il 2-3%), e si ritrovano principalmente nel germe e nell'aleurone. Svolgono un ruolo importante nel processo di panificazione stabilizzando le bolle di gas che si formano durante la fermentazione dell'impasto (Cannella *et al.*, 2007). Il confronto tra la composizione analitico in lipidi e acidi grassi nel germe di grano einkorn e grano tenero ha rivelato un maggior contenuto lipidico (+50%) nel farro, con una enorme proporzione di acidi grassi monoinsaturi (+53%), e una minore quantità di acidi grassi polinsaturi (-8%) e acidi grassi saturi (-21%) (Hidalgo *et al.*, 2009). La presenza rilevante di acidi grassi insaturi e polinsaturi, seppur positiva da un punto di vista nutrizionale, potrebbe rendere i prodotti che li contengono più soggetti a processi di irrancidimento ossidativo.

### **1.3.2 Micronutrienti**

La maggior parte delle **sostanze minerali** contenute nella cariosside dei cereali è localizzata negli strati più esterni (tegumenti) ed è costituita da fosfati, solfati di potassio e tracce di ferro,

rame e zinco. Questi composti subiscono generalmente una forte riduzione con la macinazione, tranne nella produzione di sfarinati integrali.

Spelta, farro e grano einkorn hanno dimostrato di avere una maggiore concentrazione di selenio rispetto ai grani moderni (Zhao *et al.*, 2009). Alcuni autori, analizzando una larga varietà genotipica, hanno inoltre ritrovato maggiori concentrazioni di ferro, zinco, manganese in grano einkorn. Contrariamente al contenuto minerale, l'acido fitico tende ad essere più basso del 40% nella spelta rispetto al grano moderno (Kohajdová & Karovicova, 2008).

I cereali rappresentano una importantissima fonte di **vitamine**, soprattutto del gruppo B quali vitamina B<sub>1</sub> (tiamina), B<sub>2</sub> (riboflavina), B<sub>3</sub> (niacina), B<sub>6</sub> (piridossina), B<sub>9</sub> (acido folico) (Gerdes *et al.*, 2012). Le vitamine B<sub>3</sub> e B<sub>6</sub> tendono a concentrarsi nello strato aleuronico (Panatta, 1997), mentre la B<sub>1</sub> è maggiormente presente anche nello scutello.

Piironen *et al.* (2008) hanno riscontrato una maggiore concentrazione di acido folico in grano einkorn e in grano duro moderno, mentre dai dati del progetto HEALTHGRAIN sembra esserci una differenza limitata tra il contenuto di folati in varietà moderne e antiche di cereali (Tabella 1.3) (Shewry & Hey, 2015).

Per quel che riguarda il contenuto in vitamine liposolubili, presenti soprattutto nel germe dei cereali, dai dati del progetto HEALTHGRAIN risultano differenze minime nel contenuto di  $\alpha$ -tocoferolo in cereali antichi e moderni (Tabella 1.3) (Shewry & Hey, 2015).

<b>Componente (peso secco)</b>	<b>Folati (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b><math>\alpha</math>-tocoferolo (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
<i>Frumento einkorn</i>	0,58 (0,43-0,68)	9,1 (7-12,1)
<i>Farro emmer</i>	0,69 (0,52-0,94)	7,7 (6,4-8,6)
<i>Spelta</i>	0,58 (0,5-0,65)	11 (9,9-12,5)
<i>Grano moderno</i>	0,56 (0,32-0,77)	13,5 (9,1-19,9)

**Tabella 1.3** *Contenuto di folati e vitamina E in varietà di cereali antichi e cereali moderni (dati ottenuti dallo studio HEALTHGRAIN (Shewry & Hey, 2015))*

Dati espressi come media e intervallo.

### **1.3.3 Componenti fitochimici**

In generale, nella cariosside dei cereali sono presenti numerosi componenti fitochimici quali carotenoidi, tocoli e fenoli, ai quali è stata attribuita un'attività antiossidante (Liu *et al.*, 2007). La loro presenza nei grani influenzata fortemente dal genotipo, dall'ambiente e dall'interazione tra i due fattori (Dinu *et al.*, 2018). Il contenuto di alcune classi di fitochimici in cinque linee di

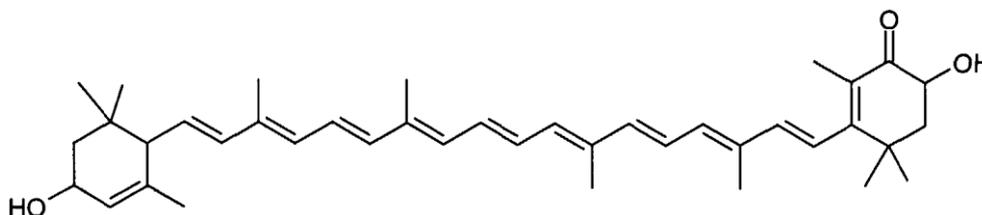
spelta, farro e frumento einkorn, e 161 grani moderni è riportato in tabella 1.4 (Shewry & Hey, 2015).

Componente (peso secco)	Acidi fenolici (µg/g)	Fitosteroli (µg/g)	Tocoli (µg/g)	Acido ferulico (µg/g)
<i>Frumento einkorn</i>	615 (449-816)	1054 (976-1187)	57 (42,7-70,2)	298 (207-442)
<i>Farro emmer</i>	779 (508-1161)	857 (796-937)	36,4 (29-57,5)	476 (323-711)
<i>Spelta</i>	579 (382-726)	928 (893-963)	46,2 (40,2-50,6)	365 (223-502)
<i>Grano moderno</i>	657 (326-1171)	844 (241-677)	49,8 (27,6-79,7)	396 (181-742)

Tabella 1.4 Contenuto fitochimici in varietà di cereali antichi e cereali moderni (dati ottenuti dallo studio HEALTHGRAIN (Shewry & Hey, 2015)

Dati espressi come media e intervallo

I **carotenoidi**, pigmenti naturali caratterizzati da proprietà antiossidanti e per cui sono ipotizzate funzioni positive per la salute (Fardet *et al.*, 2008; Kotecha *et al.*, 2016; Stringham *et al.*, 2010) sono presenti nel frumento principalmente come luteina (Figura 1.8) e  $\beta$ -carotene.



1.8 Struttura chimica della luteina

La luteina è presente in quantità maggiore nei grani antichi e, in particolare, il grano einkorn risulta esserne il più ricco (Shewry & Hey, 2015). Alcuni autori suggeriscono però che il maggior contenuto di carotenoidi nei prodotti a base di grano einkorn potrebbe essere il risultato di minor perdite di processo dovute ad una minore attività della lipossigenasi di tale cereale (Hidalgo *et al.*, 2013).

I **tocoli** (tocoferoli e tocotrienoli) sono localizzati negli strati più esterni della cariosside. Il farro presenta la maggiore concentrazione di tocoli (Shewry & Hey, 2015) (Tabella 1.4). Inoltre, il farro presenta il più alto contenuto in steroli vegetali o **fitosteroli**, molecole simili al colesterolo in funzioni e struttura presenti nella frazione lipidica non saponificabile nelle piante (Nurmi *et al.*, 2008; Shewry & Hey, 2015) (Tabella 1.4).

I **composti fenolici** nei cereali sono rappresentati prevalentemente dagli acidi fenolici; inoltre, si ritrovano piccole quantità di flavonoidi e significativi livelli di lignani. Questi composti sono caratterizzati da proprietà antiossidanti (Quinones *et al.*, 2013). Il maggiore composto fenolico presente in grano integrale è l'alchilresorcinolo. La sua concentrazione è variabile a seconda della specie (Ziegler *et al.*, 2016), e maggiore nei grani antichi quali frumento einkorn, farro emmer e spelta rispetto a grani moderni (Dinelli *et al.*, 2009; Shewry & Hey, 2015). L'acido ferulico è uno degli acidi fenolici più importanti presentinel grano integrale. As esso si ascrivono proprietà antiossidanti ed antiinfiammatorie (Arzani & Ashraf, 2017).

Per cercare di valorizzare le peculiarità dei diversi grani antichi, Giambanelli *et al.* (2013) hanno analizzato il contenuto di steroli, tocoli, carotenoidi e fenoli di differenti specie di cereali, quali *T. timopheevi* var. *timopheevi*, *T. turgidum* var. *paleocolchicum* (Georgian emmer), *T. aestivum* var. *macha*, farro (*Triticum monococcum*), grano Emmer (*Triticum dicoccum*). I risultati di tale ricerca hanno confermato che il grano einkorn ha un elevato contenuto di carotenoidi rispetto agli altri cereali coltivati nelle stesse aree geografiche.

#### ***1.3.4 Studi in vitro e in vivo sulle proprietà salutistiche***

Gli studi *in vitro* su colture cellulari possono rappresentare la prima fase esplorativa per valutare le proprietà biologiche e funzionali degli alimenti. Sebbene i risultati ottenuti *in vitro* debbano essere poi validati *in vivo*, le colture cellulari rappresentano senza dubbio un sistema più rapido ed economico, in grado di indirizzare studi ulteriori. Studi *in vitro* a validazione delle possibili proprietà salutistiche dei cereali antichi sono a tutt'oggi scarsi. Tra essi, lo studio di Leoncini *et al.* (2012) ha evidenziato una maggiore attività antiossidante di un'antica varietà di frumento tenero (*Verna*) rispetto ad un grano tenero moderno (*Palesio*) in colture primarie di cardiomiociti neonatali di ratto.

Due studi *in vivo* hanno valutato l'effetto del consumo di una dieta a base di grano antico rispetto ad una a base di grano moderno in modelli animali di diabete (Thorup *et al.*, 2015; Gorelick *et al.* 2017). In particolare, nello studio di Thorup *et al.* (2015) è stato valutato l'effetto di una dieta a base di spelta, farro e grano einkorn su controllo glicemico, profilo lipidico plasmatico, livello di espressione di geni epatici e risposta glicemica acuta in ratti diabetici Zucker. Dopo un periodo di 9 mesi di dieta, lo sviluppo e la progressione di T2DM è stato meno evidente per il gruppo alimentato con varietà di grano antico rispetto a quello alimentato con grano moderno. Gli Autori hanno attribuito questi effetti ad una down-regolazione dei geni PPAR- $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ), di GLUT-2 (*glucose transporter 2*), SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein 1*) e SREBP-2 (*sterol regulatory element-binding protein 2*),

regolatori chiave implicati nel metabolismo glucidico e lipidico (Thorup *et al.*, 2015). Nel più recente studio di Gorelick *et al.* (2017), è stato dimostrato che ratti alimentati con grano locale o specie ancestrali hanno una minore incidenza di contrarre diabete di tipo 1 (T1DM) e le complicazioni ad esso correlato, rispetto ad animali alimentati con grani moderni. Questo è il primo studio che suggerisce che nei grani antichi potrebbero non essere presenti gli epitopi correlati a T1DM (Gorelick *et al.*, 2017).

Le proprietà funzionali della varietà antica *Verna* sono state valutate in due studi di intervento sull'uomo (Sofi *et al.*, 2010; Sereni *et al.*, 2017). In entrambi gli studi è stato effettuato un trial controllato, randomizzato, cross-over utilizzando una dieta comprendente prodotti a base della varietà *Verna* ed una dieta controllo comprendente gli stessi prodotti, ma a base di grano moderno. Nello studio di Sofi *et al.* (2010) l'alimento utilizzato per il trial clinico era il pane, ed il controllo era preparato con una miscela di 6 farine di grani moderni (*Bilancia, Bolero, Eureka, Mieti, Nobel e Palesio*). Dopo 10 settimane di trattamento, il consumo del pane prodotto con la varietà *Verna* ha significativamente ridotto i livelli ematici di colesterolo totale, colesterolo LDL (*low density lipoprotein*, lipoproteine a bassa densità) e glucosio. Nello studio di Sereni *et al.* (2017) il consumo della varietà *Verna* in forma di pane è stato messo in confronto con la della varietà moderna *Blasco*; la varietà antica ha determinato un incremento di cellule endoteliali mentre un effetto peggiore è stato evidenziato dopo il consumo della varietà moderna. Lo stesso studio ha dimostrato che altre due varietà antiche (*Gentil Rosso* e *Autonomia B*) non hanno la stessa capacità funzionale di *Verna* e tra le due, *Gentil Rosso* ha una determinato un maggiore miglioramento dei parametri cardio-vascolari presi in esame rispetto ad *Autonomia B*.

#### **1.4 Il Grano khorasan KAMUT®**

Il grano KAMUT® appartiene all'antica varietà di grano *Triticum turgidum spp. turanicum*, chiamato comunemente grano khorasan. KAMUT® è un marchio internazionale registrato (Figura 1.9) di Kamut Enterprises of Europe bvba e di Kamut International bvb. Il progetto KAMUT® nasce dalla famiglia di agricoltori Quinn negli anni '80, che aveva riscontrato ottime proprietà rispetto al grano moderno.

Tutto il grano venduto con il marchio KAMUT® deve seguire le specifiche di qualità richieste da Kamut International e Kamut Enterprises of Europe, e rispettare i seguenti requisiti ([www.kamut.com](http://www.kamut.com)):

1. Essere la pura antica varietà di grano khorasan;
2. Essere coltivato solamente come grano certificato biologico;

3. Avere un range di proteine tra il 12% e il 18%;
4. Essere privo al 99% da contaminazioni con varietà di grano moderno;
5. Essere privo al 98% di danni da malattia;
6. Contenere tra i 400 e 1.000 ppb di selenio;
7. Non essere utilizzato in prodotti che sono denominati o commercializzati in maniera fuorviante o ingannevole.



*Figura 1.9 Logo del Marchio registrato KAMUT®*

Questi sono aspetti importanti in quanto permettono di avere lotti di grano qualitativamente omogenei.

Il grano khorasan non è stato prodotto su scala commerciale tramite programmi di miglioramento genetico; infatti la filosofia dell'azienda è quella di preservare la varietà nella forma originale, senza alcun tipo di manipolazione, ed è completamente indipendente dagli attuali programmi di ibridazione.

#### ***1.4.1 Origine e diffusione***

Il grano khorasan ha origine, come gli altri grani antichi, dalla mezzaluna fertile e probabilmente i suoi semi dall'aspetto insolito sono stati presi a Il Cairo, in Egitto, e portati in America da un aviatore americano, il cui padre iniziò la coltivazione di questo curioso grano, e, chiamandolo "Grano di Re Tut" ne favorì l'espansione a livello locale. Lo stelo sotto l'infiorescenza è caratterizzato da un tratto morfologico ondulato distintivo (Figura 1.10). I semi hanno una dimensione due volte sviluppata rispetto il grano e sono caratterizzati da una gobba distintiva.



*Figura 1.10 Spighe di farro, grano emmer, spelta e KAMUT® (Stallknecht et al., 1995)*

Bob Quinn, agricoltore per generazioni, lo vide per la prima volta da un agricoltore che distribuiva campioni di questo grano gigante alla fiera di contea. Nel 1977 il Dr. Quinn, terminato il dottorato in biochimica vegetale presso l'Università della California a Davis, decise di contattare l'azienda Corn Nuts® che produceva questo snack per intraprendere un'attività con loro, ma l'azienda decise di non proseguire il progetto. Nonostante la perdita d'interesse da parte dell'azienda Corn Nuts®, il grano continuava a essere coltivato per aumentarne l'offerta, partendo da una manciata di chicchi che erano stati accuratamente selezionati dal padre di Bob Quinn e poi coltivati da lui stesso. Interessandosi nello stesso periodo di agricoltura biologica Quinn ottenne nel 1986 il suo primo certificato biologico e nel 1989 tutta l'azienda di famiglia divenne biologica. Nel 1988 il grano fu introdotto nel mercato di alimenti biologici sotto forma di pasta fatta dalla Royal Angelus Macaroni Company. Nel 1989 fu prodotto dalla Oasis Bread il primo pane con questo grano.

Vista la rapida crescita d'interesse e i risultati positivi di un primo studio su persone sensibili al grano, il Dr. Quinn ne ipotizzò le qualità salutistiche e desiderò proteggerle preservando la varietà attraverso un marchio commerciale. Nel 1990, il marchio "KAMUT", antica parola egizia per nominare "grano", fu registrato per essere utilizzato come garanzia che il grano originario rimanesse non modificato e sempre coltivato secondo il metodo dell'agricoltura biologica.

Nel 1991 furono introdotti negli Stati Uniti i primi fiocchi per la colazione da Arrowhead Mills e il grano fu introdotto anche in Europa. Oggi il grano khorasan a marchio KAMUT® si può trovare in tutto il mondo, in prodotti quali pane, pasta, pizza, cereali, snack, dolci, cracker, birra, erba di grano e bevande a base di cereali.

L'Europa oggi è il maggiore consumatore di grano khorasan KAMUT® e in particolare l'Italia è il maggiore importatore (circa il 70% del prodotto importato in Europa); qui la farina dell'antico cereale viene largamente utilizzata dall'industria alimentare, che la trasforma in numerosi alimenti esportati in tutta l'Unione europea (Canavari *et al.*, 2009).

#### **1.4.2 Aspetti tecnologici del KAMUT®**

L'utilizzo di cereali integrali antichi e minori continua a suscitare grande interesse sia nella comunità scientifica che nell'industria alimentare; l'utilizzo di tali cereali in varie miscele permette di ottenere prodotti con un maggiore valore nutrizionale, maggiore valore aggiunto e differenti attributi sensoriali (Angioloni & Collar, 2011). Negli ultimi anni è cresciuto fortemente l'interesse dei consumatori nei confronti del grano KAMUT® khorasan, le cui farine vengono utilizzate sempre di più in sostituzione alla farina di frumento tradizionale. Ciò si è tradotto in un incremento di consumo, creando una emergente nicchia di mercato (Pasqualone *et al.*, 2011).

Attualmente esiste una vasta gamma di preparazioni alimentari a base di KAMUT® come pane, biscotti, torte, cereali da colazione, muffin, frittelle e pasta soprattutto in Italia (Chandi *et al.*, 2015).

In alcuni studi è stata valutata l'attitudine alla panificazione di farina sia raffinata che integrale di KAMUT®. Sono stati ottenuti buoni risultati relativamente al contenuto di glutine di farina integrale di KAMUT® (15,1 g/100 g peso secco) e all'indice di giallo (21,23 per farina di KAMUT® raffinata), due caratteristiche fondamentali dal punto di vista tecnologico (Piergiovanni *et al.*, 2009). Nonostante la pasta integrale sia considerata generalmente di qualità inferiore per una texture più soffice e maggiori perdite in cottura, l'interesse nutrizionale nei confronti di KAMUT®, ha spinto Gauthier *et al.* (2006) a sperimentare le rese tecnologiche di pasta integrale prodotta con questo grano.

Una buona attitudine alla produzione di pane con KAMUT® è stata evidenziata da Grausgruber *et al.* (2004) e Pasqualone *et al.* (2011). Il grano KAMUT® presenta valori proteici molto alti (150 g/Kg di peso secco) e fanno sì che il glutine sia molto tenace e l'impasto richieda più acqua e maggiore tempo di lavorazione per ottenere un'ottima consistenza (Abdel-Haleem *et al.*, 2012). Inoltre l'impasto prodotto con KAMUT® ha valori più bassi di W, che misura la forza della maglia glutinica, e valori P/L elevati; queste caratteristiche non sono positivamente associate ad un buon sviluppo degli impasti, tuttavia la farina di KAMUT® risulta avere una discreta attitudine alla panificazione.

Sono state studiate anche le proprietà fisico-chimiche e funzionali di farine miscelate con farina di KAMUT® e le conseguenti proprietà reologiche di biscotti prodotti con tale miscela (Chandi

*et al.*, 2015). Il contenuto proteico di prodotti con farina miscelata con KAMUT® è superiore (8,5-9%). La quantità di acqua assorbita e il tempo di sviluppo dell'impasto di farine con KAMUT®, misurate al farinografo, incrementano con l'aumento della percentuale di farina di KAMUT® presente nella miscela. L'aggiunta di farina KAMUT®, fino al 50%, alla miscela di farine permette la produzione di biscotti con una buona resistenza alla rottura, che conferisce un'apprezzabile livello di croccantezza (Chandi *et al.*, 2015).

Inoltre, dal confronto di cous cous prodotto con farina di KAMUT® e grano duro tradizionale è emerso che il prodotto ottenuto con farina di KAMUT® ha un maggior quantitativo di glutine e di proteine totali: questo aspetto è associato ad una buona qualità dell'alimento durante la cottura (MH Abdel-Haleem *et al.*, 2012).

### 1.4.3 Aspetti nutrizionali

La composizione media del grano khorasan KAMUT® è presente nella banca dati di composizione degli alimenti dell'USDA (<http://ndb.nal.usda.gov/>) ed è riportata in tabella 1.5, in comparazione alla composizione del grano tenero e del grano duro.

	<i>Grano Khorasan KAMUT®</i>	<i>Grano tenero</i>	<i>Grano duro</i>
<b>Acqua (g/100 g)</b>	11,07	10,42	10,94
<b>Energia (Kcal/100 g)</b>	337	340	339
<b>Proteine (g/100 g)</b>	14,54	10,69	13,68
<b>Grassi (g/100 g) di cui</b>	2,13	1,99	2,47
<b>saturi (g/100 g)</b>	0,196	0,368	0,454
<b>monoinsaturi (g/100 g)</b>	0,213	0,227	0,344
<b>polinsaturi (g/100 g)</b>	0,621	0,837	0,978
<b>Carboidrati (g/100 g)</b>	70,58	75,36	71,13
<b>Fibre totali</b>	11,1	12,7	n.d.
<b>Zuccheri</b>	7,84	0,41	n.d.
<b>Colesterolo</b>	0	0	0
<b>Vitamina C (mg/100 g)</b>	0	0	0
<b>Tiamina (mg/100 g)</b>	0,566	0,410	0,419
<b>Riboflavina (mg/100 g)</b>	0,184	0,107	0,121
<b>Niacina (mg/100 g)</b>	6,375	4,766	6,738
<b>Vitamina B<sub>6</sub> (mg/100 g)</b>	0,259	0,378	0,419
<b>Folati (µg/100 g)</b>	n.d.	41	43

<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg/100 g)</b>	n.d.	0	0
<b>Vitamina A (µg/100 g)</b>	1	0	0
<b>Vitamina E (mg/100 g)</b>	0.61	1.01	n.d.
<b>Vitamina D (µg/100 g)</b>	n.d.	0	0
<b>Vitamina K (µg/100 g)</b>	1.8	n.d.	n.d.
<b>Calcio (mg/100 g)</b>	22	34	34
<b>Ferro (mg/100 g)</b>	3.77	5.37	3.52
<b>Magnesio (mg/100 g)</b>	130	90	144
<b>Fosforo (mg/100 g)</b>	364	402	508
<b>Potassio (mg/100 g)</b>	403	435	431
<b>Sodio (mg/100 g)</b>	5	2	2
<b>Zinco (mg/100 g)</b>	3,68	3,46	4,16

**Tabella 1.5** Composizione chimica ed energetica del grano khorasan KAMUT<sup>®</sup>, del grano tenero e del grano duro. n.d. non determinabile (fonte: USDA Food Composition database (<http://ndb.nal.usda.gov/>)).

Nella farina di KAMUT<sup>®</sup>, rispetto alla semola e alla farina di grano comune, si ha un rapporto maggiore tra amilosio/amilopectina nella frazione glucidica, un maggiore contenuto di proteine e di sali minerali come potassio, magnesio, fosforo, zinco e ferro (Sofi et al., 2013). Inoltre, il contenuto di selenio della farina di KAMUT<sup>®</sup> e nei prodotti derivati (pane e pasta) è circa 10-20 volte rispetto a quella di farine prodotte da cereali coltivati in Italia, dove i terreni sono più poveri di tale minerale (Carnevali et al., 2014; Gianotti et al., 2011; Valli et al., 2016).

Il contenuto di fibra solubile in farina di KAMUT<sup>®</sup> è maggiore rispetto al grano duro Italiano di varietà Claudio (Di Silvestro et al., 2014). È stato inoltre verificato che le fibre solubili di grano KAMUT<sup>®</sup> e della varietà di grano Solex hanno un migliore effetto prebiotico e promuovono la crescita di batteri probiotici, quali *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, rispetto ad altre varietà di cereali antichi e moderni (Marotti et al., 2012).

Come già verificato per gli altri cereali antichi, anche nel KAMUT<sup>®</sup> si ha una maggiore concentrazione di carotenoidi rispetto al grano comune (Sofi et al., 2013); in particolare, si ha un alto contenuto di luteina (5,77 mg/g) (Abdel-Aal et al., 2007; Hidalgo et al., 2006). Al contrario, il contenuto di tocoli è più basso in KAMUT<sup>®</sup> rispetto alle varietà tradizionali, appartenenti a *T. monococcum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccum*, *Triticum durum*, *T. aestivum* ssp. *spelta*, *T. turgidum* ssp. *durum* (Abdel-Aa- et al., 2008).

Il grano KAMUT<sup>®</sup> e gli alimenti preparati con la farina derivata hanno un maggior contenuto di polifenoli totali, tra cui flavonoidi, rispetto a diverse varietà di grano comune (Abdel-Aal et al., 2008; Benedetti et al., 2012; Carnevali et al., 2014; Sofi et al., 2013). Ciò può derivare dal

minor contenuto di polifenolossidasi riscontrata in KAMUT<sup>®</sup> rispetto alle varietà tradizionali di grano, appartenenti a *T. monococcum* ssp. *monococcum*, *T. turgidum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccum*, *T. turgidum* ssp. *turanicum*, *T. turgidum* ssp. *polonicum*, *T. aestivum*, *T. aestivum* ssp. *spelta*, *T. aestivum* ssp. *aestivum* (Abdel-Aal *et al.*, 2008; Hidalgo *et al.*, 2013). Inoltre, i prodotti come pasta e pane preparati con KAMUT<sup>®</sup> hanno mostrato una più elevata capacità antiossidante e una maggiore quantità di composti antiossidanti rispetto ai prodotti preparati con farina di grano tradizionale (Benedetti *et al.*, 2012; Carnevali *et al.*, 2014; Sofi *et al.*, 2013).

La funzionalità attribuita al grano KAMUT<sup>®</sup> non è solo connessa all'elevato contenuto di nutrienti e di componenti bioattivi, ma anche alla presenza di altre molecole come peptidi bioattivi, piccoli frammenti proteici che hanno effetti benefici a livello fisiologico (Kitts *et al.*, 2003). I peptidi bioattivi che si formano a partire dalla fermentazione di substrati cerealicoli hanno ampiamente dimostrato di avere un'attività biologica correlata all'inibizione di ACE (*angiotensin I-converting enzyme*), implicato nella regolazione della pressione sanguigna (Rizzello *et al.*, 2008). Inoltre hanno dimostrato di avere attività antimicrobica e possibile attività antitumorale (Coda *et al.*, 2008; Coda *et al.*, 2011; Rizzello *et al.*, 2011).

#### **1.4.4 Studi *in vitro* e nell'animale da esperimento**

Nello studio di Valli *et al.* (2016), biscotti preparati con tre differenti farine integrali (KAMUT<sup>®</sup> khorasan coltivato in Nord America, grano khorasan coltivato in Italia e grano duro moderno) e due metodi di fermentazione (standard e fermentazione lattica) sono stati digeriti *in vitro* e supplementati a colture cellulari epatiche. Le cellule sono state esposte a stress sia ossidativo che infiammatorio aggiungendo acqua ossigenata o lipopolisaccaride di origine batterica. La supplementazione cellulare con la frazione bioaccessibile dei biscotti digeriti ha evidenziato un'attività protettiva nei confronti dell'infiammazione e dell'insulto ossidativo di origine esogena da parte di tutti le tipologie di biscotti analizzate; tuttavia la capacità protettiva variava da farina a farina: KAMUT<sup>®</sup> khorasan > khorasan italiano > grano duro.

Nello studio di Marotti *et al.* (2012) è stata invece confrontata la capacità prebiotica grani antichi e moderni. La frazione di fibra dietetica solubile da diverse varietà di grani è stata analizzata come potenziale substrato prebiotico per la proliferazione selettiva di *B. Pseudocatemulatum* B7003 e *L. Plantarum* L.12. Il grano KAMUT<sup>®</sup> e la varietà moderna *Solex* hanno dimostrato di promuovere maggiormente la crescita dei due ceppi testati *in vitro*.

Ad oggi, sono stati pubblicati tre studi riguardanti gli effetti funzionali di grano KAMUT<sup>®</sup> in animali da esperimento (Gianotti *et al.*, 2011; Benedetti *et al.*, 2012; Carnevali *et al.*, 2014).

In uno studio su ratti, Gianotti *et al.* (2011) hanno dimostrato l'effetto protettivo di pane prodotto con grano KAMUT<sup>®</sup>, rispetto a pane prodotto con grano duro integrale, verso uno stress ossidativo esogeno, dovuto ad un'iniezione intraperitoneale di doxorubicina (DOX). Inoltre, l'effetto protettivo è parso aumentare ulteriormente quando il pane era prodotto con lievitazione naturale.

Lo studio di Benedetti *et al.* (2012) ha poi confermato che una dieta basata di pane prodotto con KAMUT<sup>®</sup> determina, a livello del tessuto epatico, una completa protezione verso l'infiammazione indotta da DOX. Tale protezione è dovuta probabilmente alla presenza di acido ferulico e suoi derivati, presenti nel pane fatto con KAMUT<sup>®</sup> e non in quello con grano duro. Inoltre pane prodotto con KAMUT<sup>®</sup> ha incrementato la concentrazione di molecole antiossidanti a livello plasmatico e l'attività di enzimi antiossidanti, come glutazione perossidasi (GPX) e tioredoxina riduttasi (TrxR) in condizioni basali, ossia in assenza di DOX.

Alimentando i ratti con pasta di grano KAMUT<sup>®</sup> o di grano duro integrale si sono ottenuti risultati simili (Carnevali *et al.*, 2014). Dopo sette settimane, tutti i ratti alimentati con pasta di grano duro moderno hanno dimostrato un'alterazione morfologica della mucosa duodenale, con un'inusuale appiattimento dei villi intestinali e infiltrazione dei linfociti e un incremento di volume di follicoli linfatici nella milza. Questi segni di infiammazione non erano presenti in ratti alimentati con pasta fatta di grano KAMUT<sup>®</sup>.

#### ***1.4.5 Studi sull'uomo***

In letteratura è riportato un numero limitato di studi di intervento con alimenti a base KAMUT<sup>®</sup> sull'uomo; gli obiettivi delle ricerche pubblicate sino ad ora sono differenti e variano dalla valutazione dell'effetto sull'indice glicemico in individui sani allo studio dell'effetto cardiovascolare in individui sani oppure affetti da sindrome dell'intestino irritabile o patologie croniche ad eziologia infiammatoria (sindrome coronarica acuta, diabete).

Scazzina *et al.* (2008) hanno evidenziato che l'incorporazione di carote, soia e KAMUT<sup>®</sup> in una tortilla di grano determina un minore indice glicemico (GI) e un'alta capacità antiossidante dell'alimento prodotto. Tuttavia il GI di tortillas preparate solo con KAMUT<sup>®</sup> non differisce dalle tortillas standard, suggerendo un effetto sinergico tra tutti gli ingredienti.

Una dieta a base di grano KAMUT<sup>®</sup> per tre mesi in volontari sani è apparsa associata ad un maggior rilascio a livello fecale di SCFA e ad un lieve miglioramento della composizione del microbioma intestinale rispetto ad una dieta a base di frumento moderno integrale, utilizzato come controllo (Taneyo Saa *et al.*, 2014).

Nello studio di Sofi *et al.* (2013) su volontari sani, il consumo di pasta e prodotti da forno con KAMUT® khorasan per 8 settimane ha portato ad una riduzione significativa di colesterolo totale (-4%) e colesterolo LDL (-7,8%), oltre a una riduzione della glicemia (da 81,1 a 78,1 mg/dL) rispetto al consumo di analoghi prodotti preparati con grano duro moderno. Si è inoltre evidenziato un significativo incremento di elettroliti ematici quali magnesio e potassio, e una diminuzione di due indici di stress ossidativo. Il consumo di prodotti a base di KAMUT® ha anche significativamente ridotto il livello ematico di citochine pro-infiammatorie.

In un altro trial clinico in cross-over (Sofi *et al.*, 2014), 20 pazienti con la sindrome dell'intestino irritabile (*irritable bowel syndrome*, IBS) sono stati suddivisi in due gruppi, il primo ha consumato prodotti a base di KAMUT®, il secondo prodotti a base di grano moderno per sei settimane; per poi, dopo un periodo di wash-out di sei settimane, invertire il trattamento tra i 2 gruppi per altre sei settimane. Il consumo di prodotti a base di grano KAMUT® khorasan ha portato ad una riduzione significativa dei livelli di citochine pro-infiammatorie.

Un altro studio clinico in cross over ha coinvolto 22 pazienti con sindrome coronarica acuta (Whittaker *et al.*, 2015). In questo studio il consumo di prodotti a base di grano KAMUT® ha determinato un significativo decremento del colesterolo plasmatico totale e LDL, della glicemia e dell'insulinemia rispetto ai valori basali. Inoltre, è stata riscontrata una significativa riduzione della concentrazione plasmatica di specie reattive dell'ossigeno e TNF- $\alpha$ ., e una minor lipoperossidazione di monociti e linfociti circolanti

Infine, lo studio di Whittaker *et al.* (2017), cross-over, randomizzato e in doppio cieco. ha confrontato gli effetti di una dieta sostitutiva con KAMUT® khorasan rispetto a una dieta controllo, a base di prodotti di grano in pazienti affetti da T2DM. La dieta a base di KAMUT® ha determinato una riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo totale, colesterolo LDL, insulina e glucosio rispetto ai valori basali, così come una riduzione significativa in livelli di ROS, VEGF e il recettore antagonista di interleuchina 1 (IL1Ra). Non sono invece risultate differenze significative rispetto ai valori basali in seguito al consumo della dieta controllo.

## 2. *Diabete mellito*

Il diabete mellito è probabilmente uno dei più antichi disturbi conosciuti nell'uomo, di cui si riporta per la prima volta in un manoscritto Egizio circa 3000 a.C. (Ahmed *et al.*, 2002). In linea generale il diabete si presenta come una condizione in cui l'organismo non produce a sufficienza l'ormone pancreatico insulina o non risponde propriamente ad esso (Rother 2007, Tierney 2002). Nel 1936 è stata effettuata la distinzione tra diabete di tipo 1 e tipo 2 (Ahmed *et al.*, 2002). Si può affermare che l'insulino-deficienza porta al diabete di tipo I, o insulino-dipendente, al quale si ascrive circa il 10% dei diabetici. L'insulino-resistenza (IR) produce il diabete di tipo II, o insulino-indipendente, molto più diffuso (90% dei diabetici):

- **Tipo 1 (DMT1):** diabete insulino-dipendente, deriva dall'incapacità dell'organismo di produrre insulina e prevede terapia sostitutiva con insulina ricombinante.
- **Tipo 2 (T2DM):** diabete non insulino-dipendente, molto più complesso del primo, risulta dalla resistenza insulinica, una condizione in cui le cellule dell'organismo non sono in grado di rispondere all'insulina in modo appropriato. Questo porta le cellule pancreatiche  $\beta$  a produrre più insulina per contrastare l'iperglicemia, senza che si abbia una riduzione proporzionale della glicemia.

Molte altre forme di diabete mellito sono classificate separatamente. Alcuni esempi includono il diabete congenito dovuto a difetti genetici della secrezione di insulina, il diabete collegato alla fibrosi cistica, il diabete steroideo indotto da elevati livelli di glucocorticoidi, e diverse forme di diabete monogenico (*American Diabetes Association*, 2014).

La patologia diabetica può presentare numerose complicanze, tra cui complicanze acute che includono l'ipoglicemia, la chetoacidosi diabetica o il coma iperosmolare non chetoacidotico (Edge *et al.*, 2006), che possono verificarsi se la malattia non è controllata in modo adeguato.

Complicanze a lungo termine di grave entità includono malattie cardiovascolari, insufficienza renale, retinopatia che può causare cecità, diversi tipi di neuropatia, e danno microvascolare (Gaede *et al.*, 2003), da cui può derivare ad esempio disfunzione erettile (*America diabet Association*, 2014) e difficoltà nella guarigione delle ferite. Quest'ultima complicazione, in particolare alle estremità inferiori, può portare alla cancrena, che talora richiede l'amputazione (Malmsted *et al.*, 2015). Il trattamento adeguato del diabete, come anche l'aumentata attenzione al controllo della pressione del sangue e dello stile di vita possono ridurre il rischio della maggior parte delle complicanze croniche (Olokoba *et al.*, 2012).

## 2.1 Epidemiologia

Nel mondo industrializzato il diabete è la causa principale di morte prematura per problemi cardiovascolari e renali (Susan *et al.*, 2010). A livello epidemiologico il T2DM è diventato un grave problema di salute pubblica, in quanto il numero di persone affette da questa patologia è in aumento in ogni paese. Si stima che 366 milioni di persone fossero diabetiche nel 2011, e nel 2013, la *International Diabet Federation* ha stimato che 382 milioni di adulti tra i 20 e i 70 anni avevano T2DM. Di questi, l'80% viveva in paesi a basso e medio reddito (Shaw *et al.*, 2010). La crescita e l'invecchiamento della popolazione e l'urbanizzazione, associati al cambiamento degli stili di vita, si prevede possano aumentare l'incidenza di diabete al 54% entro il 2030. Anche secondo la *International Diabetes Federation* (2013) il numero di persone affette da diabete potrebbe raggiungere i 592 milioni entro il 2035.

L'incidenza di T2DM varia da una regione geografica all'altra, a dimostrazione del fatto che i fattori ambientali e lo stile di vita incidono su questa patologia che viene definita multifattoriale (Mbanya, 2009). Si prevede che T2DM nelle prossime due decadi risconterà il maggiore aumento in paesi in via di sviluppo. Ad oggi infatti le aree particolarmente affette da questo disturbo sono la Cina e l'India, dove la prevalenza della patologia è significativamente cresciuta negli ultimi anni nonostante una bassa incidenza di obesità (Hu, 2011). La maggior parte di DM in Africa risulta essere di tipo 2, con meno del 10% di DM di casi di tipo 1 (Mbanya, 2009). Un report del 2011 del CDC (*Centre for Disease Control and Prevention*) ha stimato che DM ha colpito circa 25,8 milioni di persone negli Stati Uniti (7,8% della popolazione) nel 2011, tra cui il 90-95% affetti da T2DM (CDC, 2011).

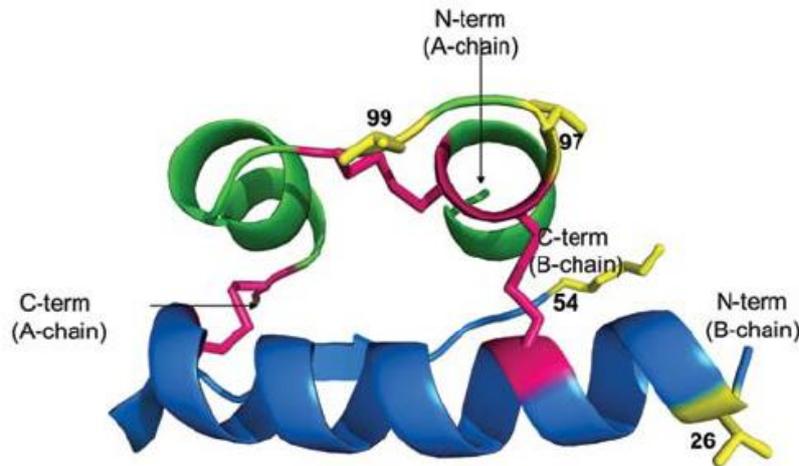
Studi epidemiologici hanno provato a evidenziare come i comportamenti, lo stile di vita e i rischi biologici potessero influenzare T2DM, ed è emerso che obesità e elevato BMI sono i fattori di rischio principali (De Fronzo *et al.*, 2015). Altri fattori di rischio importanti sono il fumo e la sedentarietà (Hull, 2011). Tuttavia anche la genetica ha un ruolo importante, sebbene il diabete non sia attribuibile a mutazioni geniche (De Fronzo *et al.*, 2015).

## 2.2 Attività insulinica

L'insulina è un ormone di natura proteica sintetizzato dal pancreas endocrino nelle cellule  $\beta$  delle isole di Langerhans. È costituito da due catene polipeptidiche A e B: la catena A è composta da 21 aminoacidi, mentre la catena B da 30 aminoacidi. La catena A ha un'elica N-terminale legata ad una elica anti-parallela C-terminale; la catena B ha un'elica centrale. Le due catene sono unite fra di loro da due ponti disolfuro che collegano le eliche N-e C-terminali della catena A all'elica della catena B (Figura 2.1). La presenza dei ponti disolfuro stabilisce la struttura tridimensionale

dell'insulina, da cui dipende l'attività biologica dell'ormone (Jimenez *et al.*, 2002). Nella proinsulina, un peptide di connessione lega l'estremità N-terminale della catena A all'estremità C-terminale della catena B (Dodson & Steiner, 1998).

Questo ormone è il principale fattore di regolazione del metabolismo e dell'accumulo dei substrati energetici introdotti con gli alimenti.



**Figura 2.1** *Struttura 3D dell'insulina umana. La catena A (verde) è legata covalentemente tramite ponti disolfuro (rossi) alla catena B (blu) dell'insulina (Malik et al., 2012).*

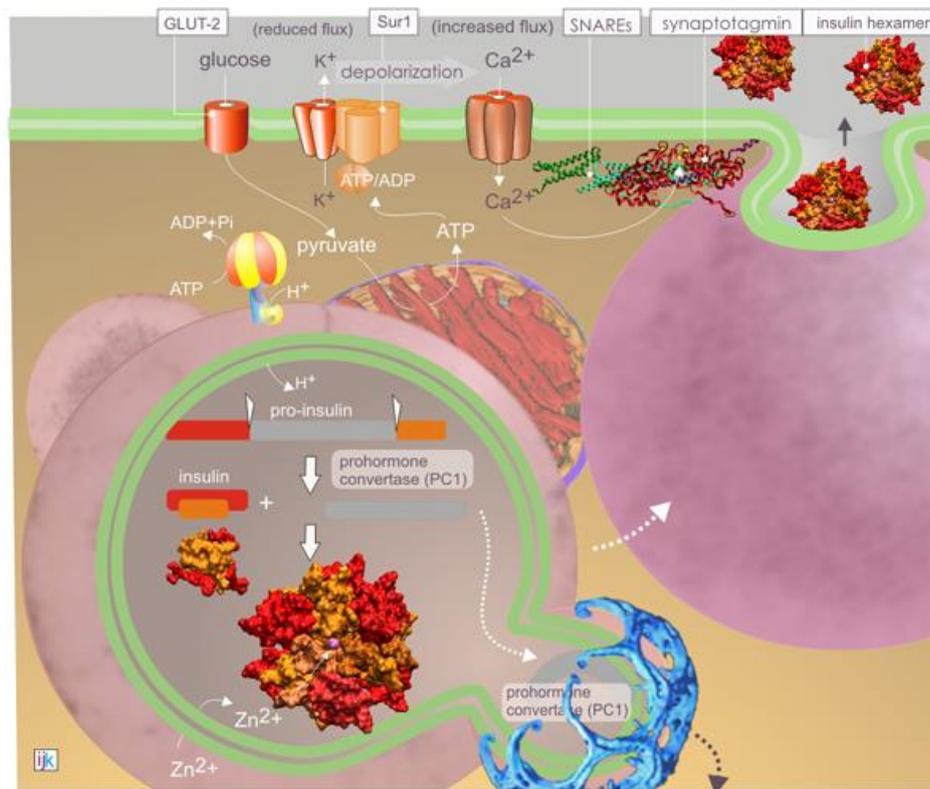
### **2.2.1 Sintesi e secrezione di insulina**

La sintesi e la secrezione di insulina è regolata da nutrienti e non-nutrienti, nel contesto di stimoli ambientali e di una interazione tra ormoni (Malaisse, 1997). L'insulina viene sintetizzata dalle cellule  $\beta$  pancreatiche come precursore proinsulina nei ribosomi del reticolo endoplasmatico (RER). Le vescicole secretorie trasferiscono proinsulina da RER all'apparato del Golgi, il cui ambiente ricco di zinco e calcio favoriscono la formazione di proinsulina contenente zinco (Figura 2.2). Gli enzimi contenuti nell'apparato del Golgi, esplicano la loro funzione al di fuori di esso e convertono proinsulina ad insulina e peptide C (Simonson *et al.*, 1997).

Durante il digiuno o stato basale, le cellule pancreatiche  $\beta$  secernano 0,25-1,5 unità di insulina all'ora: questo è sufficiente per permettere al glucosio l'entrata nelle cellule insulino-dipendenti (Wilcox, 2005). Questo livello è fondamentale poiché previene l'idrolisi incontrollata dei trigliceridi e limita la gluconeogenesi, mantenendo i normali livelli di glucosio ematico. L'insulina basale è il 50% della secrezione totale di insulina nelle 24 ore. Dopo la secrezione nella vena porta il 60% viene smaltito dal fegato, quindi la concentrazione di insulina della vena portale che raggiunge il fegato è il triplo rispetto a quello della circolazione periferica.

Il glucosio induce il rilascio di insulina in un minuto, con un picco a 3-5 minuti ed esaurendo in 10 minuti (Wilcox, 2005). L'entrata del glucosio nelle cellule  $\beta$  del pancreas viene rilevata dalla

glucochinasi, che fosforila il glucosio a glucosio-6-fosfato (G6-P), generando ATP (De Lonlay & Saudubray, 2000) e provocando la secrezione di insulina (Soria *et al.*, 2004) (Figura 2.2).



**Figura 2.2** *Maturazione dell'insulina nelle vescicole secrete nell'apparato del Golgi e successivo rilascio dalle cellule  $\beta$  pancreatiche mediato dal glucosio*

La seconda fase della secrezione insulinica comincia più lentamente inizia poco dopo la fase orale della digestione ma non è evidente fino a 10 minuti dopo, dura per il periodo di iperglicemia ed è proporzionale alla concentrazione di glucosio (Kahn *et al.*, 1997). Questa fase implica la secrezione sia dell'insulina conservata nei granuli, sia nuova sintesi di insulina.

La secrezione di insulina in questa seconda fase è molto più modulabile ed è influenzata dallo svuotamento gastrico e dalla motilità intestinale che stimolano l'attività di ormoni intestinali e stimoli neurali che influenzano l'assorbimento gastrico di glucosio (Kahn *et al.*, 1997). Gli ormoni stimolati dal glucosio sono noti come incretine e amplificano il rilascio di insulina. Approssimativamente il 60-70% della secrezione insulinica dipende dal rilascio di questi ormoni, principalmente GLP-1 e GIP, dalle cellule L e K intestinali.

La somatostatina, ormone peptidico pancreatico inibisce la secrezione di insulina (Havel, 2001). Anche la leptina e l'adipopectina, ormoni peptidici prodotti dal tessuto adiposo, intervengono nella regolazione della sintesi di insulina (Nelson *et al.*, 2008). L'adiponectina, prodotta solo nel tessuto adiposo in maniera inversamente proporzionale alla quantità di tessuto adiposo stesso, *up-regola* il segnale insulinico (Yadav *et al.*, 2013). La leptina, che ha un ruolo fondamentale

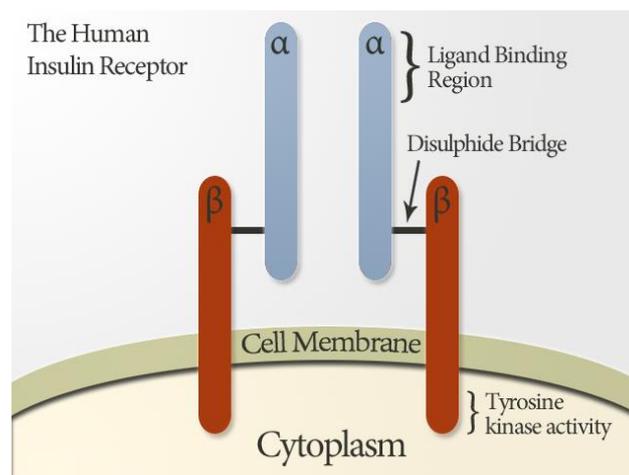
nella regolazione del peso corporeo poiché inibisce la sensazione di fame quando le riserve di grasso sono sufficienti (Nelson *et al.*, 2008), riduce il segnale insulinico (Yadav *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Segnale insulinico e trasporto dei nutrienti

L'insulina, una volta rilasciata nel circolo ematico, esercita i suoi effetti biologici nelle cellule target, principalmente cellule muscolari ed adipose.

L'insulina si lega al suo recettore specifico di membrana con attività tirosino-chinasica presente sulle cellule target; questo tipo di recettore ha anche attività enzimatica e quando viene attivato dal suo ligando catalizza una serie di eventi di fosforilazione a cascata di diverse proteine citosoliche e di membrana (Saltiel & Kahn, 2001). Il segnale giunge fino al nucleo dove stimola l'espressione di geni specifici (Nelson *et al.*, 2008).

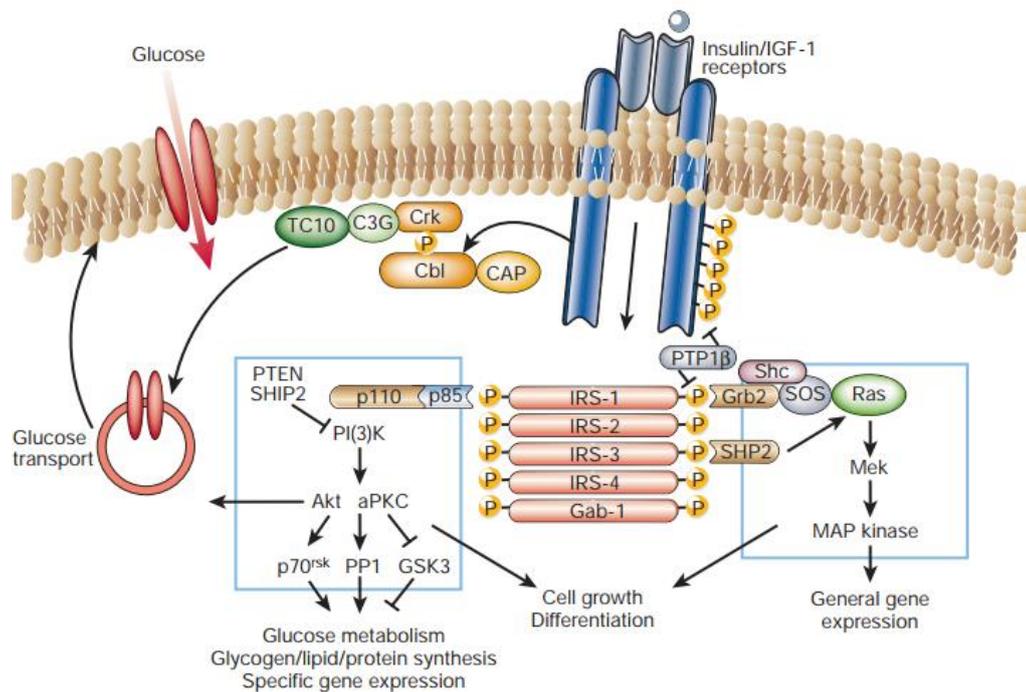
Il recettore dell'insulina INSR è una glico-proteina eterotetrameric, costituita da due subunità  $\alpha$  identiche collocate esternamente rispetto alla membrana plasmatica (Kido *et al.*, 2001), e da due subunità  $\beta$  transmembrana (Figura 2.3) rivolte verso il citosol con le loro subunità carbossiterminali. Le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  sono legate tramite ponti disolfuro.



**Figura 2.3 Subunità del recettore cellulare dell'insulina**

L'insulina si lega alla subunità  $\alpha$  del recettore e ne produce un cambiamento conformazionale che permette all'ATP di legarsi al componente intracellulare della subunità  $\beta$  (Saltiel & Kahn 2001). L'ATP fosforila la subunità  $\beta$  conferendole attività tirosino-chinasica, e ciascuna subunità  $\beta$  fosforila tre residui critici di Tyr vicino all'estremità carbossiterminale dell'altra subunità  $\beta$  presente nel tetramero  $(\alpha\beta)_2$ . Questa autofosforilazione apre il sito attivo dell'enzima, che può quindi fosforilare i residui di Tyr presenti in altre proteine bersaglio intracellulari note come IRS (*Insuline Responsive Substrates*) (Sun *et al.*, 1991). IRS possono successivamente legarsi ad altre

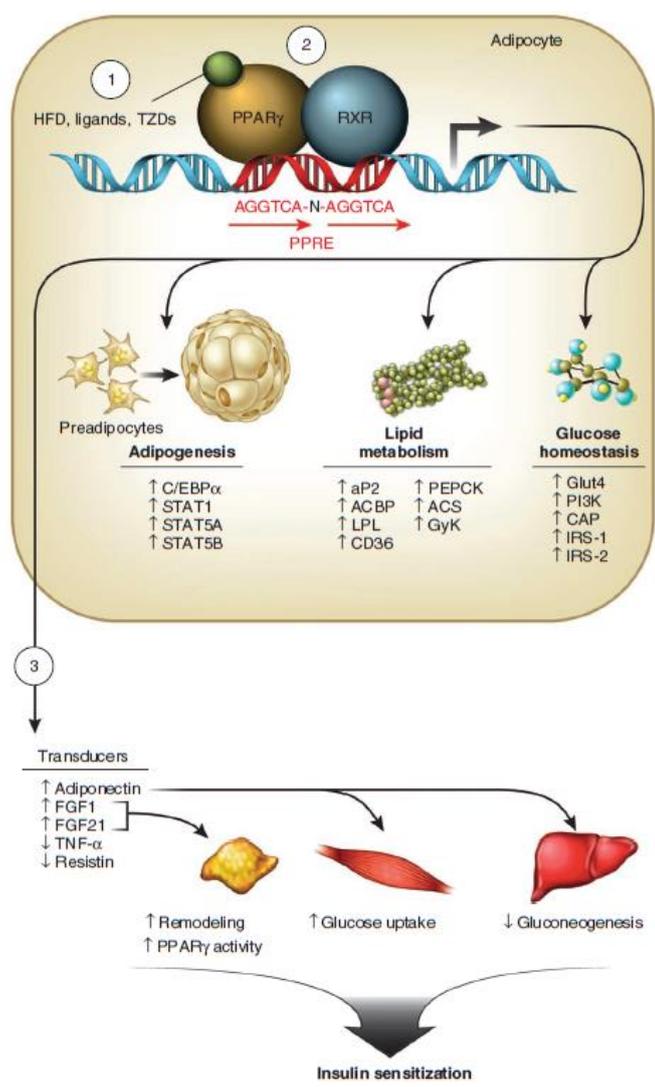
molecole segnale che mediano l'azione cellulare dell'insulina (Kido *et al.*, 2001). La via del segnale dell'insulina è rappresentata in Figura 2.4.



**Figura 2.4** Le tre principali vie di trasduzione del segnale insulinico sono mediate da Ras/MAPK, Cbl/CAP e PI3K/AKT (Saltiel & Kahn, 2001)

Le vie cellulari attivate dall'insulina favoriscono la traslocazione dei trasportatori del glucosio (GLUT) sulla membrana cellulare, permettendo così la captazione del glucosio e del fruttosio dal circolo ematico. GLUT sono proteine integrali di membrana, codificate dai geni classificati come *SLC2* (Hajiaghaalipour *et al.*, 2015). Nonostante siano stati identificati 12 sub-tipi (Joost *et al.*, 2002), i più studiati sono i GLUT 1–4. Questi trasportatori differiscono nella *K<sub>m</sub>* per il trasporto massimale di glucosio e nella dipendenza da insulina.

GLUT4, codificato da *SLC2A4*, è responsabile del trasporto di glucosio sotto lo stimolo di insulina (Lin *et al.*, 2010) nelle cellule adipose e muscolari, ed ha una *K<sub>m</sub>* più alta per il glucosio, quindi si attiva nel momento in cui la concentrazione di glucosio è alta. La sua sintesi è stimolata da attivatori trascrizionali come C/EBP e PPARs (Karnieli & Armoni, 2008; Ahmadian *et al.*, 2013) (Figura 2.5).



**Figura 2.5 Ruoli molteplici di PPAR $\gamma$  (Ahmadian *et al.*, 2013)**

Altro trasportatore nel muscolo e nel tessuto adiposo è GLUT1, presente anche nelle cellule cerebrali, dove questo recettore è in grado di trasportare intracellularmente il glucosio anche in presenza di bassa concentrazione del monosaccaride e senza l'ausilio dello stimolo insulinico (Hajiaghaalipour *et al.*, 2015).

GLUT2 è espresso prevalentemente negli epatociti (Hajiaghaalipour *et al.*, 2015), ma anche in cellule tubulari convolute prossimali ai reni, in cellule intestinali e cellule  $\beta$  pancreatiche (Cramer *et al.*, 1992). I GLUT2 sono trasportatori a bassa affinità con il substrato (Schui, 1997), per cui la velocità del trasporto è direttamente proporzionale alla concentrazione del glucosio nel sangue.

GLUT3 è espresso principalmente in neuroni mammiferi e trofoblasti e poco nelle cellule epatiche e cardiache (Simpson *et al.*, 2008; Mueckler & Thorens, 2013); svolge un ruolo

importante nell'alterazione placentale osservata in donne con diabete gravidico (Hajiaghaalipour *et al.*, 2015).

### **2.3 Il diabete mellito di tipo 2**

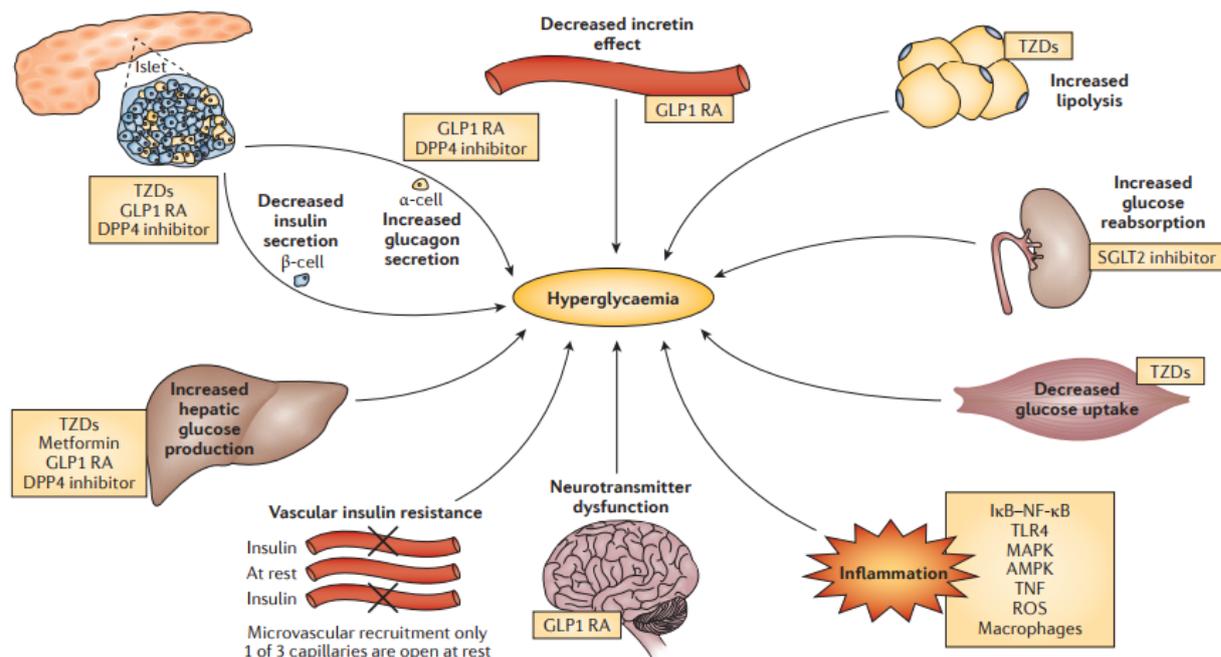
I principali fattori fisiopatologici nel T2DM sono:

1. La resistenza all'azione dell'insulina nel muscolo e nel tessuto adiposo;
2. La ridotta secrezione pancreatica di insulina;
3. L'incontrollata produzione epatica di glucosio, peggiorati da un'azione deficitaria dell'insulina nel tessuto adiposo.

La patologia è progressiva e si manifesta con una prima fase antecedente di insulino-resistenza (IR), seguito da una condizione di iperglicemia, che insieme costituiscono una condizione pre-diabetica in cui si hanno livelli alterati di glucosio a digiuno, alterata tolleranza al glucosio o elevati livelli di emoglobina glicata A1c (HbA1c) (De Fronzo *et al.*, 2015).

La resistenza insulinica è influenzata da fattori sia genetici che ambientali, come la dieta, lo stress, l'attività fisica (Lin *et al.*, 2010), il sonno (Zhu *et al.*, 2017). Gli individui insulino-resistenti mostrano frequentemente un insieme di altre caratteristiche, che includono obesità viscerale, dislipidemia, ipertensione, iperinsulinemia, alterata fibrinolisi, disfunzioni endoteliale, iperuricemia, infiammazioni vascolari, ed aterosclerosi prematura (Stern 1999; Lin *et al.*, 2010).

Tuttavia l'IR non causa da sola il diabete. La patologia si sviluppa nel momento in cui l'IR si associa ad un deficit funzionale delle cellule  $\beta$  pancreatiche (Hajiaghaalipour *et al.*, 2015). Questi due eventi sono accompagnati da uno stato di infiammazione cronica, e insieme ostacolano il controllo dei livelli di glucosio e portano allo sviluppo di complicanze vascolari (De Fronzo *et al.*, 2015). Le anomalie fisiopatologiche che compromettono l'omeostasi del glucosio sono riassunte in Figura 2.6.



**Figura 2.6 Meccanismi fisiopatologici che contribuiscono sinergicamente all'instaurazione di T2DM (De Fronzo et al., 2015)**

### 2.3.1 Meccanismo dell'insulino-resistenza (IR)

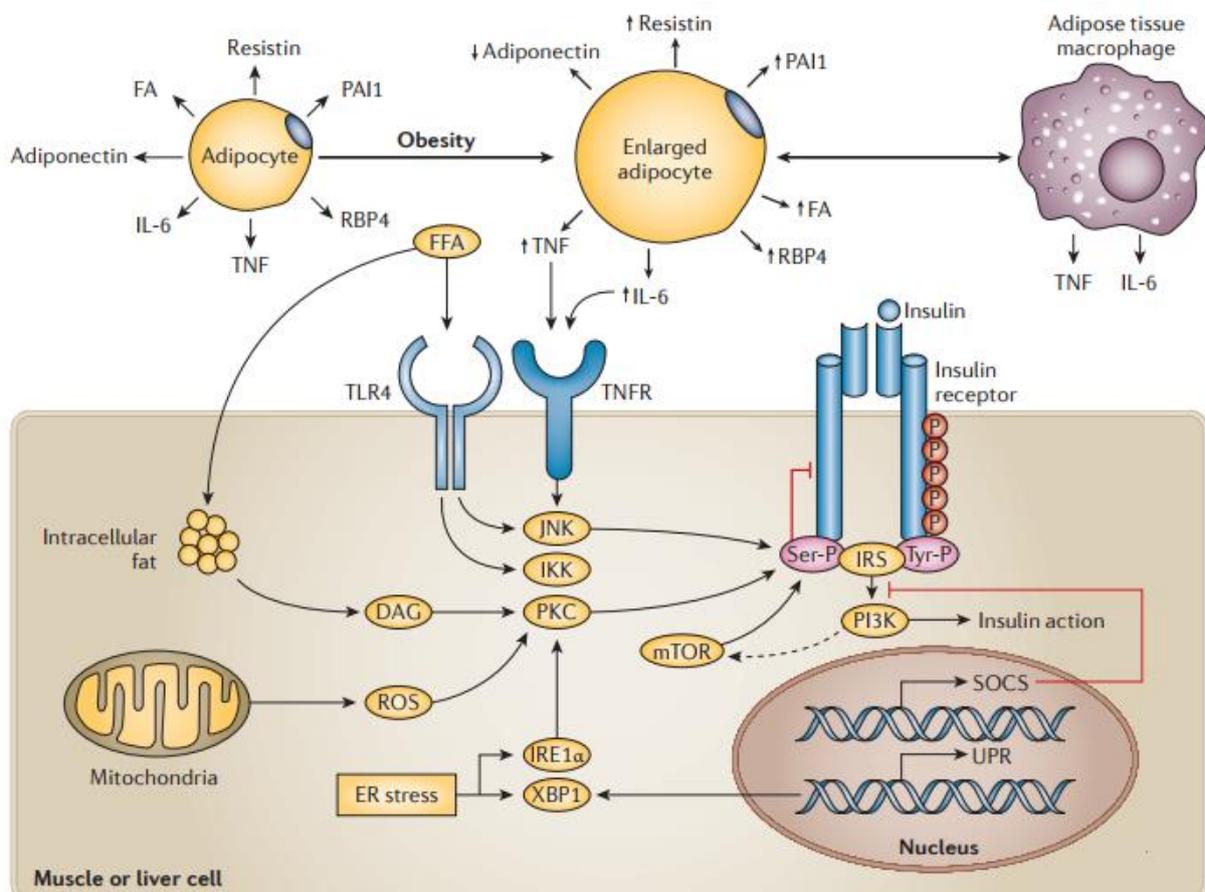
L'IR è una condizione metabolica caratterizzata da una ridotta capacità dell'insulina di regolare efficacemente il metabolismo dei substrati energetici. In questa condizione l'organismo ha una ridotta capacità di eliminare un carico di glucosio dal circolo in risposta all'azione esercitata dall'insulina.

La resistenza insulinica, tramite alterazioni nel segnale cellulare di insulina, si verifica nei tessuti definiti come insulino-dipendenti, o tessuti target tra cui tessuto adiposo, fegato e tessuto muscolare sono i principali. Nel muscolo vi sono alterazioni nel segnale insulinico, nel trasporto e nella fosforilazione di glucosio, nella sintesi di glicogeno, nel complesso della piruvato-deidrogenasi e nell'attività mitocondriale ossidativa (Pan *et al.*, 2011; Samuel, & Shulman, 2012). A livello epatico, l'IR con deficienza insulinica, iperglucagonemia, aumento di substrato disponibile incrementano la gluconeogenesi, responsabile dell'iperglicemia a digiuno (De Fronzo, 2009), a cui contribuisce anche l'incremento nella gluconeogenesi renale (Gerich *et al.*, 2001). Nell'endotelio la resistenza insulinica altera l'effetto vasodilatatore insulinico, riducendo sia l'entrata di insulina stessa, sia quella di glucosio (Barrett *et al.*, 2011; Baron, 1994).

#### 2.3.1.1 Meccanismi molecolari dell'IR

Il corretto funzionamento del segnale insulinico a livello cellulare deriva dalla fosforilazione dei residui tirosinici presenti sulle proteine IRS, che attivano la via del segnale PI3K (Cusi *et al.*,

2000) con conseguente incremento della traslocazione di GLUT4 sulla membrana plasmatica e inibizione del fattore di trascrizione FoxO1, implicato nella gluconeogenesi (De Fronzo *et al.*, 2015). Nel T2DM si osserva una fosforilazione di residui serinici, e non tirosinici, di IRS con conseguente malfunzionamento della via PI3K (De Fronzo *et al.*, 2015) e quindi del segnale insulinico nella cellula (Zeyda *et al.*, 2009). Le cause della fosforilazione serinica sono multifattoriali ed includono accumulo di lipidi, disfunzione mitocondriale, danno ossidativo, infiammazione e stress del reticolo endoplasmatico (De Fronzo *et al.*, 2015). Questi fenomeni di alterata regolazione metabolica portano alla produzione di molecole ad azione pro-infiammatoria (Akira *et al.*, 2006; Shoelson *et al.*, 2006). In alcuni casi si verifica una vera e propria degradazione di IRS, che contribuisce a sua volta a IR (De Fronzo *et al.*, 2015). I meccanismi molecolari alla base dell'IR sono rappresentati nella Figura 2.7.



**Figura 2.7 Meccanismi che inibiscono l'azione dell'insulina (De Fronzo *et al.*, 2015)**

Stimoli di stress e infiammazione attivano JNK, IKK e PKC, inibendo il segnale insulinico. Negli adipociti, l'IR e l'infiammazione stimolano la produzione di acidi grassi e la produzione di citochine infiammatorie come IL-6, TNF e resistina. Le adipochine sintetizzate, come adiponectina migliorano IR, mentre RBP4 (retinol-binding-protein) incrementano e possono contribuire ad insulino-resistenza. PAI1 (plasminogen activator inhibitor) non porta IR ma è correlata nell'obesità, come l'accelerazione di aterosclerosi e T2DM. Questi fattori contribuiscono all'accumulo di metaboliti tossici come DAG (diacilglicerolo), ceramide e acil-CoA nei monociti ed epatociti, che alterano il segnale insulinico (IRS-PI3K pathway) e attivano pathway infiammatori (JNK, IKK e MAPK), che alterano il segnale insulinico e la

*trasduzione del segnale. La disfunzione mitocondriale predisposta all'accumulo di DAG, all'accumulo di PKC e alla generazione di ROS e a stress del reticolo endoplasmatico incrementano IR.*

#### **2.3.1.4 Stress ossidativo cellulare e mitocondriale**

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono contribuire ad IR e alla conseguente alterata secrezione insulinica (Kim *et al.*, 2008). Numerosi studi hanno dimostrato che in condizioni di stress ossidativo il segnale insulinico è alterato per cui le cellule epatiche, lipidiche e muscolari non riescono a rispondere in maniera adeguata al segnale ormonale (Rains & Jain, 2011).

L'accumulo intracellulare di ROS può derivare da scariate condizioni (Evans *et al.*, 2003). In particolare, l'iperglicemia induce stress ossidativo in quanto stimola la produzione di prodotti di glicazione, citochine e prostanoide con incremento di esosamine (Banerjee & Vats, 2014).

I ROS sono in grado di attivare serina-chinasi quali PKC, mTOR, GSK3, che alterano il segnale insulinico sempre tramite la fosforilazione della serina delle IRS (Bloch Damti & Bashan, 2005), causando IR. PKC può indurre l'espressione del fattore VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), implicato nell'anormalità del flusso ematico e in modifiche di permeabilità delle cellule endoteliali (Rains & Jain, 2011). Come conseguenza si ha una risposta infiammatoria che porta alla progressione di complicanze vascolari in pazienti diabetici (Behl & Kotwani, 2015).

#### **2.3.2 Sviluppo e progressione del T2DM**

L'IR non è un elemento sufficiente per sviluppare T2DM. Infatti soggetti obesi con IR possono non divenire diabetici mentre la patologia può essere osservata in soggetti normopeso con un'apparente normale sensibilità all'insulina.

Negli stadi precoci d'IR viene mantenuta una normale glicemia grazie a processi adattativi che avvengono nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche, che divengono iperplastiche e iperattive dando origine al cosiddetto fenomeno di iperinsulinemia compensatoria in cui l'abbondante secrezione d'insulina cerca di compensare la resistenza insulinica e mantenere i livelli normali di glucosio ematico. Questo stadio è caratterizzato da iperinsulinemia e normoglicemia (Hajiaghaalipour *et al.*, 2015). Poichè la secrezione insulinica è correlata alla sensibilità insulinica tramite una funzione iperbolica (Seino *et al.*, 2011), col perdurare di questa situazione nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche insorgono delle disfunzioni che riducono la secrezione d'insulina, che seppur ancora piuttosto elevata non è più in grado di compensare l'IR. La ragione di questo fallimento deriva da una combinazione tra la diminuzione della massa delle cellule  $\beta$  pancreatiche e una deficitaria secrezione insulinica (De Fronzo *et al.*, 2015). Molti meccanismi sono stati proposti per spiegare questo fenomeno come lo stress del reticolo endoplasmatico (Harding *et al.*, 2002), iperglicemia cronica (Donath *et al.*, 2004), iperlipidemia cronica (Poitout *et al.*, 2002), stress ossidativo

(Kaneto *et al.*, 2006), deposizione amiloide, lipotossicità e glucotossicità (Donath *et al.*, 2009) e si è notato che tutti questi fattori inducono una risposta infiammatoria (Donath *et al.*, 2008; Ehses *et al.*, 2009). All'inizio la risposta infiammatoria è attenuata per promuovere la rigenerazione delle cellule  $\beta$ , ma quando diventa cronica, la situazione si complica e si mette in atto una risposta auto-infiammatoria che spinge le cellule  $\beta$  ad apoptosi (Donath *et al.*, 2009).

La scarsità delle cellule  $\beta$ -pancreatiche compromette la secrezione insulinica, inducendo un ulteriore aumento della concentrazione glicemica ematica: questo porta a stadi progressivi di iperglicemia (McPhee *et al.*, 2010). Quando l'iperglicemia a digiuno eccede i 140 mg/dL, le cellule pancreatiche non riescono a mantenere un'elevata secrezione insulinica, la glicemia continua ad aumentare e si innalza la produzione epatica di glucosio (Sharabi *et al.*, 2015), legata anche ad una maggiore disposizione di substrati gluconeogenici e una maggiore sensibilità al glucagone.

### ***3. Scopo della tesi***

Attualmente, sono oltre 3 milioni le persone affette da diabete in Italia (ISTAT, 2017), ossia il 5,3% della popolazione. L'incidenza di questa patologia pare destinata ad aumentare in futuro, come evidenziato dalla Federazione Internazionale del Diabete (IDF) che ha stimato che entro il 2040 il numero di persone diabetiche raggiungerà quota 642 milioni nel mondo (IDF, 2017). Il diabete rappresenta quindi un elevato costo economico e sociale per la sanità, in rapporto alla frequenza e al correlato carico di complicanze e disabilità.

L'insorgenza del T2DM è correlata sia a fattori socio-economici che a fattori comportamentali individuali. Sono ormai numerose le evidenze epidemiologiche che dimostrano la correlazione tra un adeguato stile di vita e la prevenzione dell'insorgenza (prevenzione primaria) e dell'evoluzione (prevenzione secondaria) della malattia diabetica (WHO, 2017). Il primo approccio terapeutico nelle forme lievi di T2DM si basa essenzialmente su cambiamenti della dieta e dello stile di vita (consumo di alimenti vegetali ricchi di fibra e/o con basso indice glicemico, attività fisica costante).

La quantità e il tipo di carboidrati ingeriti sono il principale determinante della glicemia postprandiale. L'apporto di carboidrati complessi (amidi) diversamente da quanto viene creduto comunemente non andrebbe ridotto nei pazienti diabetici. Infatti, la quantità di energia fornita dai carboidrati deve comunque rappresentare il 45-60% dell'energia totale, e non scendere mai al di sotto dei 130 g/die (AMD & SID, 2016). Importante è invece limitare l'assunzione di carboidrati semplici (zuccheri). Inoltre, una dieta ricca carboidrati non glicemici (fibre alimentari) risulta essere efficace nel migliorare il controllo glicemico e lipidico dei pazienti con T2DM, e utile nella prevenzione della sua insorgenza nella popolazione sana o in pazienti diabetici, in sovrappeso od obesi, a rischio di complicanze vascolari.

La dieta rappresenta il maggiore fattore di rischio modificabile di questa patologia cronica, pertanto la ricerca in ambito nutrizionale nell'ultimo decennio si è orientata verso lo studio di interventi volti a ridurre il rischio di insorgenza e di possibili complicanze attraverso il mantenimento di valori di glucosio e lipidi plasmatici e dei livelli pressori il più possibile vicini alla normalità.

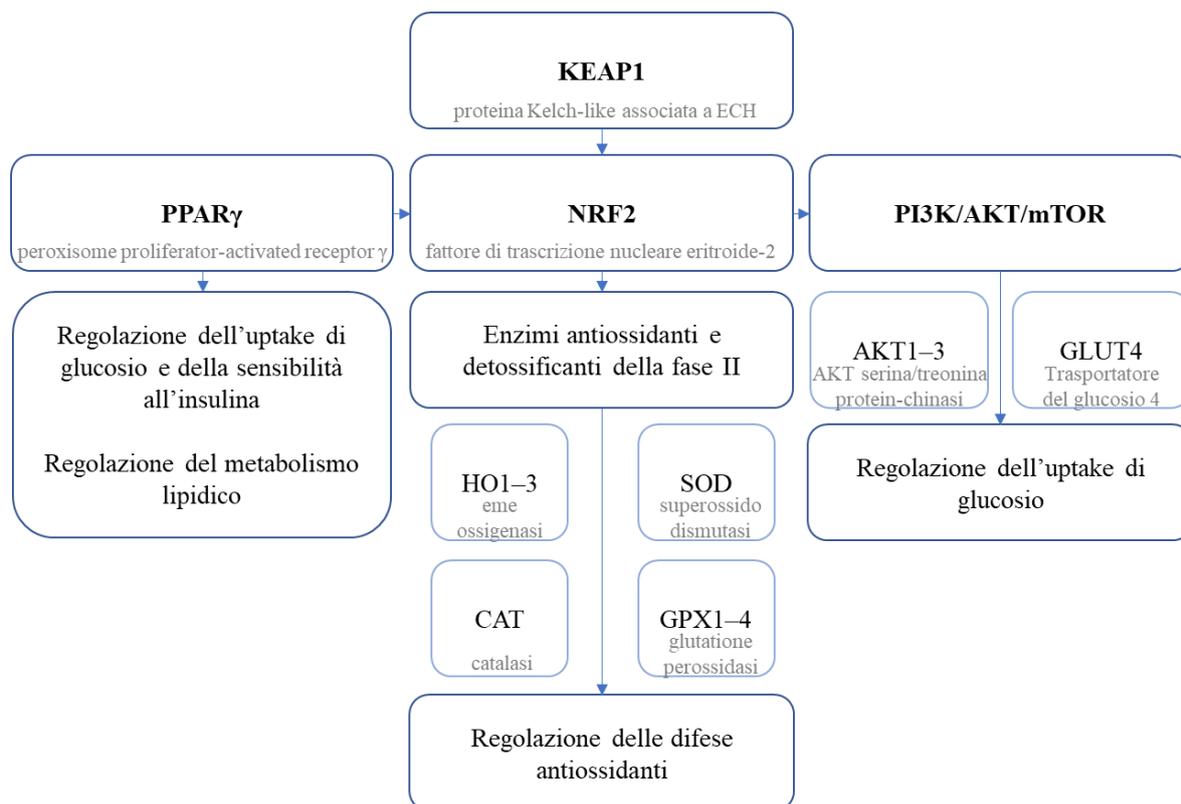
Nell'ambito di tale contesto, l'Università di Firenze, in collaborazione con l'Azienda-Ospedaliero-Universitaria Careggi di Firenze, ha condotto recentemente una sperimentazione clinica orientata a valutare se il consumo regolare di alimenti a base di un cereale antico, il grano khorasan KAMUT<sup>®</sup>, potesse agire da coadiuvante alle terapie nel controllo glicemico.

Durante lo studio, randomizzato, in doppio cieco e crossover, soggetti volontari con T2DM sono stati divisi in due gruppi a cui è stato chiesto di consumare prodotti a base di grano KAMUT® o prodotti a base di grano moderno per 8 settimane. Tutti i prodotti erano semi-integrali e provenienti da agricoltura biologica. Dopo un periodo di wash-out di 8 settimane, è stato effettuato il cross-over per ulteriori 8 settimane.

Lo studio, i cui risultati sono stati pubblicati recentemente sull'*European Journal of Nutrition* (Whittaker *et al.*, 2017), ha evidenziato che il consumo di prodotti a base di KAMUT® ha apportato un significativo miglioramento di numerosi fattori di rischio cardiovascolare, quali colesterolo plasmatico totale (-3,7%) e colesterolo LDL (-3,4%), glicemia (-9,1%) e insulinemia (-16,3%), oltre a un miglioramento del profilo ossidativo-infiammatorio, indipendentemente dall'età, dal sesso, dai fattori tradizionali di rischio, dai farmaci assunti e dalle abitudini alimentari. Al contrario, nessun effetto significativo è stato rilevato a seguito del consumo di grano moderno.

Lo studio oggetto di questo elaborato di laurea si inserisce nello studio sopradescritto. Durante la sperimentazione clinica sono stati infatti raccolti campioni di sangue periferico con l'obiettivo di effettuare ulteriori approfondimenti e indagini bio-molecolari. Le cellule ematiche sono in grado di esprimere l'80% dei geni codificanti del genoma umano (Liew *et al.*, 2006), pertanto sono un modello idoneo per gli studi molecolari. Inoltre, sono prelevabili in modo scarsamente invasivo. Lo scopo è stato valutare i cambiamenti nell'espressione di specifici geni a livello sistemico eventualmente indotti dai trattamenti dietetici, al fine di chiarire il/i meccanismo/i d'azione alla base del miglioramento del profilo glicemico, lipidico e infiammatorio evidenziati dalla sperimentazione clinica dopo dieta a base di KAMUT®. Nonostante le chiare evidenze cliniche, le basi molecolari di tali effetti associati al consumo di prodotti a base KAMUT® restano infatti da chiarire.

Basandosi sui risultati di biochimica clinica ottenuti nello studio è stato possibile ipotizzare un coinvolgimento di vie metaboliche coinvolte nella detossificazione, nell'omeostasi glicemica e nel metabolismo lipidico. Su questa base, si è deciso di valutare l'espressione dei geni legati alla via del segnale PI3K/AKT/mTOR, che svolge un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo glico-lipidico, oltre a geni della via del segnale Nrf2-Keap1, che è strettamente connessa alle difese antiossidanti ed è già noto essere modulata da componenti degli alimenti (Stefanson & Bakovic, 2014; Hodges & Minich, 2015; Lu *et al.*, 2016) e antagonizzata da fattori di trascrizione chiamati PPAR (*peroxisome proliferator activated receptors*) coinvolti nella regolazione dell'omeostasi lipidica (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Meccanismi cellulari ipotizzati sulla base dei risultati biochimici ottenuti durante la sperimentazione clinica.**

## 4. Metodi

### 4.1 Frumenti utilizzati per la preparazione dei prodotti testati nella sperimentazione clinica

Il grano antico utilizzato per il trial clinica del presente studio è stato grano khorasan KAMUT® (*Triticum turgidum* spp. *turanicum*), fornito dalla Kamut Enterprises Europea (KEE), Belgio. Come controllo è stato utilizzato un mix di varietà di grano duro italiano biologico commerciale (*T. durum*) e varietà di grano tenero (*T. aestivum*). I dati compositivi sia della farina, sia della semola di grano KAMUT® sia di grano controllo sono riportati in Tabella 1.

<i>Componente</i>	<b>Semola di grano KAMUT®</b>	<b>Semola di grano controllo (miscela di <i>T. durum</i> e <i>T. aestivum</i>)</b>	<b>Farina di grano KAMUT®</b>	<b>Farina di grano controllo (miscela di <i>T. durum</i> e <i>T. aestivum</i>)</b>
<i>Proteine totali (%)</i>	14,3 ± 0,6	14,3 ± 0,4	14,7 ± 0,1	10,3 ± 0,08
<i>Amido Totale (%)</i>	70,4 ± 1,2	68,6 ± 1,2	69,4 ± 2,3	70,5 ± 0,3
<i>Ferro (mg/Kg)</i>	28,5 ± 1,2	31 ± 4	23,5 ± 0,5	22,8 ± 0,5
<i>Magnesio (mg/Kg)</i>	957,4 ± 12,3	789,7 ± 115,3	803,6 ± 5,1	673,1±109,2
<i>Manganese (mg/Kg)</i>	21,1 ± 1,1	11,1 ± 0,4	14,3 ± 0,6	15,5 ± 1,3
<i>Fosforo (mg/Kg)</i>	2841,5±94,5	2432 ± 112,8	2314,8±76,7	1613,3±41,3
<i>Potassio (mg/Kg)</i>	2404,4±46,6	1969,8 ± 10,2	2093 ± 4	1531,6±17,1
<i>Zinco (mg/Kg)</i>	25,5 ± 0,2	25,3 ± 0,2	19,9 ± 0,4	18,3 ± 0,5
<i>Selenio (mg/Kg)</i>	1 ± 0,04	0,9 ± 0,03	0,9 ± 0,01	0,7 ± 0,01
<i>Polifenoli totali(mg/DM)</i>	2 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2
<i>Capacità antiossidante (%)</i>	6,3 ± 0,5	5,9 ± 0,7	6,3 ± 0,6	4,8 ± 0,2

**Tabella 4.1** Composizione di grano KAMUT® e controllo (per 100 g) (Whittaker et al., 2017)

La semola di KAMUT® (ceneri 1,1–1,35%) e la farina (ceneri 1%) sono state ottenute dal molino SIMA S.C.A.R.L. (Argenta, Ferrara, Italia). Per il grano KAMUT® biologico sono stati effettuati processi differenti per ottenere la semola (analogo della semola di grano semi-integrale) e la farina (analogo alla farina semi-integrale), rispettivamente, ottenendo così una quantità di ceneri differente. Per il controllo è stata ottenuta semola semi-integrale (ceneri 1–1,35%) e farina semi-integrale (ceneri 0,95%), rispettivamente, processate in maniera simile sempre da Molino SIMA.

Con le farine e le semole di grano KAMUT® e di controllo è stata preparata pasta (Pastificio FABBRI s.a.s, Firenze, Italia); pasta, cracker e biscotti (Pastificio Menchetti, Arezzo, Italia).

#### 4.2 Reclutamento dei pazienti

Il reclutamento dei pazienti e la raccolta dei campioni è stato effettuato dal gruppo del prof. Francesco Sofi presso l'Unità di Nutrizione Clinica del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, presso l'Ospedale Universitario Careggi, dell'Università di Firenze.

La popolazione studiata era composta da 21 pazienti (14 uomini e 7 donne) di età media  $64,4 \pm 10,9$  anni, tutti affetti da diabete mellito di tipo 2 (T2DM) (Tabella 2).

<i>Caratteristiche</i>	<i>Totale (n=21)</i>
Età, anni (media $\pm$ SD)	$64,4 \pm 10,9$
Sesso (M/F)	14/7
BMI (media $\pm$ SD)	$27,9 \pm 4,7$
Durata di T2DM, anni (media $\pm$ SD)	$3,6 \pm 2,2$
Iperensione [(n (%))]	8 (38)
Dislipidemia [(n (%))]	7 (33)
Attuali fumatori [(n (%))]	5 (24)
Stile di vita sedentario [(n (%))]	13 (62)
MDS (media $\pm$ SD)	$10,3 \pm 1,6$
Consumo medio di cereali (1,0-1,5 porzioni/die, %)	5 (24)
Consumo medio di cereali (1,5 porzioni/die, %)	16 (76)

**Tabella 4.2 Caratteristiche di base della popolazione di studio.**

*BMI* indice di massa corporea (*body mass index*); *MDS* indice di aderenza alla dieta mediterranea (*Mediterranean diet score*); *SD* deviazione standard (*standard deviation*) (Whittaker et al., 2017)

La diagnosi di T2DM è stata effettuata in accordo con i criteri dell'*American Diabetes Association* (2014) di seguito riportati: Emoglobina glicata A1c (HbA1c)  $\geq 6,5\%$  oppure

- Glucosio plasmatico a digiuno  $\geq 126$  mg/dL (7,0 mmol/L) oppure
- Glucosio plasmatico a 2-h  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L) durante un test orale di tolleranza al glucosio oppure
- Glucosio plasmatico random  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L) nei pazienti con sintomi di iperglicemia.

I criteri di esclusione includevano manifestazioni cliniche o complicazioni microvascolari (retinopatia, neuropatia, nefropatia), complicazioni macrovascolari (disturbi cardiovascolari), disturbi intestinali infiammatori (malattie infiammatorie croniche intestinali, IBD), eccessiva assunzione di alcool, celiachia, sensibilità al glutine e allergie al grano.

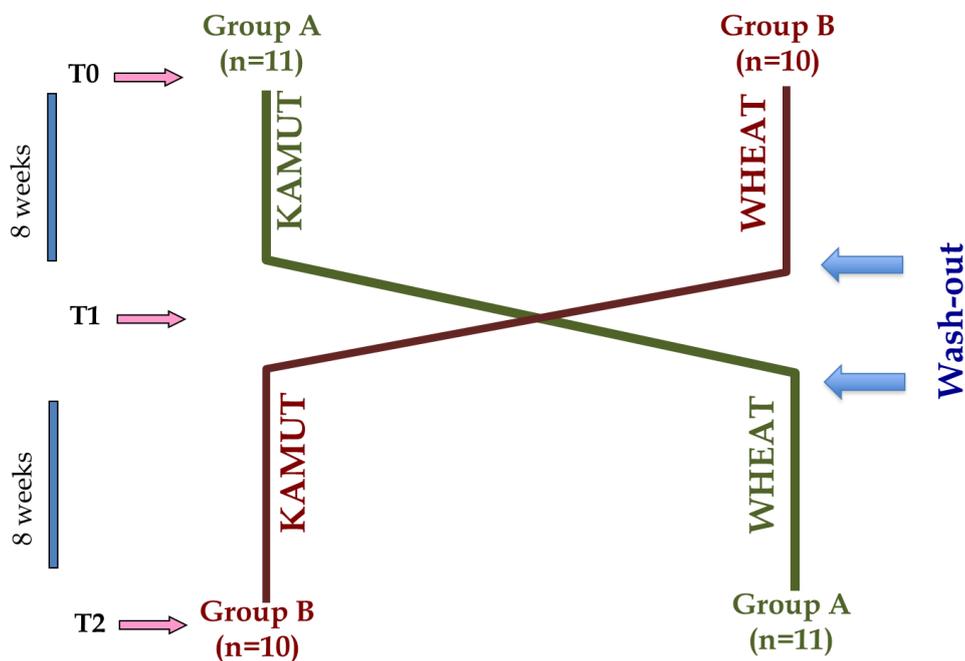
Ai volontari è stato raccomandato di non alterare le proprie abitudini alimentari, ed ognuno ha fornito consenso informato. Il comitato etico istituzionale dell'Università di Firenze ha approvato il protocollo di studio.

### 4.3 Disegno sperimentale

La sperimentazione clinica consisteva in uno studio controllato e randomizzato, in doppio cieco e *cross-over*.

I partecipanti hanno ricevuto una fornitura di 500 g/settimana di pasta, 150 g/giorno di pane, 250 g/settimana di cracker, 250 g/settimana di biscotti a base di KAMUT® o di grano moderno. È stato loro chiesto di consumare i prodotti in base alle loro normali abitudini di consumo per un periodo di 8 settimane. È stato successivamente eseguito un periodo di wash-out di 8 settimane.

La seconda fase di intervento ha previsto lo scambio di dieta (*cross-over*) per ulteriori 8 settimane (figura 4.1).



**Figura 4.1** Diagramma di flusso delle varie fasi della sperimentazione clinica.

Mediamente, l'assunzione giornaliera dei pazienti di semola di KAMUT® e di controllo è stata di 62 g/peso secco, mentre l'assunzione media giornaliera di farina di KAMUT® e farina di

controllo (dal totale dei prodotti consumati) è stata di 140 g/peso secco. L'energia fornita dalla semola e dalla farina è stata di 221 e 501 Kcal, rispettivamente con un totale di 722 Kcal (50-55% dell'introito calorico giornaliero totale) sostituite per questo intervento.

Prima di iniziare l'intervento e dopo ogni giorno di intervento i pazienti sono stati sottoposti a visita medica in una fascia oraria dalle 7 alle 9:30 di mattina, dopo digiuno notturno. Inoltre, i soggetti sono stati invitati a non impegnarsi in una faticosa attività fisica durante il giorno prima della visita medica.

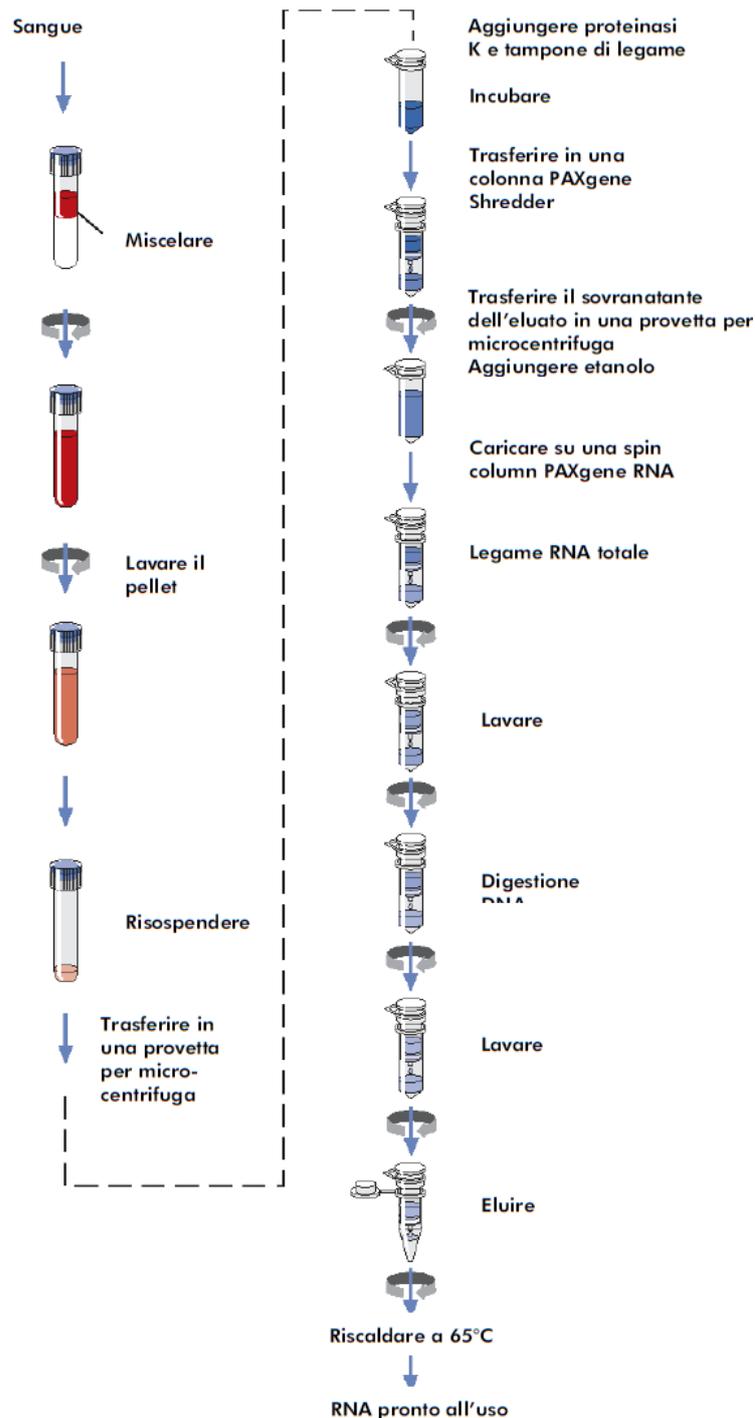
#### **4.4 Analisi dell'espressione genica**

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico. Infatti la PCR è una reazione di amplificazione *in vitro* di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi (Scialpi & Mengoni, 2008).

Il primo passaggio per poter effettuare un'analisi di espressione genica consiste nell'isolare l'RNA con un protocollo di estrazione specifico per il campione di interesse. Si procede poi con la valutazione della sua qualità, quantità e purezza tramite spettrofotometro. Infine, dopo aver retrotrascritto l'RNA in cDNA (DNA complementare), una molecola più stabile, si può procedere all'analisi di espressione genica tramite la tecnica della PCR oppure tramite la real-time PCR; quest'ultima tecnica consente la rilevazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione.

##### **4.4.1 Estrazione e purificazione di RNA da sangue intero di pazienti con T2DM**

Per l'estrazione e purificazione dell'RNA totale da sangue intero è stato utilizzato il kit PAXgene<sup>®</sup> blood RNA system (Qiagen), la cui procedura è mostrata in Figura 4.2.



**Figura 4.2** Procedura di estrazione e purificazione di RNA tramite PAXgene® blood RNA system (Qiagen)

Il sangue intero prelevato ai pazienti (2,5 mL) è stato conservato nei PAXgene Blood RNA Tube (BRT) del kit. I tubi BRT contengono un reagente di formula brevettata che protegge le molecole dalla degradazione causata dalle RNasi e minimizza i cambiamenti *ex vivo* nell'espressione genica. I campioni di sangue dopo il prelievo sono stati mantenuti in incubazione nei tubi BRT a temperatura ambiente per almeno 2 ore per garantire la completa lisi cellulare. In seguito, i campioni sono stati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , fino alla procedura di purificazione dell'RNA. Prima di

procedere con l'estrazione, è necessario riportare i campioni a temperatura ambiente per almeno 2 ore. La purificazione inizia con centrifugazione ( $10'$  a  $4.000 \times g$ ) per fare precipitare gli acidi nucleici nel tubo BRT. Il pellet viene lavato e risospeso in 4 mL di acqua priva di RNasi; per favorire la risospensione del pellet, il tutto è stato miscelato con il vortex.

Sono stati aggiunti al pellet così ottenuto 350  $\mu$ L di buffer di risospensione, poi agitati fino alla completa dissoluzione del pellet. Il campione è stato trasferito in una provetta da 1,5 mL, in cui sono stati aggiunti 300  $\mu$ L di buffer di legame e 40  $\mu$ L di proteinasi K che dà inizio alla digestione proteica. Il tutto è stato miscelato per 5 secondi, e in seguito è stato incubato a  $55^\circ\text{C}$  per 10 minuti.

Per omogeneizzare il lisato cellulare e rimuovere i residui di cellule, è stata effettuata una centrifugazione aggiuntiva utilizzando la colonna PAXgene Shredder (PSC) (3 minuti a  $20.000 \times g$ ). Il sovranatante della frazione eluita è stato trasferito in una nuova provetta da 1,5 mL senza interferire con il pellet nella provetta di reazione. Per ottimizzare le condizioni di legame si è aggiunto etanolo (350  $\mu$ L di etanolo, 96–100%), quindi il lisato viene introdotto nella *spin column* PAXgene RNA (PRC). Con una breve centrifugazione l'RNA si lega selettivamente alla membrana in silice della colonnina mentre i contaminanti vengono eliminati.

Eventuali altri contaminanti vengono rimossi nelle successive fasi di lavaggio. Fra la prima e la seconda fase di lavaggio, vengono aggiunti 80  $\mu$ L della soluzione di DNasi direttamente sulla membrana della colonna, durante un'incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti, per eliminare qualsiasi eventuale traccia di DNA legato. Sono seguiti tre distinti passaggi di lavaggio con i tamponi del kit, il primo con 350  $\mu$ L di buffer di lavaggio 1, il secondo e il terzo con 500  $\mu$ L di buffer di lavaggio 2. Per ogni lavaggio è stata eseguita una centrifugazione (1 minuto per lavaggio 1 e 2, 3 minuti per il terzo lavaggio, a  $8000 \times g$ ) e ogni volta la colonnina di centrifugazione è stata trasferita in un nuovo tubo e l'eluato è stato scartato.

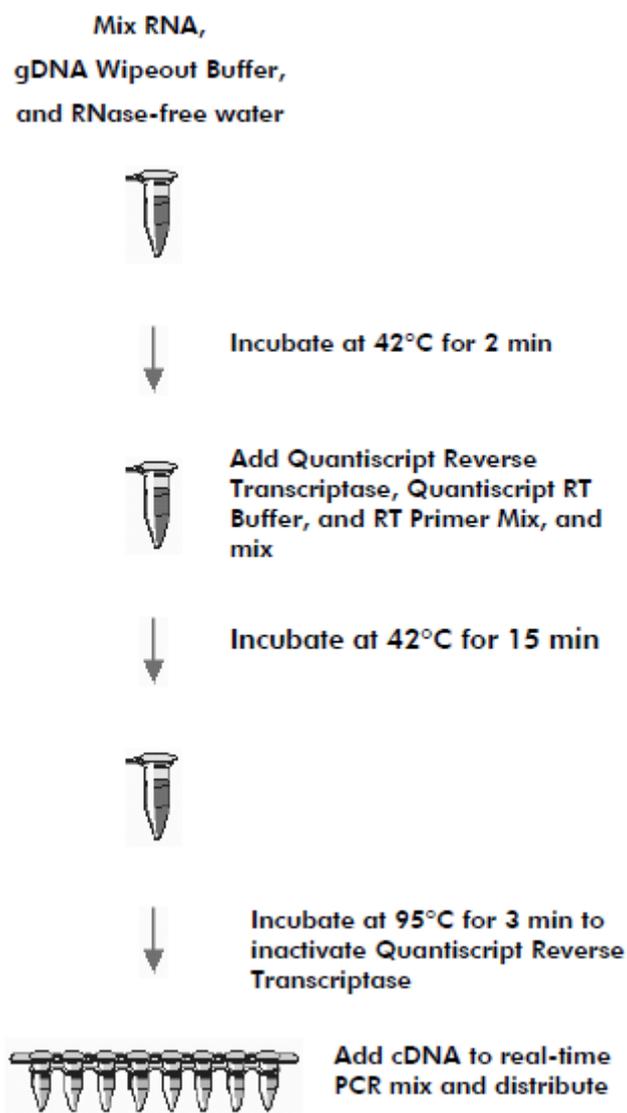
Dopo le fasi di lavaggio l'RNA viene eluito in 80  $\mu$ L del tampone di eluizione (BR5) e denaturato a  $65^\circ\text{C}$  per 5 minuti in un bagno termostato. Successivamente è stata eseguita la quantificazione dell'RNA totale, poi il campione è stato conservato a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **4.4.2 Quantificazione dell'RNA totale**

La valutazione della concentrazione e della purezza dell'RNA ottenuto è stata valutata per via spettrofotometrica mediante Nanodrop (Nanodrop Technologies Inc).

#### 4.4.3 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione (RT) o trascrizione inversa è stata effettuata utilizzando il Kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen), le cui fasi procedurali sono riportate in Figura 4.3.



**Figura 4.3 Procedura di retrotrascrizione tramite il kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen)**

Prima di procedere con la retrotrascrizione, è stato necessario effettuare una opportuna diluizione di tutti i campioni di RNA con acqua priva di RNAsi per ottenere una concentrazione finale di 250 ng/12 uL. In seguito, si è eliminato il DNA genomico (gDNA), eventualmente presente nell'RNA, utilizzando il buffer gDNA Wipeout tramite incubazione in termociclatore a 42°C per 2 minuti. Successivamente in ogni campione è stata aggiunta una miscela per la trascrizione inversa formata da:

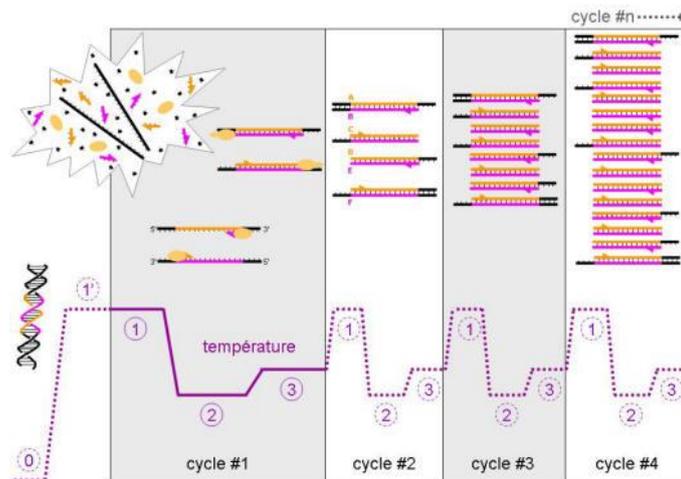
- 1  $\mu\text{L}$  di enzima trascrittasi inversa (Quantiscript Reverse Transcriptase);
- 4  $\mu\text{L}$  di tampone (Quantiscript RT buffer), contenente dNTP;
- 1  $\mu\text{L}$  di primer mix (RT Primer Mix).

I campioni sono stati poi posti termociclatore Mastercycler (Eppendorf) ad incubare prima per 15 minuti a  $42^{\circ}\text{C}$  per ottenere cDNA, di seguito per 3 minuti a  $95^{\circ}\text{C}$  per inattivare la trascrittasi inversa. Il cDNA ottenuto è stato poi rapidamente congelato e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4.4 Real-time PCR (qPCR)

La qPCR è una tecnica utilizzata per amplificare in maniera selettiva una sequenza bersaglio contenuta in una miscela eterogenea di molecole di DNA per mezzo di una DNA polimerasi.

La reazione prevede il susseguirsi di cicli di amplificazione realizzati grazie all'alternanza di specifici cicli di temperature. Le fasi che si possono distinguere, per ogni ciclo, sono tre: la *denaturazione*, l'*appaiamento dei primer* o *annealing* e infine l'*estensione* (Figura 4.4).



**Figura 4.4** Rappresentazione grafica delle fasi di qPCR: *denaturazione, annealing, estensione*

Il numero di cicli di amplificazione necessari ad una quantificazione tramite qPCR dipende dalla concentrazione di DNA iniziale. In generale il numero di cicli è compreso tra 30 e 45 (Scialpi & Mengoni, 2008).

La real-time PCR (qPCR) è una tecnica che consente di seguire l'aumento della quantità di prodotto della reazione a catena della polimerasi ad ogni ciclo di amplificazione (in *real time*), anziché solo al suo termine come nella metodica tradizionale della PCR. La tecnica si basa sull'uso di coloranti fluorescenti che si legano al DNA in modo aspecifico o di sonde marcate complementari a specifiche sequenze e di sistemi di rilevazione in grado di misurare il segnale emesso sotto forma di fluorescenza. Il segnale fluorescente può essere generato da sistemi di tipo

diverso: con fluorofori che si legano alla doppia elica di DNA (per esempio il SYBR Green) o con diverse tipologie di sonde o *probes* fluorescenti (Taqman, Molecular Beacons, Hybridization Probes). Nel nostro caso, è stato utilizzato il SYBR Green. Tale fluoroforo viene incorporato nella doppia elica durante la fase di elongazione e perciò la quantità di prodotto amplificato durante la reazione può essere misurata rilevando l'emissione del segnale del fluoroforo al termine della fase di allungamento di ciascun ciclo (Scialpi & Mengoni, 2008).

La quantificazione che si realizza tramite la qPCR può essere di tipo assoluto, se si dispone di uno standard a quantità nota del gene di interesse ed il dato ottenuto viene espresso come numero di copie del gene in esame, oppure di tipo relativo, quando si confrontano tutti i campioni contro uno utilizzato come standard ed il risultato viene espresso in unità arbitrarie. La quantificazione relativa della concentrazione della sequenza bersaglio di DNA presente nel campione viene determinata in rapporto a quella di un gene endogeno di riferimento (*gene costitutivo*), presente in quantità costante in tutti i campioni. L'espressione genica viene quindi espressa come rapporto tra la quantità di gene target ricercato e quella del gene costitutivo. Il rapporto gene bersaglio/gene endogeno di ciascun campione viene normalizzato a sua volta rispetto allo stesso rapporto di un campione di controllo (Scialpi & Mengoni, 2008), ad esempio un campione non trattato oppure – come nel nostro caso – il campione del paziente alla baseline, prima del trattamento sperimentale.

Negli esperimenti oggetto di questo studio la qPCR è stata eseguita utilizzando il Kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) e lo strumento Rotor-Gene 6000 (Qiagen).

Il volume totale di reazione utilizzato era di 25  $\mu$ L, comprensivo di:

- 12,5  $\mu$ L di SYBR Green Mix;
- 9,5  $\mu$ L di acqua RNase-free;
- 2  $\mu$ L di primer mix, ossia una miscela della coppia di primer, senso e antisenso;
- 1  $\mu$ L di cDNA del campione.

Le condizioni sperimentali sono state le seguenti:

- Attivazione della *Taq* DNA polimerasi: 15 minuti a 95°C;
- Denaturazione: 15 secondi a 94°C;
- Annealing: 30 secondi a 60°C;
- Estensione: 30 secondi a 60°C;
- Numero di cicli: 40

Le sequenze dei primer (Tabella 4.3) sono state disegnate dal dott. Dario de Biase (Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna), utilizzando il software primer3.

L'espressione dei geni codificanti per HSP75, NADPH, PPIB, RPLP0 è stata utilizzata come riferimento per la normalizzazione relativa.

Gene	Sequenza del primer	Dimensione dell'amplicone (bp)
<b>Geni reference</b>		
<b>HSP75</b> <i>heat shock protein 75 (HSP75)</i> mitocondriale	F: CTACGTGCCCGACATGAAA R: GCCTTGGTCTGGATGAGG	99
<b>NADPH</b> 2,4-dienoil-CoA reduttasi	F: AGCACAGAAAGGAGCAGCAT R: GAGACTTGCTCATGGCTTCC	116
<b>PPIB</b> peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasi B	F: GATGGCACAGGAGGAAAGAG R: GGAGCCGTTGGTGTCTTTG	120
<b>RPLP0</b> subunità ribosomiale 60S	F: GGCACCATTGAAATCCTGAG R: AGGAGAAGGGGGAGATGTTG	106
<b>Geni target</b>		
<b>AKT1</b> AKT serina/treonina protein-chinasi 1	F: CCTCAAGAATGATGGCACCT R: CACTGCGCCACAGAGAAG	96
<b>CAT</b> catalasi	F: ATCCAGAAGAAAGCGGTCAA R: GAGATCCGGACTGCACAAA	133
<b>GPX4</b> glutatione perossidasi 4	F: GCACATGGTTAACCTGGACA R: AGGTGACGAGCTGAGTGTAG	105
<b>HMOX1</b> eme ossigenasi 1	F: ACGGCTTCAAGCTGGTGAT R: GTAGACAGGGGCGAAGACTG	101
<b>KEAP1</b> proteina <i>Kelch-like</i> associata a ECH	F: AACTTCGCTGAGCAGATTGG R: CTCTTGCTTGGCCACCTC	90
<b>NFE2L2</b> fattore di trascrizione nucleare eritroide-2	F: CAACTAGATGAAGAGACAGGTGAA R: GTGGGCAACCTGGGAGTAGT	99
<b>PPARG</b> <i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>	F: TCAAGAGTACCAAAGTGCAATCA R: CATGAGGGAGTTGGAAGGCT	109
<b>SLC2A4</b> membro 4 dei carrier del trasporto facilitato di glucosio	F: GGGTTTCCAGTATGTTGCGG R: GATCTGGTCAAACGTCCGGC	130

**Tabella 4.3** Sequenze dei primer e dimensione dell'amplicone generato in qPCR. *F: forward o senso; R: reverse o antisenso; bp: coppie di basi o paia di basi.*

Ogni campione di cDNA è stato analizzato in duplicato in modo da ottenere due repliche tecniche indipendenti per campione. Nelle analisi sono stati inclusi anche controlli negativi (NTC, *no template control*) costituiti dalla miscela di reazione e acqua. Dopo ogni corsa la

presenza degli amplificati è stata valutata mediante l'analisi della curva di melting, specifica per ogni sequenza esaminata, essendo dipendente dalla lunghezza e dalla composizione in basi del frammento di DNA.

#### **4.4.5 Analisi statistica**

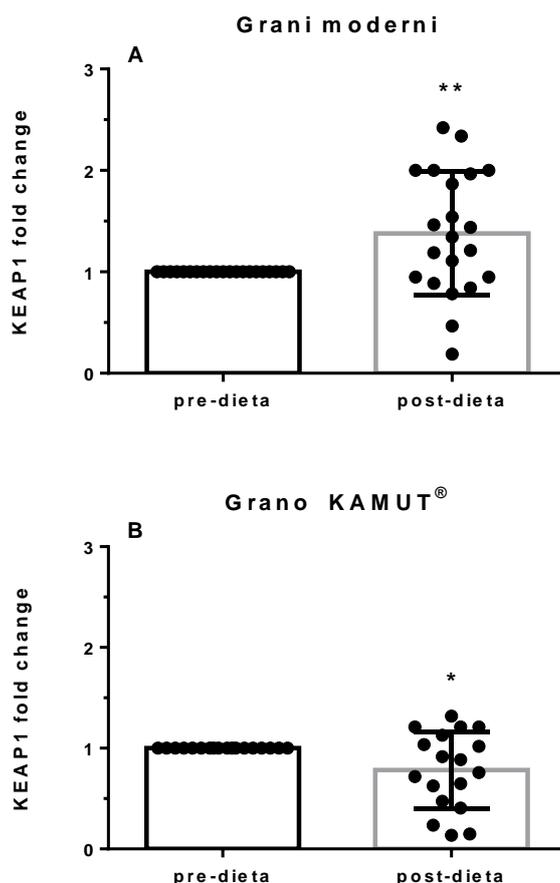
Tutti i dati sono riportati come medie  $\pm$  deviazione standard (DS), di 2 repliche tecniche ottenute da campioni di sangue intero di ogni paziente. I dati di intensità di fluorescenza dei campioni ottenuti dalla real-time PCR sono stati normalizzati sui rispettivi geni costitutivi. Il software utilizzato per condurre questa analisi è stato DataAssist™ Software versione 3.01 (Applied Biosystem).

Dopo la normalizzazione dell'espressione di ciascun gene sui geni costitutivi ( $\Delta Ct = Ct \text{ gene target} - Ct \text{ geni costitutivi}$ , dove Ct indica il *threshold cycle*), è stato calcolato il  $\Delta\Delta Ct$ , corrispondente al rapporto tra il livello di espressione  $\Delta Ct$  di ogni gene dopo il trattamento dietetico rispetto al  $\Delta Ct$  dello stesso gene prima del trattamento dietetico, ossia alla *baseline*. Il valore ottenuto è stato utilizzato per calcolare il 'fold change', con la seguente formula:  $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  al fine di identificare se l'espressione dei geni considerati fosse *up-regolata* ( $\text{fold change} > 1$ ) o *down-regolata* ( $\text{fold change} < 1$ ) rispetto alla *baseline*.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante test t per campioni appaiati.

## 5. Risultati e discussione

L'analisi dell'espressione del gene codificante per Keap1 (proteina *Kelch-like* associata a ECH) nei campioni ematici ha evidenziato una modulazione significativa, e di segno opposto, a seguito dei due trattamenti dietetici. In particolare, la dieta a base di grani moderni ha determinato una marcata up-regolazione dell'espressione del gene *KEAP1* (Figura 5.1 A), mentre quella a base di KAMUT® ne ha determinato una down-regolazione (Figura 5.1 B).

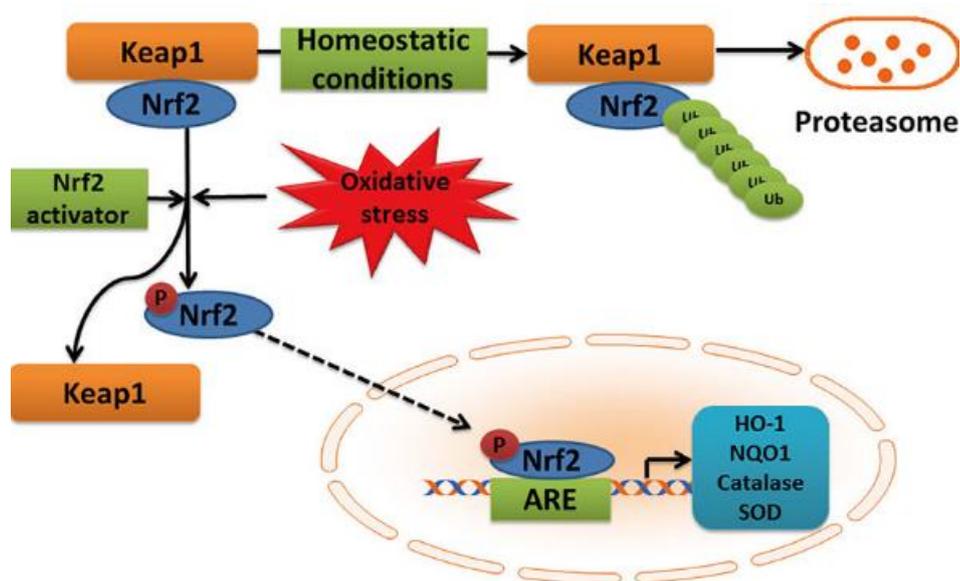


**Figura 5.1. Espressione del gene *KEAP1* (proteina *Kelch-like* associata a *ECH*) in campioni di sangue intero di pazienti prima e dopo l'intervento dietetico.**

L'espressione genica è stata valutata come descritto nel capitolo "Metodi", è stata normalizzata rispetto a geni costitutivi (*HSP75*, *NADPH*, *PPIB*, *RPLP0*), ed è espressa come "fold change", corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel campione dello stesso paziente prima dell'intervento dietetico. I dati sono medie  $\pm$  DS di 2 repliche tecniche indipendenti per ogni campione. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test *t* per campioni appaiati: \*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .

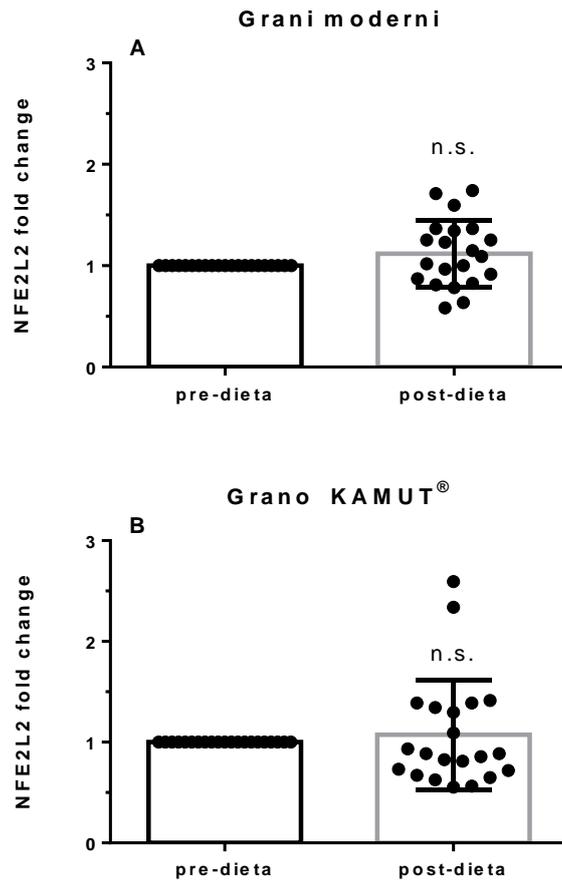
La proteina Keap 1 è un sensore dello sbilanciamento dell'omeostasi redox. È riportato in letteratura che l'inibizione del suo gene codificante *KEAP1* indica una maggiore resistenza e protezione dal danno causato da xenobiotici e da specie radicaliche (Tian *et al.*, 2012). La down-regolazione di *KEAP1* dopo dieta a base KAMUT® e la sua up-regolazione dopo dieta a base di grani antichi potrebbe far ipotizzare un diverso stato ossidativo ed infiammatorio, ed una diversa risposta agli stessi.

La proteina Keap1, insieme al fattore di trascrizione nucleare eritroide-2 (Nrf2), rappresenta infatti un importante meccanismo di “stop & go”, ovvero segnali di attivazione o disattivazione della trascrizione genica di enzimi antiossidanti e detossificanti. Normalmente, in condizioni basali, Nrf2 è legato nel citoplasma a Keap1, che ne impedisce la traslocazione nel nucleo, indirizzandolo verso la degradazione proteasomiale per ubiquitinazione. In condizioni di danno ossidativo Keap1, essendo ricca di residui di cisteina, subisce una modifica redox che determina la dissociazione del legame del complesso Keap1–Nrf2, permettendo a quest'ultimo di traslocare nel nucleo ove lega l'*antioxidant response element* (ARE) all'interno della regione promotrice, promuovendo la trascrizione dei suoi oltre 200 geni bersaglio (Wakabayashi *et al.*, 2004) (Figura 5.2).



**Figura 5.2. Rappresentazione schematica della via del segnale del complesso proteico Nrf2-Keap1 (Chen *et al.*, 2014).**

È stato quindi valutato se la diversa espressione di *KEAP1* fosse associata ad una diversa espressione di *NFE2L2*, codificante per Nrf2. Come riportato in figura 5.3, la trascrizione di questo gene non è stata modificata dall'assunzione da parte dei pazienti né dei prodotti a base di grani moderni (Figura 5.3 A) né di prodotti a base di grano KAMUT® (Figura 5.3 B).



**Figura 5.3. Espressione del gene NFE2L2 (fattore di trascrizione nucleare eritroide-2) in campioni di sangue intero di pazienti prima e dopo aver seguito una dieta con prodotti a base di grani moderni e con prodotti a base di grano KAMUT®.**

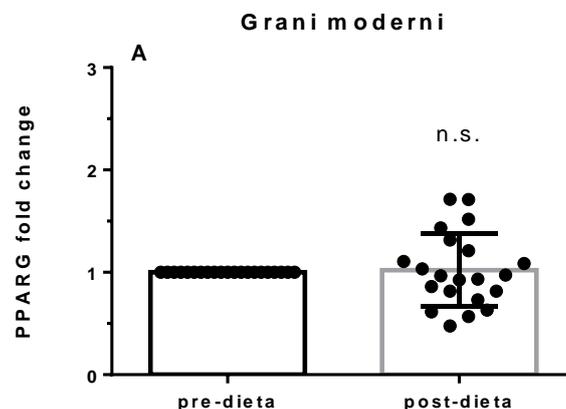
L'espressione genica è stata valutata come descritto nel capitolo "Metodi", è stata normalizzata rispetto a geni costitutivi (HSP75, NADPH, PPIB, RPLP0) ed è espressa come "fold change", corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel campione dello stesso paziente prima dell'intervento dietetico. I dati sono medie  $\pm$  DS di 2 repliche tecniche indipendenti per ogni campione. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test t per campioni appaiati: n.s. non significativo.

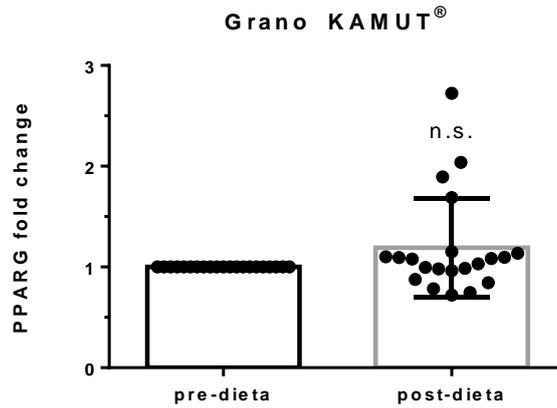
In condizioni basali, è noto che Nrf2 abbia un'emivita molto breve (approssimativamente 13–20 minuti, a seconda del tipo cellulare) ed il suo livello viene mantenuto stabile tramite un preciso equilibrio tra sintesi e degradazione da parte del proteasoma. In risposta allo stress ossidativo, Nrf2 continua ad essere sintetizzato ma la sua degradazione diminuisce, portando ad un suo accumulo e ad una aumentata attività trascrizionale (Nguyen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Quindi, in assenza di modulazione dell'espressione genica di NFE2L2 da parte delle diete a base di grano KAMUT® o a base di grani moderni, possiamo ipotizzare che anche il livello di sintesi

di Nrf2 sia rimasto invariato, mentre a variare potrebbe essere stata la sua stabilità, legata appunto alla diversa presenza di Keap1. Secondo questa ipotesi, la diversa espressione di *KEAP1*, con conseguente diverso rilascio di Nrf2 dal complesso Keap1–Nrf2 e diversa entità di traslocazione di Nrf2 nel nucleo, potrebbe essere uno dei meccanismi alla base degli effetti clinici osservati.

Sulla base di questa ipotesi è stata valutata l'espressione di geni codificanti per proteine coinvolte in eventi a monte o a valle della traslocazione di Nrf2 nel nucleo.

Per quanto riguarda gli eventi a monte della transattivazione del sistema Nrf2–Keap1, occorre ricordare che essa può essere regolata, oltre che dall'ambiente redox cellulare, anche da altri fattori di trascrizione, tra cui il recettore nucleare *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$*  PPAR $\gamma$  (Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, 2014; Namani *et al.*, 2014; Slocum *et al.*, 2016). PPAR $\gamma$  è anche implicato nel metabolismo glucidico e lipidico, riveste un ruolo fondamentale nell'insulino-resistenza e nel T2DM (Ahmadian *et al.*, 2013), ed è il bersaglio dei farmaci tiazolidinedioni (TZD) utilizzati nella terapia di tali patologie. Inoltre, regola l'espressione di diversi geni implicati nella risposta al danno ossidativo e all'infiammazione (Polvani *et al.*, 2012). PPAR $\gamma$  è espresso soprattutto nel tessuto adiposo, ma in minor misura anche in altri tessuti (Grommes *et al.* 2004; Han & Roman, 2007; Wahli, & Michalik, 2012). L'espressione del gene *PPARG*, codificante per PPAR $\gamma$ , l'analisi in qPCR non è apparsa modificata da nessuno dei due trattamenti (Figura 5.4 A e B).





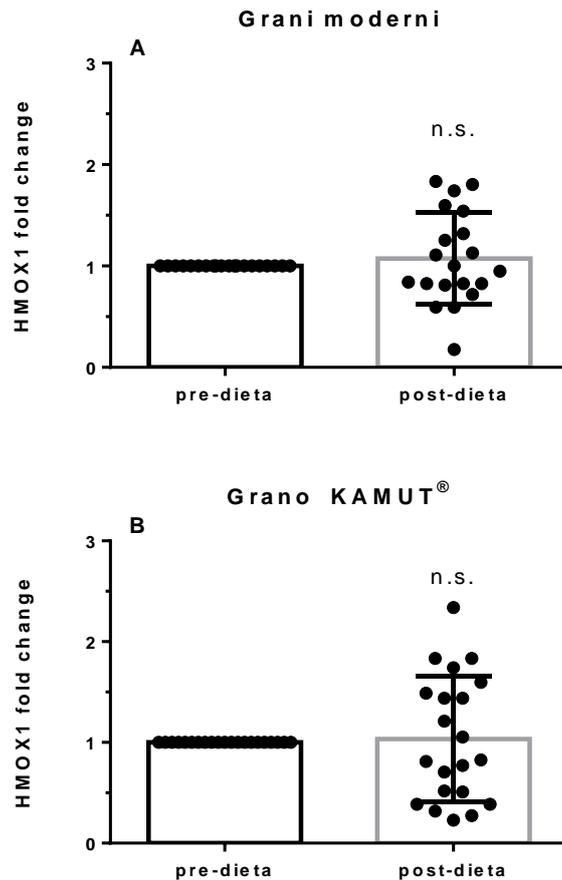
**Figura 5.4. Espressione del gene *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) in campioni di sangue intero di pazienti prima e dopo aver seguito una dieta con prodotti a base di grani moderni e con prodotti a base di grano KAMUT®.**

L'espressione genica è stata valutata come descritto nel capitolo "Metodi", è stata normalizzata rispetto a geni costitutivi (*HSP75*, *NADPH*, *PPIB*, *RPLP0*) ed è espressa come "fold change", corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel campione dello stesso paziente prima dell'intervento dietetico. I dati sono medie  $\pm$  DS di 2 repliche tecniche indipendenti per ogni campione. L'analisi statistica è stata eseguita mediante *test t* per campioni appaiati: *n.s.* non significativo.

L'espressione del gene *PPARG* è risultata però essere molto bassa, al limite della determinazione, in tutti i campioni. Questo può essere dovuto alla terapia a base di agonisti di  $PPAR\gamma$  (es. TZD), assunta da alcuni dei pazienti (Lenhard *et al.*, 2001).

Secondo l'ipotesi di una minore degradazione di Nrf2, la dieta a base di grano KAMUT® potrebbe aver determinato maggiore traslocazione nucleare di questo fattore di trascrizione, e la conseguente upregolazione dei suoi geni bersaglio. Pertanto, si è valutata l'espressione di alcuni geni target di Nrf2, quali eme ossigenasi 1 (*HMOX1*), catalasi (*CAT*) e glutatione perossidasi 4 (*GPX4*) (Chartoumpekis, & Kensler, 2013).

Esistono tre isoforme note dell'enzima eme ossigenasi (HO), codificate da tre differenti geni (*HMOX1-3*); la isoforma 1, codificata dal gene *HMOX1*, è ubiquitaria ed inducibile, e viene sintetizzata in risposta a stress di tipo ossidativo e infiammatorio (Kikuchi *et al.*, 2005). È noto che l'espressione di *HMOX1* sia ampiamente regolata da Nrf2 (Li *et al.*, 2014). L'espressione del gene *HMOX1* non è apparsa modificata né dalla dieta a base di prodotti di grani moderni (Figura 5.5 A) né da quella a base di prodotti di grano KAMUT® (Figura 5.5 B).

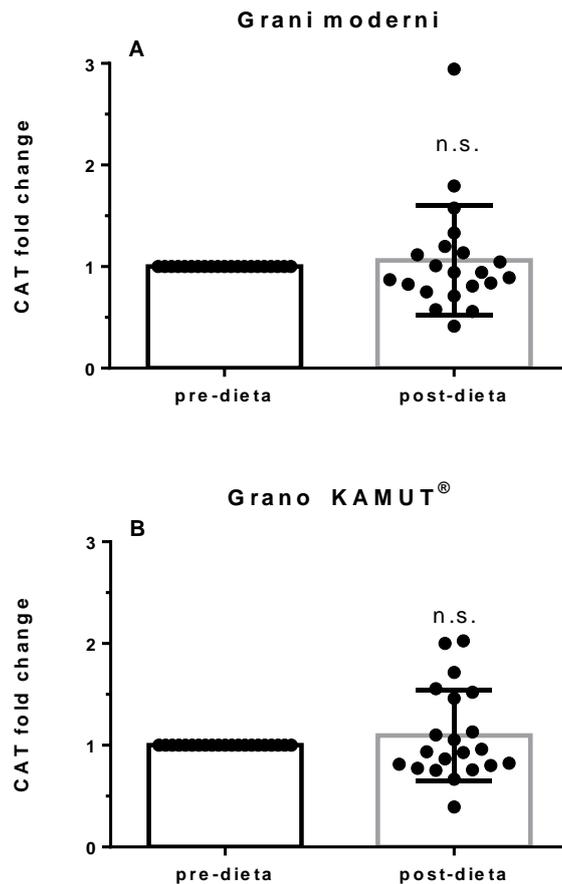


**Figura 5.5. Espressione del gene *HMOX1* (eme ossigenasi 1) in campioni di sangue intero di pazienti prima e dopo aver seguito una dieta con prodotti a base di grani moderni e con prodotti a base di grano KAMUT®.**

L'espressione genica è stata valutata come descritto nel capitolo "Metodi", è stata normalizzata rispetto a geni costitutivi (*HSP75*, *NADPH*, *PPIB*, *RPLP0*) ed è espressa come "fold change", corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel campione dello stesso paziente prima dell'intervento dietetico. I dati sono medie  $\pm$  DS di 2 repliche tecniche indipendenti per ogni campione. L'analisi statistica è stata eseguita mediante *test t* per campioni appaiati: *n.s.* non significativo.

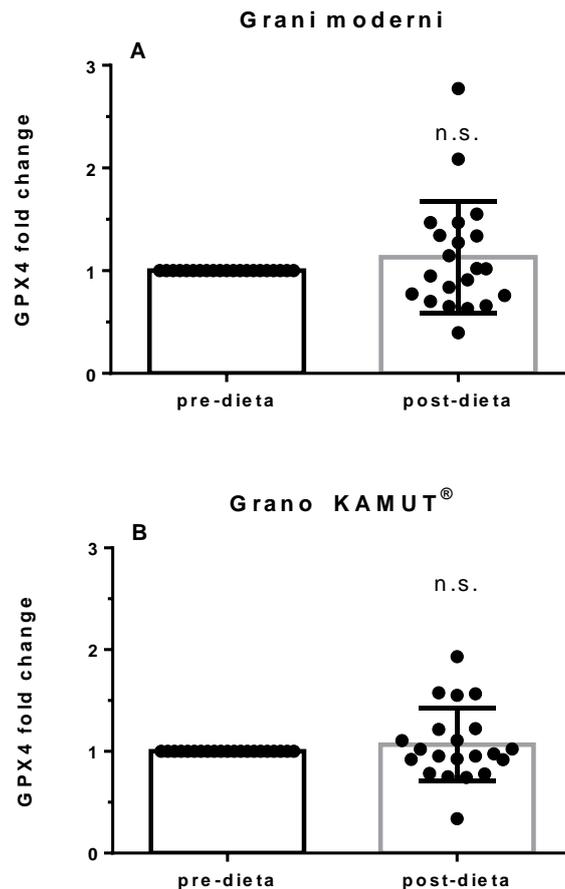
La mancanza di un effetto regolatorio riscontrata in questo studio non avvalorava l'ipotesi di una maggiore attività di Nrf2. Per altro occorre considerare che la minore espressione del gene codificante per l'eme ossigenasi che si riscontra nei soggetti diabetici (Tan *et al.*, 2011) potrebbe avere un'influenza sulla regolazione della sua espressione.

Parimenti a *HMOX1*, nessuna delle due diete ha determinato modifiche nell'espressione di *CAT* (Figura 5.6 A e 5.6 B) e *GPX4* (Figura 5.7 A e 5.7 B), che codificano entrambi per proteine che sono parte del sistema endogeno di difesa antiossidante.



**Figura 5.6. Espressione del gene CAT (catalasi) in campioni di sangue intero di pazienti prima e dopo aver seguito una dieta con prodotti a base di grani moderni e con prodotti a base di grano KAMUT®.**

L'espressione genica è stata valutata come descritto nel capitolo "Metodi", è stata normalizzata rispetto a geni costitutivi (HSP75, NADPH, PPIB, RPLP0) ed è espressa come "fold change", corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel campione dello stesso paziente prima dell'intervento dietetico. I dati sono medie  $\pm$  DS di 2 repliche tecniche indipendenti per ogni campione. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test t per campioni appaiati: n.s. non significativo.



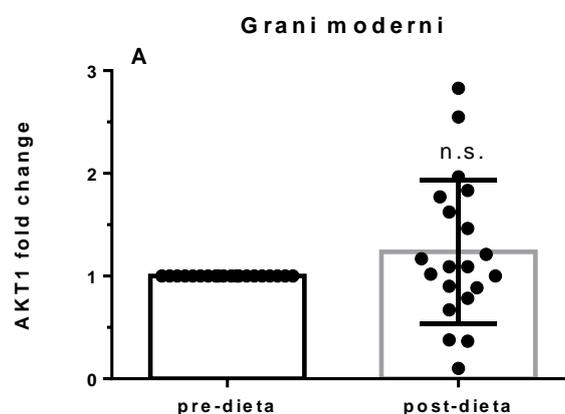
**Figura 5.7. Espressione del gene GPX4 (glutazione perossidasi 4) in campioni di sangue intero di pazienti prima e dopo aver seguito una dieta con prodotti a base di grani moderni e con prodotti a base di grano KAMUT®.**

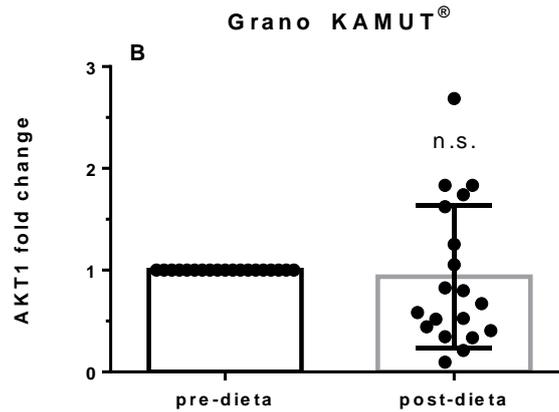
L'espressione genica è stata valutata come descritto nel capitolo "Metodi", è stata normalizzata rispetto a geni costitutivi (*HSP75*, *NADPH*, *PPIB*, *RPLP0*) ed è espressa come "fold change", corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel campione dello stesso paziente prima dell'intervento dietetico. I dati sono medie  $\pm$  DS di 2 repliche tecniche indipendenti per ogni campione. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test *t* per campioni appaiati: n.s. non significativo.

L'enzima catalasi viene codificata dal gene omonimo *CAT*, che è espresso, anche se a livelli minimi, in tutte le cellule dell'organismo (Goyal & Basak, 2010). Nel promotore del gene *CAT* sono presenti siti di legame per diversi fattori di trascrizione: Sp1 (*specificity protein 1*), PPAR $\gamma$ , FoxO3 (proteina *forkhead* appartenente alla sottoclasse O), NF-Y (fattore nucleare Y), che quindi sembrerebbero tutti partecipare alla regolazione trascrizionale. Nel promotore di *CAT* non sono state trovate sequenze ARE, per cui la regolazione di Nrf2 sulla sua espressione rimane ancora ambigua (Glorieux *et al.*, 2015).

L'enzima glutatione perossidasi è un enzima seleno-dipendente, che utilizza il glutatione (GSH) come donatore di ione idrogeno. Esistono almeno quattro diverse isoforme di GPX nelle cellule umane (GPX1–4); l'isoforma 4, codificata dal gene *GPX4*, ha come substrato preferenziale gli idroperossidi dei fosfolipidi e del colesterolo. Sia l'espressione che l'attività di GPX4 vengono modulate in risposta a stress di tipo ossidativo e infiammatorio (Sneddon *et al.*, 2003) e alla diversa presenza di Se (Navarro-Alarcon, & Cabrera-Vique, 2008; Zhang *et al.*, 2013). Poiché la quantità di Se è superiore sia nella semola che nella farina da grano khorasan KAMUT® rispetto a semola e farina preparate con la miscela di grani moderni (Whittaker *et al.*, 2017), la protezione dallo stress ossidativo osservata clinicamente potrebbe essere legata ad una induzione della sintesi dell'enzima GPX4 dovuta ad una maggiore disponibilità di Se piuttosto che ad una modulazione della trascrizione del gene.

La via del segnale PI3K/AKT/mTOR è implicata nella trasmissione del segnale intracellulare dell'insulina (Hennessy *et al.*, 2005) e correlata con l'insulino-resistenza (Homuth *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2012; Mackenzie & Elliot, 2014). Il legame dell'insulina ai suoi recettori di membrana porta all'attivazione di AKT, una serina/treonina protein-chinasi, nota anche come protein-chinasi B (PKB), che promuove la traslocazione di GLUT4 nella membrana cellulare e il trasporto di glucosio all'interno della cellula (Gao *et al.*, 2015; Gonzales & Mc Graw, 2009; Vander *et al.*, 2007). AKT esiste in tre isoforme, codificate da tre differenti geni: AKT1, espressa ad alti livelli e ubiquitariamente, AKT2, espressa nei tessuti insulino-dipendenti (tessuto muscolare e adiposo), e AKT3, maggiormente espresso nel cervello. L'espressione del gene *AKT1*, codificante per la isoforma 1, non è risultata modificata dall'assunzione né di prodotti a base di grani comuni (Figura 5.8 A) né di prodotti a base di grano KAMUT® (Figura 5.8 B).



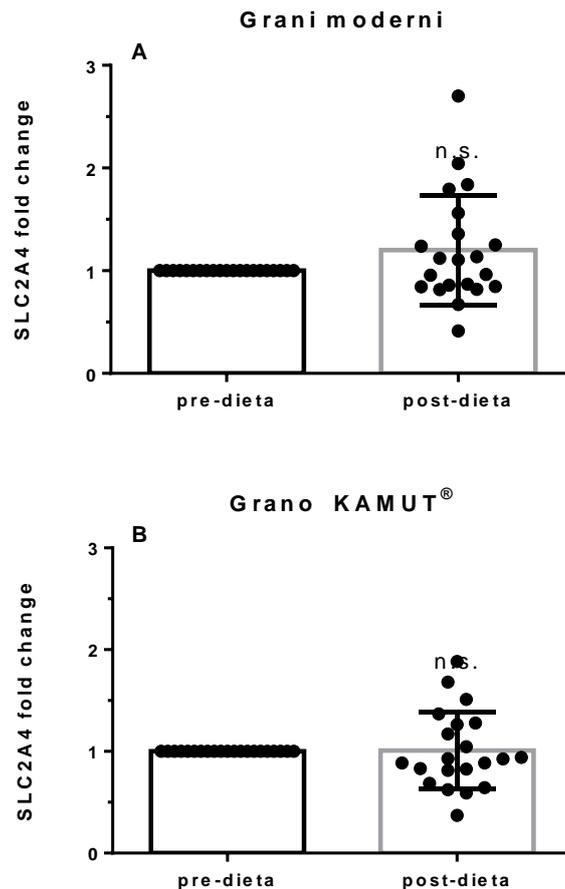


**Figura 5.8. Espressione di AKT1 (AKT serina/treonina protein-chinasi 1) in campioni di sangue intero di pazienti prima e dopo aver seguito una dieta con prodotti a base di grani moderni e con prodotti a base di grano KAMUT®.**

L'espressione genica è stata valutata come descritto nel capitolo "Metodi", è stata normalizzata rispetto a geni costitutivi (*HSP75*, *NADPH*, *PPIB*, *RPLP0*) ed è espressa come "fold change", corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel campione dello stesso paziente prima dell'intervento dietetico. I dati sono medie  $\pm$  DS di 2 repliche tecniche indipendenti per ogni campione. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test *t* per campioni appaiati: n.s. non significativo.

Questa mancata modulazione sembra in contrasto con i dati clinici, che hanno evidenziato una riduzione dell'insulinemia ( $-16,3\%$ ) in pazienti diabetici dopo dieta a base di KAMUT®. Peraltro, gli effetti dell'insulina sul metabolismo glucidico si esplicano in modo particolare nei tessuti insulino-dipendenti (tessuto adiposo e muscolo). In questi tessuti, l'isoforma di AKT maggiormente presente è la 2, codificata dal gene *AKT2*. La mancata modulazione di *AKT1* non esclude quella della isoforma 2 a livello epatico e adiposo.

La via del segnale PI3K/AKT/mTOR riveste un ruolo nell'espressione del trasportatore del glucosio GLUT4, codificato dal gene *SLC2A4* (membro 4 dei carrier del trasporto facilitato di glucosio) (Tee *et al.*, 2002; Taha *et al.*, 1999; Watson & Pessin, 2006). In aggiunta, anche il fattore di trascrizione Nrf2 regola la trascrizione del gene *SLC2A4* tramite l'attivazione della proteina chinasi cAMP-dipendente (AMPK) (Karnieli & Armoni, 2008; McGee *et al.*, 2008). L'analisi in qPCR di *SLC2A4* non ha però evidenziato una modulazione della sua espressione a seguito dei due interventi dietetici (Figura 5.9 A e 5.9 B).



**Figura 5.9. Espressione di SLC2A4 (membro 4 dei carrier del trasporto facilitato di glucosio) in campioni di sangue intero di pazienti prima e dopo aver seguito una dieta con prodotti a base di grani moderni e con prodotti a base di grano KAMUT®.**

L'espressione genica è stata valutata come descritto nel capitolo "Metodi", è stata normalizzata rispetto a geni costitutivi (*HSP75*, *NADPH*, *PPIB*, *RPLP0*) ed è espressa come "fold change", corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel campione dello stesso paziente prima dell'intervento dietetico. I dati sono medie  $\pm$  DS di 2 repliche tecniche indipendenti per ogni campione. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test *t* per campioni appaiati: n.s. non significativo.

Il gene *SLC2A4* è risultato essere espresso a livelli molto bassi, al limite della determinazione, in tutti i campioni. Questo può essere dovuto all'alterata attività di GLUT4, legata ad un'alterata trasmissione del segnale intracellulare dell'insulina a *SLC2A4* nel nucleo (Kalupahana & Moustaid-Moussa, 2012), o al marcato sbilanciamento redox (Rains & Jain, 2011) presenti in pazienti affetti da T2DM. Nel diabete, infatti, si ha una minore fosforilazione di IRS1 e una conseguente minore attività di PI3K, sotto stimolo insulinico, anche a causa dello sbilanciamento dell'attività mitocondriale (O'gorman *et al.*, 2006). L'alterata trasmissione del messaggio

biologico dell'insulina potrebbe quindi essere implicata nella mancata regolazione dell'espressione di *SLC2A4*.

In conclusione, la diversa espressione del gene codificante per la proteina Keap1 a seguito dei due trattamenti dietetici ha determinato la formulazione dell'ipotesi che vede il sistema Keap1–Nrf2 come uno dei principali meccanismi per spiegare gli effetti evidenziati a livello clinico.

Le successive analisi trascrittomiche hanno però evidenziato che il miglioramento del profilo glicemico, lipidico e infiammatorio evidenziato dalla sperimentazione clinica dopo dieta a base di grano KAMUT® (Whittaker *et al.*, 2017) non è legato a variazione di espressione dei geni *NFE2L2*, *HMOX1*, *CAT*, *GPX4*, *PPARG*, *AKT1* e *SLC2A4*, almeno a livello ematico.

Bisogna però considerare che il trattamento dietetico a base di KAMUT® potrebbe aver determinato una modulazione di isoforme degli stessi geni maggiormente espresse in tessuti maggiormente legati al controllo insulinemico e glicemico quali il tessuto muscolare, adiposo e pancreatico. La maggiore invasività di questo tipo di analisi non ha permesso una verifica a questi livelli.

A fronte, quindi, di una chiara efficacia clinica di un intervento con dieta a base di KAMUT® in soggetti diabetici (Whittaker *et al.*, 2017), le basi molecolari di questi effetti sono ancora da chiarire, tenendo conto non solo dei possibili effetti sul trascrittoma ma anche sul proteoma e metaboloma, sicuramente alterati dalla condizione diabetica.

## ***Bibliografia***

Abdel-Aal, E. S. M., & Rabalski, I. (2008). Bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. *Open Agriculture Journal*, 2(1), 7-14.

Abdel-Aal, E. S. M., Young, J. C., Rabalski, I., Hucl, P., & Fregeau-Reid, J. (2007). Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3), 787-794.

Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR [gamma] signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*, 9(5), 557-566.

Ahmed, A. M. (2002). History of diabetes mellitus. *Saudi medical journal*, 23(4), 373-378.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.

Altuhaish, A. A. K., & Yahya, S. (2014). Field Adaptation of Some Introduced Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes in Two Altitudes of Tropical Agro-Ecosystem Environment of Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 21(1), 31-38.

AMD – Associazione Medici Diabetologi & SID – Società Italiana di Diabetologia. Standard italiani per la cura del diabete mellito 2016 [http://www.standarditaliani.it/skin/www.standarditaliani.it/pdf/STANDARD\\_2016\\_June20.pdf](http://www.standarditaliani.it/skin/www.standarditaliani.it/pdf/STANDARD_2016_June20.pdf)

American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(Supplement 1), S81-S90.

American Diabetes Association. (2014). Executive summary: standards of medical care in diabetes—2014.

Andersson, A. A., Andersson, R., Piironen, V., Lampi, A. M., Nyström, L., Boros, D., Fras A., Gebruers K., Courtin C., Delcour J., Rakszegi M., Bedo Z., Ward J., Shewry P., Aman P. (2013). Contents of dietary fibre components and their relation to associated bioactive components in whole grain wheat samples from the HEALTHGRAIN diversity screen. *Food chemistry*, 136(3), 1243-1248.

Angioloni, A., & Collar, C. (2011). Nutritional and functional added value of oat, Kamut®, spelt, rye and buckwheat versus common wheat in breadmaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7), 1283-1292.

Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, C., 2002. Plant breeding and drought in C3 cereals: What should we breed for? *Ann Bot* 89: 925-940.

Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, Ø., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y. M., Lundin K.E., Koning F., Roepstorff P., Sollid L.M., McAdam, S.N. (2000). The intestinal T cell response to  $\alpha$ -gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *Journal of Experimental Medicine*, 191(4), 603-612.

Arzani, A., & Ashraf, M. (2017). Cultivated Ancient Wheats (*Triticum* spp.): A Potential Source of Health. Beneficial Food Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 477-488.

Ashraf, M. (2014). Stress-induced changes in wheat grain composition and quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(12), 1576-1583.

- Banerjee, M., & Vats, P. (2014). Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus. *Redox biology*, 2, 170-177.
- Baron, A. D. Hemodynamic actions of insulin. *Am. J. Physiol.* 267, E187–E202 (1994)
- Barrett, E. J., Wang, H., Upchurch, C. T., & Liu, Z. (2011). Insulin regulates its own delivery to skeletal muscle by feed-forward actions on the vasculature. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(2), E252-E263.
- Barron, C., Surget, A., & Rouau, X. (2007). Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science*, 45(1), 88-96.
- Behl, T., & Kotwani, A. (2015). Exploring the various aspects of the pathological role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy. *Pharmacological research*, 99, 137-148.
- Benedetti, S., Primiterra, M., Tagliamonte, M. C., Carnevali, A., Gianotti, A., Bordoni, A., & Canestrari, F. (2012). Counteraction of oxidative damage in the rat liver by an ancient grain (Kamut brand khorasan wheat). *Nutrition*, 28(4), 436-441.
- Bloch-Damti, A., & Bashan, N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 7(11-12), 1553-1567.
- Bonciarelli F., Bonciarelli U., Coltivazioni erbacee. Edagricole, Bologna, 1994.
- Bordoni, A., Danesi, F., Di Nunzio, M., Taccari, A., & Valli, V. (2017). Ancient wheat and health: a legend or the reality? A review on KAMUT khorasan wheat. *International journal of food sciences and nutrition*, 68(3), 278-286.
- Borràs-Gelonch, G., Rebetzke, G. J., Richards, R. A., & Romagosa, I. (2011). Genetic control of duration of pre-anthesis phases in wheat (*Triticum aestivum* L.) and relationships to leaf appearance, tillering, and dry matter accumulation. *Journal of experimental botany*, 63(1), 69-89.
- Brandolini, A., Hidalgo, A., & Moscaritolo, S. (2008). Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour. *Journal of Cereal Science*, 47(3), 599-609.
- Brandolini, A., Hidalgo, A., Plizzari, L., & Erba, D. (2011). Impact of genetic and environmental factors on einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) polysaccharides. *Journal of cereal science*, 53(1), 65-72.
- Caballero, L., Bancel, E., Debiton, C., Branlard, G. (2008). Granule-bound starch synthase (GBSS) diversity of ancient wheat and related species. *Plant Breeding*, 127(6), 548-553.
- Camerini, M. (2013). Effetto della tecnica agronomica e dell'ambiente pedo-climatico su accrescimento e resa quali-quantitativa di varietà di frumento duro.
- Canavari, M., Lombardi, P., & Spadoni, R. (2009). Evaluation of the potential interest of italian retail distribution chains for kamut-based products. *Journal of Food Products Marketing*, 16(1), 39-59.
- Cannella C., Pogna N., 2007 – Aspetti nutrizionali. In: Il grano. Collana “Coltura & Cultura” di Bayer CropScience S.r.l., ART Servizi Editoriali, Bologna. Pp. 50-59.
- Carnevali, A., Gianotti, A., Benedetti, S., Tagliamonte, M. C., Primiterra, M., Laghi, L., Danesi F., Valli V., Ndaghijimana M., Capozzi F., Canestrari F., Bordoni A. (2014). Role of Kamut® brand khorasan wheat in the counteraction of non-celiac wheat sensitivity and oxidative damage. *Food research international*, 63, 218-226.

- Centers for Disease Control and Prevention. (2011). National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2010. [http://www.caldiabetes.org/content\\_display.cfm?FontSize=normal&contentID=562&CategoriesID=31](http://www.caldiabetes.org/content_display.cfm?FontSize=normal&contentID=562&CategoriesID=31).
- Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3484-3492.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Nigro, F., De Angelis, M., Arnault, P., Gobbetti, M. (2008). Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and sourdough lactic acid bacteria during bread storage. *Applied and environmental microbiology*, 74(23), 7391-7398.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Pinto, D., Gobbetti, M. (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1087-1096.
- Cooper, R. (2015). Re-discovering ancient wheat varieties as functional foods. *Journal of traditional and complementary medicine*, 5(3), 138-143.
- Cramer, S. C., Pardridge, W. M., Hirayama, B. A., & Wright, E. M. (1992). Colocalization of GLUT2 glucose transporter, sodium/glucose cotransporter, and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in rat kidney with double-peroxidase immunocytochemistry. *Diabetes*, 41(6), 766-770.
- Cubadda, R., & Marconi, E. Cereali tra tradizione e innovazione: il contributo della Scienza.
- Chandi, G. K., Lok, C. W., Jie, N. Y., & Seetharaman, K. (2015). Functionality of Kamut and Millet flours in macro wire cut cookie systems. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 556-561.
- Chen, J., Zhang, Z., & Cai, L. (2014). Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. *Diabetes & metabolism journal*, 38(5), 337-345.
- De Lonlay, Saudubray J-M. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia. In: Fernandes J, Sudubray J-M, van den Berghe editors *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and treatment*. (3rd ed): Springer, Heidelberg Germany; 2000 p.117-26.
- DeFronzo, R. A. (2009). From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58(4), 773-795.
- DeFronzo, R. A. (2010). Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*, 53(7), 1270-1287.
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, R., Raz, I., Shulman, I., Testa M. A., Weiss, R., & Simonson, D. C. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15019-15019.
- Di Niro, R., Mesin, L., Zheng, N. Y., Stammaes, J., Morrissey, M., Lee, J.H., Huang M., Iversen R., du Pré M.F., Qiao S.W., Lundin K.E., Wilson P.C., Sollid L.M. (2012). High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. *Nature medicine*, 18(3), 441-445.
- Di Silvestro, R., Di Loreto, A., Marotti, I., Bosi, S., Bregola, V., Gianotti, A., & Dinelli, G. (2014). Effects of flour storage and heat generated during milling on starch, dietary fibre and polyphenols in stoneground flours from two durum-type wheats. *International journal of food science & technology*, 49(10), 2230-2236.

- Diamond, J. M. (1998). *Guns, germs and steel: a short history of everybody for the last 13,000 years*. Random House.
- Dinelli, G., Carretero, A. S., Di Silvestro, R., Marotti, I., Fu, S., Benedettelli, S., Ghiselli, L., Gutierrez, Al., & Gutiérrez, A. F. (2009). Determination of phenolic compounds in modern and old varieties of durum wheat using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7229-7240.
- Dinu M., Whittaker A., Pagliai G., Benedettelli S. & Sofi F. (2018) Ancient wheat species and human health: biochemical and clinical implications. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 52, 1-9.
- Dodson, G., & Steiner, D. (1998). The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Current opinion in structural biology*, 8(2), 189-194.
- Donath, M. Y., & Halban, P. A. (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia*, 47(3), 581-589.
- Donath, M. Y., Böni-Schnetzler, M., Ellingsgaard, H., & Ehses, J. A. (2009). Islet inflammation impairs the pancreatic  $\beta$ -cell in type 2 diabetes. *Physiology*, 24(6), 325-331.
- Donath, M. Y., Størling, J., Berchtold, L. A., Billestrup, N., & Mandrup-Poulsen, T. (2008). Cytokines and  $\beta$ -cell biology: from concept to clinical translation. *Endocrine reviews*, 29(3), 334-350.
- Edge, J. A., Jakes, R. W., Roy, Y., Hawkins, M., Winter, D., Ford-Adams, M. E., & Dunger, D. B. (2006). The UK case-control study of cerebral oedema complicating diabetic ketoacidosis in children. *Diabetologia*, 49(9), 2002-2009.
- Edmeades, G. O., Bolanos, J., Lafitte, H. R., Rajaram, S., Pfeiffer, W., & Fischer, R. A. (1989). *Traditional approaches to breeding for drought resistance in cereals*.
- Ehses, J. A., Ellingsgaard, H., Böni-Schnetzler, M., & Donath, M. Y. (2009). Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from  $\alpha$  and  $\beta$  cell compensation to dysfunction. *Archives of physiology and biochemistry*, 115(4), 240-247.
- Escarnot, E., Agneessens, R., Wathelet, B., & Paquot, M. (2010). Quantitative and qualitative study of spelt and wheat fibres in varying milling fractions. *Food chemistry*, 122(3), 857-863.
- Escarnot, E., Dornez, E., Verspreet, J., Agneessens, R., & Courtin, C. M. (2015). Quantification and visualization of dietary fibre components in spelt and wheat kernels. *Journal of Cereal Science*, 62, 124-133.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction?. *Diabetes*, 52(1), 1-8.
- Fardet, A., Rock, E., & Rémésy, C. (2008). Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo?. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 258-276.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for sustainable development*, 29(1), 185-212.
- Francia, R. (2013). *Studio di caratteri correlati a stress idrico in una collezione di cultivar di frumento duro (Triticum durum Desf.)* (Doctoral dissertation, alma).
- Gaede, P., Vedel, P., Larsen, N., Jensen, G. V., Parving, H. H., & Pedersen, O. (2003). Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 348(5), 383-393.

- Gao, Y., Zhang, M., Wu, T., Xu, M., Cai, H., & Zhang, Z. (2015). Effects of D-pinitol on insulin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in type 2 diabetes mellitus rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(26), 6019-6026.
- Gauthier, J., Gélinas, P., & Beauchemin, R. (2006). Effect of stone milled semolina granulation on the quality of bran rich pasta made from khorasan (Kamut®) and durum wheat. *International journal of food science & technology*, 41(5), 596-599.
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y., & Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1315-1323.
- Gebruers, K., Dornez, E., Boros, D., Dynkowska, W., Bedó, Z., Rakszegi, M., Delcour J.A., Courtin, C. M. (2008). Variation in the content of dietary fiber and components thereof in wheats in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9740-9749.
- Gerdes, S., Lerma-Ortiz, C., Frelin, O., Seaver, S. M., Henry, C. S., de Crécy-Lagard, V., & Hanson, A. D. (2012). Plant B vitamin pathways and their compartmentation: a guide for the perplexed. *Journal of experimental botany*, 63(15), 5379-5395.
- Gerich, J. E., Meyer, C., Woerle, H. J. & Stumvoll, M. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* 24, 382–391 (2001).
- Giacco, R., Costabile, G., Della Pepa, G., Anniballi, G., Griffio, E., Mangione, A., & Pacini, G. (2014). A whole-grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(8), 837-844.
- Giambanelli, E., Ferioli, F., Koçaoglu, B., Jorjadze, M., Alexieva, I., Darbinyan, N., & D'Antuono, L. F. (2013). A comparative study of bioactive compounds in primitive wheat populations from Italy, Turkey, Georgia, Bulgaria and Armenia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(14), 3490-3501.
- Gianotti, A., Danesi, F., Verardo, V., Serrazanetti, D. I., Valli, V., Russo, A., Bordoni, A. (2011). Role of cereal type and processing in whole grain in vivo protection from oxidative stress. *Front. Biosci*, 16, 1609-1618.
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J. M., Verrax, J., & Calderon, P. B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 87, 84-97.
- Gonzalez, E., & McGraw, T. E. (2009). Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 7004-7009.
- Gorelick, J., Yarmolinsky, L., Budovsky, A., Khalfin, B., Klein, J. D., Pinchasov, Y., Ben-Shabat, S. (2017). The Impact of Diet Wheat Source on the Onset of Type 1 Diabetes Mellitus—Lessons Learned from the Non-Obese Diabetic (NOD) Mouse Model. *Nutrients*, 9(5), 482.
- Goyal, M. M., & Basak, A. (2010). Human catalase: looking for complete identity. *Protein & cell*, 1(10), 888-897.
- Grausgruber, H., Sailer, C., Ghambashidze, G., Bolyos, L., & Ruckenbauer, P. (2004). Genetic variation in agronomic and qualitative traits of ancient wheats. In *Genetic variation for plant breeding. Proceedings of the 17th EUCARPIA General Congress, Tulln, Austria, 8-11 September 2004* (pp. 19-22). BOUK-University of Natural Resources and Applied Life Sciences.
- Grausgruber, H., Scheiblauber, J., Schönlechner, R., Ruckenbauer, P., & Berghofer, E. (2004). Variability in Chemical Composition and Biologically Active Constituents of Cereals. *Genetic Variation for Plant Breeding; Proceedings of the 17th EUCARPIA General Congress, Tulln, Austria, 8–11 September 2004*.

- Grommes, C., Landreth, G. E., & Heneka, M. T. (2004). Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. *The lancet oncology*, 5(7), 419-429.
- Haghighayegh, G., & Schoenlechner, R. (2010). Comparison of functional properties of isolated emmer and einkorn wheat starches. *J Food Agric Environ*, 8, 239-243.
- Hajiaghaalipour, F., Khalilpourfarshbafi, M., & Arya, A. (2015). Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus. *International journal of biological sciences*, 11(5), 508.
- Han, S., & Roman, J. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : a novel target for cancer therapeutics?. *Anti-cancer drugs*, 18(3), 237-244.
- Harding, H. P., & Ron, D. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes. *Diabetes*, 51(suppl 3), S455-S461.
- Haskå, L., Nyman, M., & Andersson, R. (2008). Distribution and characterisation of fructan in wheat milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 768-774.
- Havel, P. J. (2001). Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental Biology and Medicine*, 226(11), 963-977.
- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in biochemical sciences*, 39(4), 199-218.
- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., & Mills, G. B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 4(12), 988-1004.
- Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2012). Lipoxygenase activity in wholemeal flours from *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*. *Food chemistry*, 131(4), 1499-1503.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., & Ratti, S. (2009). Influence of genetic and environmental factors on selected nutritional traits of *Triticum monococcum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 6342-6348.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., & Piscozzi, R. (2006). Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *Journal of Cereal Science*, 44(2), 182-193.
- Hidalgo, A., Brusco, M., Plizzari, L., & Brandolini, A. (2013). Polyphenol oxidase, alpha-amylase and beta-amylase activities of *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*: a two-year study. *Journal of cereal science*, 58(1), 51-58.
- Hodges, R. E., & Minich, D. M. (2015). Modulation of metabolic detoxification pathways using foods and food-derived components: a scientific review with clinical application. *Journal of nutrition and metabolism*, 2015.
- Hollon, J., Puppa, E. L., Greenwald, B., Goldberg, E., Guerrerio, A., & Fasano, A. (2015). Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity. *Nutrients*, 7(3), 1565-1576.
- Homuth, G., Wahl, S., Müller, C., Schurmann, C., Mäder, U., Blankenberg, S., Dorr, M., Endlich, K., Englbrecht, C., Gieger, C., Grallert, H., Herder, C., Illig, T., Kruppa, J., Marzi, C., Mayerle, J., Meitinger, T., Metspalu, A., Nauck, M., Peters, A., Rathmann, W., Reinmaa, E., Retting, R., Roden, M., Schillert, A., Schramm, K., Steil, L., Strauch, K., Teumer, A., Volzke, H., Wallaschofski, H., Wild, P., Ziegler, A., Volker, U., Prokisch, H., Zeller, T., & Felix, S. B. (2015). Extensive alterations of the whole-blood

transcriptome are associated with body mass index: results of an mRNA profiling study involving two large population-based cohorts. *BMC medical genomics*, 8(1), 65.

Hu, F. B. (2011). Globalization of diabetes. *Diabetes care*, 34(6), 1249-1257.

Hull, R. L., Westermark, G. T., Westermark, P., & Kahn, S. E. (2004). Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 89(8), 3629-3643.

International Diabetes Federation (IDF). Diabetes atlas, 8th edition. 2017 <http://www.diabetesatlas.org/>

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 6th Edition (2013). IDF [online], [http://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Atlas\\_Full\\_0.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf).

ISTAT – Istituto nazionale di statistica ISTAT. Il diabete in Italia. 2017 <https://www.istat.it/it/archivio/202600>

Jiménez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M., & Saibil, H. R. (2002). The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9196-9201.

Johnson, R. K., Appel, L. J., Brands, M., Howard, B. V., Lefevre, M., Lustig, R. H., Sacks F., Steffen L.M., Wylie-Rosett, J. (2009). Dietary sugars intake and cardiovascular health. *Circulation*, 120(11), 1011-1020.

Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., & Moley, J. F. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 282(4), E974-E976.

Kahn, S. E., McCulloch, D. K., & Porte, D. (1997). Insulin secretion in the normal and diabetic human. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 2nd edn. J. Wiley & Sons, New York, 338-353.

Kalupahana, N. S., & Moustaid-Moussa, N. (2012). The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obesity Reviews*, 13(2), 136-149.

Kaneto, H., Nakatani, Y., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Matsuoka, T. A., Matsuhisa, M., & Yamasaki, Y. (2006). Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(5), 782-793.

Karnieli, E., & Armoni, M. (2008). Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(1), E38-E45.

Kido, Y., Nakae, J., & Accili, D. (2001). The insulin receptor and its cellular targets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(3), 972-979.

Kikuchi, G., Yoshida, T., & Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 558-567.

Kim, J. A., Wei, Y., & Sowers, J. R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circulation research*, 102(4), 401-414.

Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1309-1323.

Kohajdová, Z., & Karovicova, J. (2008). Nutritional value and baking application of spelt wheat. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 7(3), 5-14.

- Kotecha, R., Takami, A., & Espinoza, J. L. (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget*, 7(32), 52517.
- Lafiandra D., Sestili F., D'Ovidio R., Janni M., Botticella E., Ferrazzano G., Silvestri M., Ranieri R., De Ambrogio E., 2008 – Approaches for the modification of starch composition in Durum. International Durum Wheat Symposium (From seed to pasta: the durum wheat chain). Book of abstracts. P. 69.
- Landsberg, J. J. (1977). Effects of weather on plant development. In *Environmental Effects on Crop Physiology; Proceedings of Long Aston Symposium*.
- LARN 2017, Livelli di Assunzione giornalieri raccomandati di energia e nutrienti per la popolazione italiana, IV Revisione.
- Lenhard, J. M. (2001). PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. *Receptors & channels*, 7(4), 249-258.
- Leoncini, E., Prata, C., Malaguti, M., Marotti, I., Segura-Carretero, A., Catizone, P., Hrelia, S. (2012). Phytochemical profile and nutraceutical value of old and modern common wheat cultivars. *PloS one*, 7(9), e45997.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., & Abbo, S. (2000). The cradle of agriculture. *Science*, 288(5471), 1602-1603.
- Li, L., Dong, H., Song, E., Xu, X., Liu, L., & Song, Y. (2014). Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling. *Chemico-biological interactions*, 209, 56-67.
- Liew, C. C., Ma, J., Tang, H. C., Zheng, R., & Dempsey, A. A. (2006). The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 147(3), 126-132.
- Lin, Y., & Sun, Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*, 204(1), 1-11.
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207-219.
- Longin, C. F. H., & Würschum, T. (2016). Back to the future—tapping into ancient grains for food diversity. *Trends in plant science*, 21(9), 731-737.
- Lu, M. C., Ji, J. A., Jiang, Z. Y., & You, Q. D. (2016). The Keap1–Nrf2–ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update. *Medicinal research reviews*, 36(5), 924-963.
- Lucisano M., Pagani M.A., 1997. Cereali e derivati. In: Daghella A., Gli Alimenti: Aspetti tecnologici e nutrizionali. Istituto Danone. Pp. 7-68.
- Mackenzie, R. W., & Elliott, B. T. (2014). Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 7, 55.
- Maffei, A. (1999). Cap.8: La Nutrizione delle piante, pp 385-426. In: *Biochimica Vegetale*. Ed. Piccin N. L., Padova, 1999.
- Malaisse, W.J. Insulin biosynthesis and secretion *in vitro*. In: Alberti KGMM, Zimmet P, Defronzo RA & Keen H (Hon) editors. *International Textbook of Diabetes Mellitus* (2nd ed) John Wiley & Sons, New York; 1997 p. 315-36.
- Malik, A., Al-Senaidy, A., Skrzypczak-Jankun, E., & Jankun, J. (2012). A study of the anti-diabetic agents of camel milk. *International journal of molecular medicine*, 30(3), 585-592

- Malmstedt, J., Kärvestedt, L., Swedenborg, J., & Brismar, K. (2015). The receptor for advanced glycation end products and risk of peripheral arterial disease, amputation or death in type 2 diabetes: a population-based cohort study. *Cardiovascular diabetology*, 14(1), 93.
- Marotti, I., Bregola, V., Aloisio, I., Di Gioia, D., Bosi, S., Di Silvestro, R., Quinn, R., & Dinelli, G. (2012). Prebiotic effect of soluble fibres from modern and old durum type wheat varieties on Lactobacillus and Bifidobacterium strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2133-2140.
- Mbanya, J. C. (2009). The burden of type 2 diabetes mellitus in the African diaspora. Available at [www.medscape.com/view article/560718\\_2](http://www.medscape.com/view/article/560718_2).
- McPhee, S. J., Papadakis, M. A., & Tierney, L. M. (Eds.). (2010). *Current medical diagnosis & treatment 2010*. New York: McGraw-Hill Medical. mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates by insulin. *Diabetes*, 50 (12): 2652-8,
- MH Abdel-Haleem, A., A. Seleem, H., & K. Galal, W. (2012). Assessment of Kamut® wheat quality. *World Journal of Science, Technology and Sustainable Development*, 9(3), 194-203.
- Monneveux, P., Jing, R., & Misra, S. C. (2012). Phenotyping for drought adaptation in wheat using physiological traits. *Frontiers in physiology*, 3.
- Morrison, L. A. (1994). *Reevaluation of systematic relationships in Triticum L. and Aegilops L. based on comparative morphological and anatomical investigations of dispersal mechanisms* (Doctoral dissertation).
- Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*, 34(2), 121-138.
- Nanayakkara, W. S., Skidmore, P. M., O'Brien, L., Wilkinson, T. J., & Gearty, R. B. (2016). Efficacy of the low FODMAP diet for treating irritable bowel syndrome: the evidence to date. *Clinical and experimental gastroenterology*, 9, 131.
- Navarro-Alarcon, M., & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: a review. *Science of the total environment*, 400(1), 115-141.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S., & Pickett, C. B. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4536-4541.
- Nilsson, A. C., Östman, E. M., Granfeldt, Y., & Björck, I. M. (2008). Effect of cereal test breakfasts differing in glycemic index and content of indigestible carbohydrates on daylong glucose tolerance in healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 645-654
- Nilsson, A. C., Östman, E. M., Holst, J. J., & Björck, I. M. (2008). Including indigestible carbohydrates in the evening meal of healthy subjects improves glucose tolerance, lowers inflammatory markers, and increases satiety after a subsequent standardized breakfast. *The Journal of nutrition*, 138(4), 732-739.
- Nishina, P. M., & Freedland, R. A. (1990). Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *The Journal of nutrition*, 120(7), 668-673.
- Nurmi, T., Nystrom, L., Edelmann, M., Lampi, A. M., & Piironen, V. (2008). Phytosterols in wheat genotypes in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 9710-9715.

- O'gorman, D. J., Karlsson, H. K. R., McQuaid, S., Yousif, O., Rahman, Y., Gasparro, D., ... & Nolan, J. J. (2006). Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 49(12), 2983-2992.
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, 27(4), 269.
- Pan, A., Schernhammer, E. S., Sun, Q., & Hu, F. B. (2011). Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS medicine*, 8(12), e1001141.
- Panatta G. B., 1997 – Cereali e patate. In: F. Fidanza & G. Liguori. *Nutrizione Umana*. Pp. 268-289
- Pasqualone, A., Piergiovanni, A. R., Caponio, F., Paradiso, V. M., Summo, C., & Simeone, R. (2011). Evaluation of the technological characteristics and bread-making quality of alternative wheat cereals in comparison with common and durum wheat. *Food Science and Technology International*, 17(2), 135-142.
- Piergiovanni, A. R., Simeone, R., & Pasqualone, A. (2009). Composition of whole and refined meals of Kamut under southern Italian conditions. *Chem. Eng. Trans*, 17, 891-6.
- Piironen, V., Edelmann, M., Kariluoto, S., & Bedó, Z. (2008). Folate in wheat genotypes in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 9726-9731.
- Piperno, D. R., Weiss, E., Holst, I., & Nadel, D. (2004). Processing of wild cereal grains in the Upper Palaeolithic revealed by starch grain analysis. *Nature*, 430(7000), 670.
- Pogna N., (2007). Struttura genetica dei frumenti. In: Il grano. Collana “Coltura & Cultura” di Bayer CropScience S.r.l., ART Servizi Editoriali, Bologna. Pp. 219-221.
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2002). Minireview: secondary  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*, 143(2), 339-342.
- Polvani, S., Tarocchi, M., & Galli, A. (2012). PPAR $\gamma$  and Oxidative Stress: Con ( $\beta$ ) Catenating NRF2 and FOXO. *PPAR research*, 2012.).
- Quaglia, G. (2001). Aspetti tecnologici e nutrizionali della semola rimacinata di grano duro per la panificazione. *Autori Vari. Ottimizzazione delle materie prime, del processo di lievitazione e del confezionamento nella produzione industriale di pane e prodotti da forno convenzionali e dietetici (pop sicilia misura 10.4)*. Consorzio di Ricerca Gian Pietro Ballatore.
- Quinn, R. M. (1999). Kamut®: Ancient grain, new cereal.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological research*, 68(1), 125-131.
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological research*, 68(1), 125-131.
- Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567-575.
- Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567-575.
- Rizzello, C. G., Cassone, A., Coda, R., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food chemistry*, 127(3), 952-959.
- Rizzello, C. G., Cassone, A., Di Cagno, R., Gobbetti, M. (2008). Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(16), 6936-6943.

- Rother, K. I. (2007). Diabetes treatment—bridging the divide. *The New England journal of medicine*, 356(15), 1499.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799-806.
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*, 148(5), 852-871.
- Sandberg, J. C., Björck, I. M., & Nilsson, A. C. (2016). Rye-based evening meals favorably affected glucose regulation and appetite variables at the following breakfast; a randomized controlled study in healthy subjects. *PLoS one*, 11(3), e0151985.
- Scazzina, F., Del Rio, D., Serventi, L., Carini, E., & Vittadini, E. (2008). Development of nutritionally enhanced tortillas. *Food Biophysics*, 3(2), 235.
- Scialpi, A., & Mengoni, A. (2008). “*La PCR e le sue varianti: quaderno di laboratorio.*”, Firenze University Press.
- Schuit, F. C. (1997). Is GLUT2 required for glucose sensing?. *Diabetologia*, 40(1), 104-111
- Sereni, A., Cesari, F., Gori, A. M., Maggini, N., Marcucci, R., Casini, A., & Sofi, F. (2017). Cardiovascular benefits from ancient grain bread consumption: findings from a double-blinded randomized crossover intervention trial. *International journal of food sciences and nutrition*, 68(1), 97-103.
- Sharabi, K., Tavares, C. D., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Molecular aspects of medicine*, 46, 21-33.
- Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, 87(1), 4-14.
- Shewry, P. R., & Hey, S. (2015). Do “ancient” wheat species differ from modern bread wheat in their contents of bioactive components? *Journal of Cereal Science*, 65, 236-243.
- Shewry, P. R., Hawkesford, M. J., Piironen, V., Lampi, A. M., Gebruers, K., Boros, D., & Ward, J. L. (2013). Natural variation in grain composition of wheat and related cereals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(35), 8295-8303.
- Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1793.
- Simonson, D. C., Rossetti, L., Giaccari, A., & DeFronzo, R. A. (1997). Glucose toxicity. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, 2, 713-744.
- Simpson, I. A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K. H., Travis, A., & Vannucci, S. J. (2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(2), E242-E253.
- Slavin, J. (2003). Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 129-134.
- Slocum, S. L., Skoko, J. J., Wakabayashi, N., Aja, S., Yamamoto, M., Kensler, T. W., & Chartoumpekis, D. V. (2016). Keap1/Nrf2 pathway activation leads to a repressed hepatic gluconeogenic and lipogenic program in mice on a high-fat diet. *Archives of biochemistry and biophysics*, 591, 57-65.

- Sneddon, A. A., Wu, H. C., Farquharson, A., Grant, I., Arthur, J. R., Rotondo, D., & Wahle, K. W. (2003). Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants. *Atherosclerosis*, *171*(1), 57-65.
- Sofi, F., Ghiselli, L., Cesari, F., Gori, A. M., Mannini, L., Casini, A., Vazzana C., Vecchio V., Gensini G., Abbate R., Benedettelli, S. (2010). Effects of short-term consumption of bread obtained by an old Italian grain variety on lipid, inflammatory, and hemorheological variables: an intervention study. *Journal of medicinal food*, *13*(3), 615-620
- Sofi, F., Whittaker, A., Cesari, F., Gori, A. M., Fiorillo, C., Becatti, M., Marotti I., Dinelli G., Casini A., Abbate R., Benedettelli S., Gensini, G.F. (2013). Characterization of Khorasan wheat (Kamut) and impact of a replacement diet on cardiovascular risk factors: cross-over dietary intervention study. *European journal of clinical nutrition*, *67*(2), 190.
- Sofi, F., Whittaker, A., Gori, A. M., Cesari, F., Surrenti, E., Abbate, R., Gensini G.F., Benedettelli S., Casini A. (2014). Effect of *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* wheat on irritable bowel syndrome: a double-blinded randomised dietary intervention trial. *British Journal of Nutrition*, *111*(11), 1992-1999.
- Soria, B., Quesada, I., Ropero, A. B., Pertusa, J. A., Martín, F., & Nadal, A. (2004). Novel players in pancreatic islet signaling. *Diabetes*, *53*(suppl 1), S86-S91.
- Stallknecht, G. F., Gilbertson, K. M., & Ranney, J. E. (1996). Alternative wheat cereals as food grains: Einkorn, emmer, spelt, kamut, and triticale. *Progress in new crops*, 156-170.
- Stefanson, A. L., & Bakovic, M. (2014). Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients*, *6*(9), 3777-3801.
- Stern, M. (1999). Natural history of macrovascular disease in type 2 diabetes: role of insulin resistance. *Diabetes Care*, *22*, C2.
- Stringham, J. M., Bovier, E. R., Wong, J. C., & Hammond Jr, B. R. (2010). The influence of dietary lutein and zeaxanthin on visual performance. *Journal of food science*, *75*(1).
- Sun, X. J., & Rothenberg, P. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, *352*(6330), 73.
- Susan van, D., Beulens, J. W., Yvonne T. van der, S., Grobbee, D. E., & Nealb, B. (2010). The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, *17*(1\_suppl), s3-s8.
- Taha, C., Liu, Z., Jin, J., Al-Hasani, H., Sonenberg, N., & Klip, A. (1999). Opposite Translational Control of glut1 and glut4 glucose transporter mrnas in response to insulin role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in glut1 mRNA TRANSLATION. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(46), 33085-33091.
- Tan, Y., Ichikawa, T., Li, J., Si, Q., Yang, H., Chen, X., ... & Cui, T. (2011). Diabetic downregulation of Nrf2 activity via ERK contributes to oxidative stress-induced insulin resistance in cardiac cells in vitro and in vivo. *Diabetes*, *60*(2), 625-633.
- Taneyo Saa, D., Turrone, S., Serrazanetti, D. I., Rampelli, S., Maccaferri, S., Candela, M., Severgnini M., Simonetti E., Brigidi P., Gianotti, A. (2014). Impact of Kamut® Khorasan on gut microbiota and metabolome in healthy volunteers. *Food research international*, *63*, 227-232.
- Tee, A. R., Fingar, D. C., Manning, B. D., Kwiatkowski, D. J., Cantley, L. C., & Blenis, J. (2002). Tuberous sclerosis complex-1 and-2 gene products function together to inhibit mammalian target of

- rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13571-13576.
- Thorup, A. C., Gregersen, S., & Jeppesen, P. B. (2014). Ancient wheat diet delays diabetes development in a type 2 diabetes animal model. *The review of diabetic studies: RDS*, 11(3), 245.
- Threapleton, D. E., Greenwood, D. C., Evans, C. E., Cleghorn, C. L., Nykjaer, C., Woodhead, C., Cade J.E., Gale C.P., Burley, V.J. (2013). Dietary fibre intake and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 347, f6879.
- Tian, H., Zhang, B., Di, J., Jiang, G., Chen, F., Li, H., Li, L., Pei, D., & Zheng, J. (2012). Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKK $\beta$  and Bcl-2/Bcl-xL. *Cancer letters*, 325(1), 26-34.
- Toderi, G. D'Antuono, L.F. (2000). Capitolo: 12 Frumento (Triticum sp.pl), pp 75- 78. Libro: Coltivazioni erbacee, cereali e proteaginose – Terza edizione. Pàtron Editore, Bologna, 2000.
- Topping, D. (2007). Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 220-229.
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242.
- Università “la Sapienza” di Roma, Istituto di Scienza dell'alimentazione. Piramide alimentare italiana. 2005. Internet: <http://www.piramideitaliana.it>.
- Valli, V., Danesi, F., Gianotti, A., Di Nunzio, M., Taneyo Saa, D., & Bordoni, A. (2016). Antioxidative and anti-inflammatory effect of in vitro digested cookies baked using different types of flours and fermentation methods. *Food Research International*, 88, 256-262.
- Vander Haar, E., Lee, S. I., Bandhakavi, S., Griffin, T. J., & Kim, D. H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology*, 9(3), 316-323.
- Venter, C. S., Vorster, H. H., & Cummings, J. H. (1990). Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. *American Journal of Gastroenterology*, 85(5).
- Viggiani P., (2007). Caratteristiche botaniche. In: Il grano. Collana “Coltura & Cultura” di Bayer CropScience S.r.l., ART Servizi Editoriali, Bologna. 1-13.
- Volta, U., Caio, G., Karunaratne, T. B., Alaedini, A., & De Giorgio, R. (2017). Non-coeliac gluten/wheat sensitivity: advances in knowledge and relevant questions. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 11(1), 9-18.
- Wahli, W., & Michalik, L. (2012). PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(7), 351-363.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kang, M. I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., & Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 2040-2045.
- Wang, L., Gaziano, J. M., Liu, S., Manson, J. E., Buring, J. E., & Sesso, H. D. (2007). Whole-and refined-grain intakes and the risk of hypertension in women. *The American journal of clinical nutrition*, 86(2), 472-479.
- Wheeler, T. R., Hong, T. D., Ellis, R. H., Batts, G. R., Morison, J. I. L., & Hadley, P. (1996). The duration and rate of grain growth, and harvest index, of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to temperature and CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, 47(5), 623-630.

- Whittaker A., Dinu M., Cesari F., Gori A. M., Fiorillo C., Becatti M., Casini A., Rossella M., Benedettelli S., Sofi, F. (2017). A khorasan wheat-based replacement diet improves risk profile of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM): a randomized crossover trial. *European journal of nutrition*, 56(3), 1191-1200.
- Whittaker, A., Sofi, F., Luisi, M. L. E., Rafanelli, E., Fiorillo, C., Becatti, M., Abbate, M., Casini, R., Gensini, G., & Benedettelli, S. (2015). An organic khorasan wheat-based replacement diet improves risk profile of patients with acute coronary syndrome: a randomized crossover trial. *Nutrients*, 7(5), 3401-3415.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clinical biochemist reviews*, 26(2), 19.
- World Health Organization (WHO). Diabetes Program. 2017 <http://www.who.int/diabetes/en/>
- [www.kamut.com](http://www.kamut.com)
- Yadav, A., Kataria, M. A., Saini, V., & Yadav, A. (2013). Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta*, 417, 80-84.
- Yao, B., Fang, H., Xu, W., Yan, Y., Xu, H., Liu, Y., Mo M., Zhang H., Zhao, Y. (2014). Dietary fiber intake and risk of type 2 diabetes: a dose–response analysis of prospective studies.
- Ye, E. Q., Chacko, S. A., Chou, E. L., Kugizaki, M., & Liu, S. (2012). Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain. *The Journal of nutrition*, 142(7), 1304-1313.
- Zaharieva, M., Ayana, N. G., Al Hakimi, A., Misra, S. C., & Monneveux, P. (2010). Cultivated emmer wheat (*Triticum dicoccon* Schrank), an old crop with promising future: a review. *Genetic resources and crop evolution*, 57(6), 937-962.
- Zeyda, M., & Stulnig, T. M. (2009). Obesity, inflammation, and insulin resistance—a mini-review. *Gerontology*, 55(4), 379-386.
- Zhang, Q., Chen, L., Guo, K., Zheng, L., Liu, B., Yu, W., Guo, C., Liu, Z., Chen, Y., & Tang, Z. (2013). Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and antioxidative capacity in mice. *Biological trace element research*, 154(2), 255-261.
- Zhao, F. J., Su, Y. H., Dunham, S. J., Rakszegi, M., Bedo, Z., McGrath, S. P., & Shewry, P. R. (2009). Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *Journal of Cereal Science*, 49(2), 290-295.
- Zhu, B., Hershberger, P. E., Kapella, M. C., & Fritschi, C. (2017). The Relationship Between Sleep Disturbance and Glycemic Control in Adults With Type 2 Diabetes: An Integrative Review. *Journal of Clinical Nursing*.
- Ziegler, J. U., Schweiggert, R. M., Würschum, T., Longin, C. F. H., & Carle, R. (2016). Lipophilic antioxidants in wheat (*Triticum* spp.): A target for breeding new varieties for future functional cereal products. *Journal of Functional Foods*, 20, 594-605.
- Zimmermann, K., Baldinger, J., Mayerhofer, B., Atanasov, A. G., Dirsch, V. M., & Heiss, E. H. (2015). Activated AMPK boosts the Nrf2/HO-1 signaling axis—a role for the unfolded protein response. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 417-426



*Un pensiero va a tutti coloro, che, in un modo o nell'altro hanno contribuito all'elaborazione di questa tesi di laurea.*

*In primo luogo, ringrazio la Professoressa Alessandra Bordoni per avermi permesso di svolgere questa tesi e per la disponibilità nei miei confronti. Un particolare ringraziamento, inoltre, va a alla Dott.ssa Francesca Danesi per l'aiuto e il sostegno mostratomi in questi mesi e per i preziosi insegnamenti.*

*Inoltre, ringrazio la mia famiglia, mia mamma, Paul, i miei nonni, per aver creduto sempre in me, nelle mie capacità e nelle mie potenzialità, a tal punto da permettermi di arrivare fino a qui. Il loro aiuto quotidiano sin dalle piccole cose è stato fondamentale, grazie.*

*Ringrazio Simone C., il mio vicino di banco, per gli anni trascorsi in aula, per le lezioni interminabili, per le pause pranzo a prendere il sole o sotto la pioggia, per le chiacchiere e per essere diventato un grande amico.*

*Un pensiero di cuore va alle mie amiche, Margherita, Giulia, Martina, Camilla, Claudia, che, ognuna a modo suo, sono state con me in questi anni, sono cresciute con me e continuano ogni giorno a far parte di me.*

*Un ringraziamento speciale va ad Anna e Federica, pilastri della mia quotidianità, grazie per non aver mai dubitato di me, per essere le mie più grandi sostenitrici e per trasmettermi quel carisma che talvolta perdo. Grazie per esserci sempre, per aver reso un po' più belli questi ultimi mesi, sempre col sorriso, sempre pronte a sorreggermi anche quando pensavo di cadere. Siete la mia forza.*

*Infine, ringrazio il mio Simone, per esserci sempre, per avermi insegnato a gestire ciò che la vita ci riserva, sempre con ottimismo e serenità. Con te riesco ad affrontare ogni ostacolo. Grazie per quello che sei, per quello che mi trasmetti ogni giorno, per le tue parole, per condividere con me ogni istante.*