

a cura di Lorella Marselli

*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Pisa*

## Ottimizzare la sequenza di ingestione dei macronutrienti per migliorare il controllo glicemico postprandiale: dalla ricerca alla pratica clinica

Alessandro Mengozzi<sup>1</sup>, Lorenzo Nesti<sup>1</sup>,  
Domenico Tricò<sup>2,3</sup>

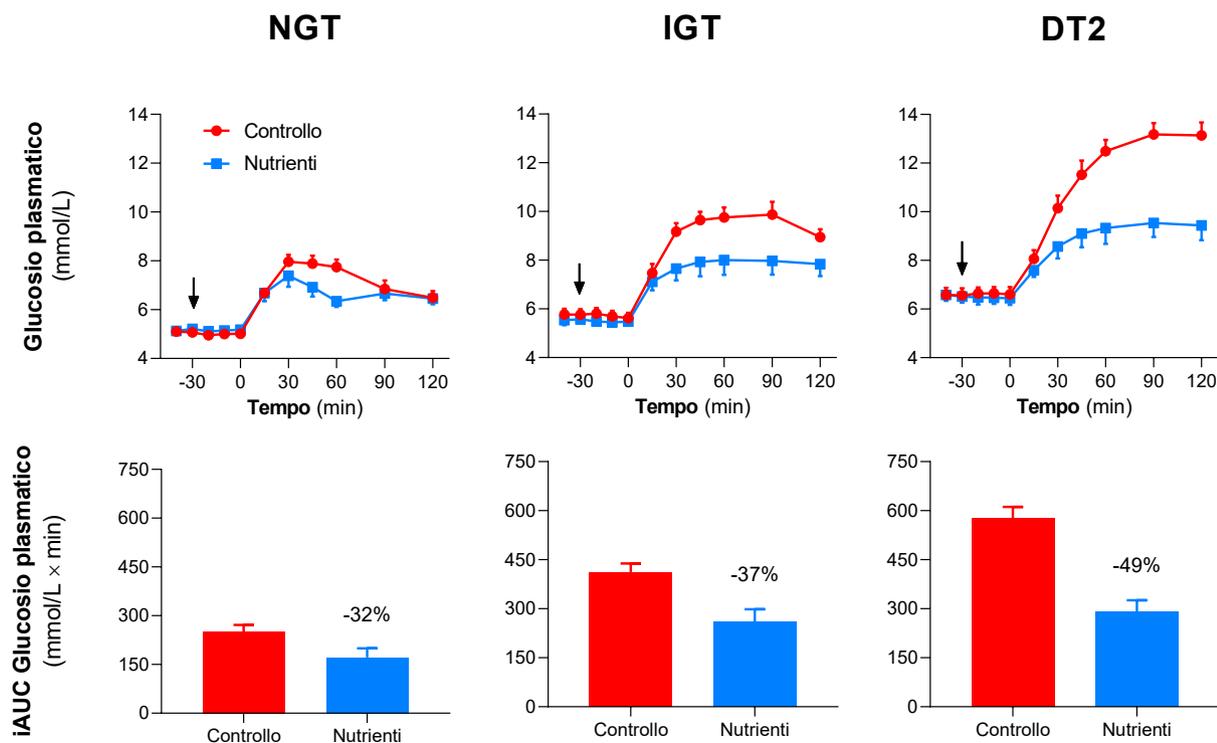
<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Pisa; <sup>2</sup>Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica, Università degli Studi di Pisa; <sup>3</sup>Istituto di Scienze della Vita, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

### INTRODUZIONE

Nella progressione del diabete mellito di tipo 2 (DT2), una patologia che interessa oltre 400 milioni di persone in tutto il mondo e con una prevalenza in costante aumento (1), la perdita del controllo glicemico postprandiale è generalmente la prima alterazione metabolica rilevabile (2-3). Non sorprende quindi che l'esposizione ad iperglicemia postprandiale sostenuta sia, di per sé, un fattore di rischio per lo sviluppo di DT2 (4-5) e delle sue complicanze micro- e macrovascolari (5-11), un'osservazione confermata anche dall'evidenza che strategie farmacologiche capaci di limitare l'escursione glicemica postprandiale risultano efficaci nel ridurre l'incidenza del DT2 (12-14). In assenza di malattia conclamata, tuttavia, l'impiego di trattamenti farmacologici non è supportato da chiare evidenze scientifiche ed è limitato da fattori etici ed economici, dato l'elevato numero di soggetti a rischio ("pre-diabetici") nella popolazione generale. Per tale motivo, è auspicabile lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche ipoglicemizzanti, non farmacologiche, con un più favorevole rapporto costo-beneficio e che possano essere implementate in condizioni di aumentato rischio per prevenire o ritardare lo sviluppo del diabete.

La terapia medica nutrizionale è indicata come trattamento di prima linea per il prediabete e il DT2 (15-16) e può essere uno strumento utile per migliorare la tolleranza glucidica. La quantità e la qualità dei carboidrati assunti con il pasto sono fra i principali determinanti dell'escursione glicemica postprandiale (17), per cui una restrizione del consumo di carboidrati (insieme a una riduzione dell'introito calorico giornaliero) è considerato un trattamento efficace per contrastare l'iperglicemia postprandiale. Analogamente ai carboidrati, altre classi di macronutrienti sono in grado di modulare, in maniera dose- e tempo-dipendente, i complessi processi fisiologici che regolano la glicemia postprandiale, tra cui la velocità dello svuotamento gastrico e l'assorbimento del glucosio, la secrezione di ormoni pancreatici e intestinali, l'estrazione epatica dell'insulina, l'utilizzo di glucosio da parte dei tessuti insulino-sensibili e la produzione endogena di glucosio (18). È noto tuttavia che l'aderenza a raccomandazioni nutrizionali di tipo restrittivo o qualitativo è in genere modesta, in particolare nel lungo periodo, riducendone progressivamente l'efficacia. Un approccio nutrizionale emergente per limitare l'iperglicemia postprandiale consiste nell'ingestione di una piccola quantità di alimenti ricchi di proteine e grassi all'inizio del pasto (19) (Fig. 1). Infatti, numerose osservazioni sperimentali hanno dimostrato che i macronutrienti non glucidici, quali proteine e grassi, possono migliorare sensibilmente la tolleranza al glucosio (20-25) se assunti prima degli alimenti ad elevato contenuto di carboidrati piuttosto che insieme o dopo di essi (21-22) (Tab. 1). Sulla base di queste osservazioni, è stato ipotizzato che ottimizzare la sequenza di ingestione dei

**Figura 1** ♦ Effetto di un piccolo “antipasto” misto non glucidico sulla risposta glicemica durante un test di tolleranza ad un carico orale di glucosio in soggetti con normale tolleranza al glucosio (NGT, n=12), alterata tolleranza al glucosio (IGT, n=13) o diabete mellito di tipo 2 (DT2, n=10). L'antipasto consisteva in un uovo sodo e 50 g di parmigiano (indicati come “nutrienti”), consumati 30 min prima dell'ingestione del glucosio (tempo -30 min, indicato dalla freccia). iAUC, area sotto la curva incrementale. Mod da Tricò et al., *Diabetologia* 2015 (25)



macronutrienti antepoendo ad ogni pasto il consumo di proteine e grassi possa rappresentare una strategia efficace e di facile attuazione per la prevenzione ed il trattamento dell'iperglicemia postprandiale.

Il numero di studi sperimentali a supporto di questo approccio nutrizionale è in rapida crescita (26). Tali studi sono però di difficile reperimento a causa della molteplicità delle parole chiave utilizzate dai diversi gruppi di ricerca per definire strategie dietetiche simili, quali ad esempio *premeal consumption* (27-28) o *nutrient preload* (22, 29-32) / *sequence* (33-34) / *order* (35). A questo si aggiunge l'estrema eterogeneità della qualità, quantità, tempistiche e modi di somministrazione dei singoli macronutrienti che contribuisce alla varietà degli effetti ipoglicemizzanti osservati e rende difficile l'interpretazione e il confronto dei diversi studi (36).

Lo scopo di questo lavoro consiste nell'analizzare, sulla base di un'accurata revisione della letteratura, le modalità e i meccanismi tramite cui l'ottimizzazione della sequenza di ingestione dei macronutrienti (proteine, lipidi e carboidrati) è in grado di migliorare il controllo glicemico postprandiale. Vengono inoltre presentate e messe a confronto le evidenze sperimentali disponibili, sia in condizioni acute che croniche, suddividendole per classi di tolleranza glucidica al fine di sottolinearne la potenziale rilevanza clinica come terapia di prima scelta nella patologia diabetica.

**Tabella 1** ◆ Studi che hanno valutato l'effetto della sequenza di ingestione dei macronutrienti sulla tolleranza al glucosio

	REF.	N	PRECARICO	TEMPO	CONTROLLO	PASTO	GLICEMIA POST-PRANDIALE
<b>Diabete mellito tipo 2</b>							
Gentilcore et al, 2006	(21)	6	30 ml olio d'oliva	-30'	30 ml acqua	65 g patate in polvere + 250 ml acqua + 20 g glucosio	Picco di glucosio ritardato di 65'
Ma et al, 2009	(22)	8	55 g proteine del siero + 350 ml acqua	-30'	350 ml acqua	65 g patate in polvere + 250 ml acqua + 20 g glucosio	iAUC glucosio -51%
Chen et al, 2010	(93)	10	30 g semi di soia + 75 g yogurt	-120'	Nessuno	51 g carboidrati + 4.8 g grassi + 5.8 g proteine	iAUC glucosio -36% Glicemia 2h -9%
Clifton et al, 2014	(94)	24	17 g proteine del siero + 3 g lattosio + 5 g guar + 150 ml acqua	-15'	150 ml acqua	2-3 fette di pane + marmellata e margarina, the e caffè	Picco di glucosio -1.4 mM Glicemia media -0.8 mM
Jakubovicz et al, 2014	(53)	15	50 g proteine del siero + 250 ml acqua	-30'	250 ml acqua	Colazione ad alto indice glicemico (353 kcal)	AUC glucosio -28%
Li et al, 2015	(29)	30	18 g Inzone® Vitality (7.6 g proteine + 1.8 g grassi + 1.6 g fibre + 5.2 g carboidrati) + 150 ml acqua	-30', ogni pasto, 12 settimane	Nessuno	Dieta normale	HbA1c -0.3% Glicemia 2h -14%
Ma et al, 2015	(98)	7	25 g proteine del siero + 100 ml acqua	-30', 4 settimane	100 ml acqua aromatizzata	Dieta normale <i>Studio acuto</i> : 65 g patate + 250 ml acqua + 20 g glucosio	Fruttosamina -9%* Picco di glucosio -5*-9%
Shukla et al, 2015	(35)	11	150 g carne di pollo + 170 g vegetali	-15'	Ordine inverso	90 g pane + 120 ml succo d'arancia	iAUC glucosio -73% Glicemia 2h -7%
Trico et al, 2015	(25)	10	50 g parmigiano + 50 g uovo + 300 ml acqua	-30'	500 ml acqua	75 g glucosio <i>per os</i>	iAUC glucosio -49%
Kuwata et al, 2016	(33)	12	100 g sgombro o 79 g carne di manzo	-15'	Ordine inverso	150 g riso	iAUC glucosio -30-40%
Trico et al, 2016	(31)	8	50 g parmigiano + 50 g uovo + 300 ml acqua	-30'	500 ml acqua	75 g glucosio <i>per os</i>	iAUC glucosio -28% Picco di glucosio -49%

	REF.	N	PRECARICO	TEMPO	CONTROLLO	PASTO	GLICEMIA POST-PRANDIALE
Trico et al, 2016	(104)	17	Pasto ricco di proteine e grassi prima dei carboidrati	Prima dei carboidrati, 8 settimane	Ordine inverso	Dieta isocalorica	HbA1c -0.3% * CV glucosio -32% Glicemia 2h -102%
Wu et al, 2016	(32)	22	25 g proteine del siero + 250 ml acqua	-30'	250 ml acqua aromatizzata	400 g lasagne di carne	AUC glucosio -1% * Picco di glucosio -5%
Shukla et al, 2017	(70)	16	150 g carne di pollo + 170 g vegetali	-10'	Ordine inverso	90 g pane + 120 ml succo d'arancia	iAUC glucosio -53% Picco di glucosio -54%
Bae et al, 2018	(28)	15	30 g barretta ricca di proteine e fibre + 150 ml acqua	-30'	Ordine inverso	100 g bagel + 70 g formaggio + 210 ml succo d'arancia	iAUC glucosio -25%
King et al, 2019	(79)	11	a) 15 g proteine del siero b) 15 g proteine del siero idrossilate	-0'	Placebo	Colazione: 60 g pane integrale + 250 ml latte intero Pranzo: 4 fette di pane, 5 g di burro, 100 g di carne di pollo	a) AUC glucosio ~ -15% Picco di glucosio ~ -15% b) AUC glucosio ~ -10% Picco di glucosio ~ -9%
<b>Alterata tolleranza al glucosio</b>							
Trico et al, 2015	(25)	12	50 g parmigiano + 50 g uovo + 300 ml acqua	-30'	500 ml acqua	75 g glucosio <i>per os</i>	iAUC glucosio -37%
Crouch and Slater, 2016	(96)	20	14 g mandorle + 237 ml acqua	-30'	Nessuno	75 g glucosio <i>per os</i>	AUC glucosio -15.5% Glicemia 2h -14%
Shukla et al, 2018	(95)	15	100 g carne di pollo + 285 vegetali + 15 ml olio d'oliva	-20'	Ordine inverso	90 g pane	iAUC glucosio -38.8%
<b>Normale tolleranza glucidica</b>							
Cunningham and Read, 1989	(20)	6	60 g margarina	-20'	300 ml consommé di carne	300 g purè di patate + 230 ml acqua	AUC glucosio -39% Picco di glucosio -18% ritardato di 58'
Akhavan et al, 2010	(27)	16	5-40 g proteine del siero + 400 ml acqua	-30'	300 ml acqua	12 kcal/kg pizza + 500 ml acqua	Riduzione dose-dipendente AUC glucosio (~0-50%)
Akhavan et al, 2014	(47)	10	10 o 20 g proteine del siero + 400 ml acqua	-30'	300 ml acqua	12 kcal/kg pizza + 500 ml acqua	Glicemia media -4%

	REF.	N	PRECARICO	TEMPO	CONTROLLO	PASTO	GLICEMIA POST-PRANDIALE
Trico et al, 2015	(25)	12	50 g parmigiano + 50 g uovo + 300 ml acqua	-30'	500 ml acqua	75 g glucosio <i>per os</i>	iAUC glucosio -32%
Kuwata et al, 2016	(33)	10	100 g sgombro 0 79 g carne di manzo	15'	Ordine inverso	150 g riso	AUC glucosio -19-30% *
Sun et al, 2017	(41)	20	322 ml latte di soia o di mucca	-30'	Nessuno	91 g pane bianco + 322 ml acqua	iAUC glucosio -40-49%
Nishino et al, 2018	(71)	8	60 g carne di maiale + 150 g vegetali + 5 ml olio d'oliva	Prima dei carboidrati	Ordine inverso	150 g riso + 45 g zucca + 75 g arancia + 150 ml acqua	AUC glucosio -48% *
Bae et al, 2018	(28)	15	30 g barretta ricca di proteine e fibre + 150 ml acqua	-30'	Ordine inverso	100 g bagel + 70 g parmigiano + 210 ml succo d'arancia	iAUC glucosio -18%
<b>Diabete mellito tipo 1</b>							
Faber et al, 2018	(97)	20	22 g parmigiano + 30 g carne di tacchino	-15'	22 g parmigiano + 30 g carne di tacchino nel pasto	2 fette di pane + 15 g marmellata + 150 ml succo d'arancia	AUC glucosio -19% * Glicemia media -9%
<b>Diabete gestazionale</b>							
Li et al, 2016	(30)	66	18 g Inzone® Vitality (7.6 g proteine + 1.8 g grassi + 1.6 g fibre + 5.2 g carboidrati) + 250 ml acqua	-30', ogni pasto, 7 settimane	18 g latte in polvere (3.5 proteine + 1.1 g grassi + 11.2 g carboidrati) + 250 ml acqua	Dieta standard	Glicemia a digiuno ~ -17% Glicemia a 2h ~ -5%

Effetto statisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) dove non altrimenti specificato. \* $p = ns$ .

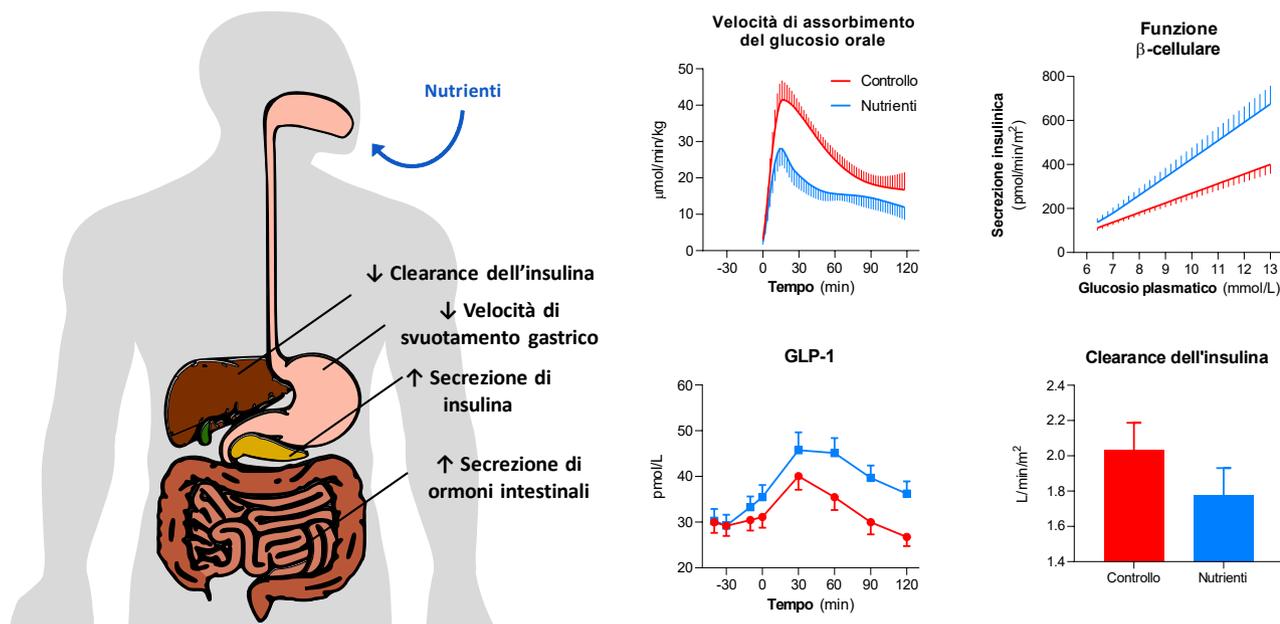
AUC, area sotto la curva; CV, coefficiente di variazione; HbA1c, emoglobina glicata; iAUC, AUC incrementale

## MECCANISMI FISIOLGICI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DELLA GLICEMIA POSTPRANDIALE ATTIVATI DAL CONSUMO DI MACRONUTRIENTI NON GLUCIDICI

### Svuotamento gastrico e assorbimento intestinale del glucosio

Lo svuotamento gastrico è uno dei principali determinanti della velocità di distribuzione e assorbimento del glucosio orale nell'intestino tenue, responsabile di circa un terzo della variabilità nell'escursione glicemica precoce osservata durante un test da carico orale di glucosio (OGTT) (37-40). È noto che l'effetto dei macronutrienti non glucidici sulla tolleranza al glucosio dipende in gran parte dalla loro capacità di ritardare lo svuotamento gastrico (21-22, 25, 31, 33, 36, 41). In tal senso, i lipidi sono i macronutrienti più efficaci (20, 37, 42-44). Nel 1989, Cunningham e Read (20) mostra-

**Figura 2** ♦ Meccanismi fisiologici attivati dal consumo di macronutrienti non glucidici responsabili del miglioramento nella risposta glicemica postprandiale. Nei grafici sono rappresentati gli effetti di un piccolo “antipasto” misto non glucidico (un uovo sodo e 50 g di parmigiano, indicati come “nutrienti”) sulla velocità di assorbimento intestinale del glucosio orale, la funzione  $\beta$ -cellulare, la secrezione di GLP-1 e la clearance dell’insulina durante un test di tolleranza ad un carico orale di glucosio in soggetti con diabete mellito di tipo 2 (n=10). Modificata da Nesti et al., *Front Endocrinol* 2019 (26) e Tricò et al., *Diabetologia* 2015 (25)



rono che il loro effetto è maggiore quando consumati prima di un pasto contenente carboidrati piuttosto che quando assunti in contemporanea ad esso, suggerendo una dipendenza di questo effetto dalla digestione dei lipidi in acidi grassi (21, 45-46). Nel 2009 è stata dimostrata una proprietà simile anche per le proteine (22), la cui azione, seppur di modesta entità (22, 47-48), appare sostenuta nel tempo (25) e mostra un peculiare effetto additivo rispetto a quello dei grassi. Il nostro gruppo ha dimostrato che l’assunzione di proteine e lipidi nella forma di un uovo sodo e di una piccola porzione di parmigiano (23 g proteine e 19 g grassi, per un totale di circa 250 kcal) 30 minuti prima di un OGTT è in grado di ridurre significativamente l’assorbimento del glucosio orale in soggetti con diversa tolleranza glucidica (da -16% in soggetti normali a -42% in soggetti con DT2) (25) (Fig. 2). In linea con questi risultati, Kuwata et al. (33) hanno osservato che sia la carne che il pesce, quando consumati prima di una porzione di riso, sono in grado di ritardare lo svuotamento gastrico con un effetto quantitativamente più evidente nei soggetti con DT2 (33). Analogamente a grassi e proteine, anche le fibre naturalmente presenti negli alimenti sono in grado di rallentare lo svuotamento gastrico grazie ad una duplice azione, la prima diretta sulla contrazione gastrica, la seconda indiretta secondaria all’aumento dell’escrezione biliare che determina un incremento dei livelli di *Glucagon-Like Peptide-1* (GLP-1), ormone intestinale coinvolto nel rallentamento della motilità gastrica (49-51). L’effetto delle fibre si osserva sia in soggetti diabetici che in soggetti sani, appare sinergico con quello delle proteine ed è particolarmente interessante dato il minimo contributo che le fibre aggiungono al contenuto calorico totale del pasto (28, 52).

### Funzione $\beta$ -cellulare

I macronutrienti non glucidici presentano un’azione insulintropica che contribuisce significativamente al loro effetto sul controllo glicemico postprandiale (21, 23, 25, 33, 35, 53-54). Le proteine si sono dimostrate particolarmente efficaci nello stimolare la secrezione di insulina indotta dal glucosio. Ma et al. (22) hanno mostrato infatti che il consumo di

proteine determina un incremento di 2-3 volte del rilascio di insulina stimolato da un successivo carico di carboidrati in individui con DT2, un dato confermato in altre popolazioni di soggetti diabetici e non diabetici (28, 48, 53). L'effetto insulintropico delle proteine è tempo- e dose-dipendente (22, 27) ed è verosimilmente secondario ad interazioni sia dirette che incretino-mediate degli aminoacidi con le  $\beta$ -cellule (54-58) (Fig. 3). Numerose evidenze suggeriscono infatti che l'incremento degli aminoacidi in circolo in seguito alla digestione delle proteine sia in grado di "pre-allertare" la  $\beta$ -cellula, producendo un rilascio di insulina più rapido e di maggiore entità in risposta al glucosio (59-60). Le proteine del siero del latte (*whey proteins*) sono particolarmente ricche in leucina ed aminoacidi ramificati; questo, unito ad un rapido assorbimento ed una pronta biodisponibilità, le rende particolarmente efficaci nel potenziare la secrezione insulinica (61-62). È interessante notare che questo effetto insulintropico si verifica anche per dosi modeste di proteine assunte: 10 g di proteine del siero del latte, intere od idrossilate, sono sufficienti ad incrementare sensibilmente i livelli di insulina plasmatica (27). Malgrado alcuni aminoacidi possiedano una più spiccata attività insulintropica rispetto ad altri, l'assunzione di proteine intere o la combinazione di più aminoacidi diversi è generalmente in grado di esercitare un effetto maggiore sulla  $\beta$ -cellula rispetto alla somministrazione di singoli aminoacidi separatamente (63). In tal senso, il nostro gruppo ha recentemente evidenziato una proporzionalità diretta tra l'incremento combinato dei livelli sierici di alanina, arginina, glutamina, leucina, lisina, e fenilalanina in seguito all'assunzione di alimenti ad elevato contenuto proteico e funzione  $\beta$ -cellulare in risposta ad un successivo carico orale di glucosio in soggetti con T2D (60) (Fig. 3).

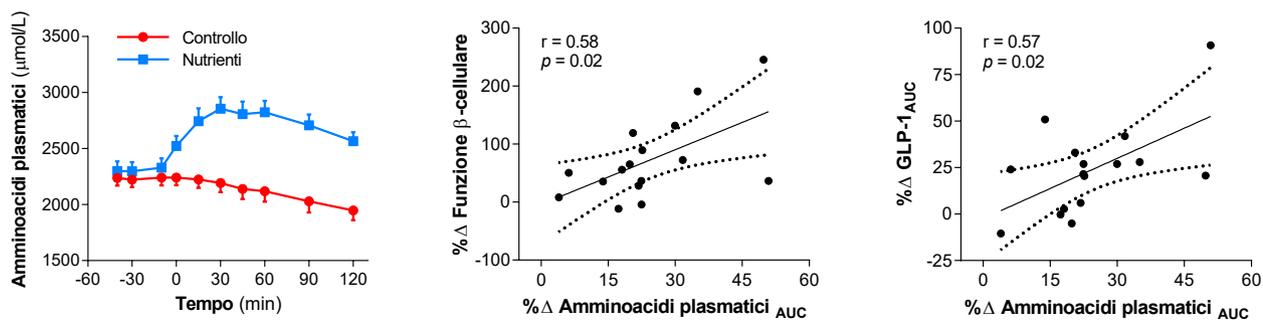
Per quanto concerne i grassi, anch'essi mostrano un effetto positivo sulla secrezione di insulina stimolata dal glucosio (58, 64-66), meno evidente rispetto a quello delle proteine in quanto tende ad essere mascherato dal più marcato effetto sullo svuotamento gastrico. Infatti, la riduzione della risposta glicemica dopo il consumo di grassi, dovuta principalmente al ritardo nell'assorbimento del glucosio, si accompagna tipicamente ad una risposta insulinemica ridotta e ritardata (20-21). Quando consumate in contemporanea, le due classi di macronutrienti mostrano un'interazione sinergica sulla secrezione insulinica (25, 31, 67, 68). Abbiamo infatti osservato che l'assunzione di proteine e grassi si associa ad una maggiore risposta insulinemica durante la prima ora dell'OGTT in tutte le diverse classi di tolleranza glucidica, nonostante una netta riduzione delle concentrazioni plasmatiche di glucosio (25). Questo si traduce in un miglioramento della funzione  $\beta$ -cellulare stimata di circa il 20% nei soggetti con normale tolleranza al glucosio e pre-diabetici e di circa il 60% nei soggetti diabetici (Fig. 2). Un incremento così spiccato della secrezione di insulina indotta dal glucosio nel soggetto diabetico rispetto al non diabetico può essere spiegato dal gradiente più elevato di aminoacidi plasmatici dopo la digestione e l'assorbimento delle proteine (54, 69). In altri studi volti a valutare l'effetto insulintropico combinato di proteine e grassi i risultati si sono rivelati eterogenei e, apparentemente, discordanti (33, 41, 70-71). Questo potrebbe essere giustificato, oltre che dai differenti protocolli sperimentali, anche da una differente e meno accurata misura della funzionalità  $\beta$ -cellulare (per esempio, non sempre i livelli di insulina e C-peptide sono stati corretti per la glicemia) unita ad un minore rapporto fra proteine e grassi assunti, che potrebbe contribuire a mascherare l'effetto insulintropico.

#### **Clearance dell'insulina e insulino sensibilità**

Oltre a una stimolazione diretta del rilascio di insulina indotto dal glucosio, il consumo di proteine e grassi può aumentare la biodisponibilità dell'insulina riducendone la degradazione epatica. A supporto di questa ipotesi, il nostro gruppo ha evidenziato una riduzione media della clearance dell'insulina di circa il 10% quando un OGTT di 2 ore veniva fatto precedere dall'assunzione di alimenti ricchi in proteine e grassi (Fig. 2), senza differenze significative tra soggetti con diversa tolleranza glucidica (25). In un esperimento simile in soggetti diabetici, abbiamo documentato che l'incremento dei livelli plasmatici di insulina durante un OGTT di 5 ore (+52%) era dovuto alla combinazione di una riduzione del 28% della clearance dell'insulina e un aumento del 22% della secrezione di insulina (31).

L'ingestione di alimenti ricchi di proteine e grassi all'inizio del pasto potrebbe avere un impatto sull'omeostasi post-prandiale del glucosio anche modulando l'azione periferica ed epatica dell'insulina. Tuttavia, nessuno studio ad oggi ha documentato una modifica significativa dell'insulino sensibilità in seguito a questo intervento dietetico (25, 31).

**Figura 3** ◆ Correlazione fra l'incremento degli aminoacidi plasmatici e il potenziamento della funzione  $\beta$ -cellulare e della secrezione di GLP-1 che si verificano in seguito all'ingestione di un piccolo "antipasto" misto non glucidico (un uovo sodo e 50 g di parmigiano, indicati come "nutrienti") durante un test di tolleranza ad un carico orale di glucosio in soggetti con diabete mellito di tipo 2 (n=16). % $\Delta$ , differenza percentuale fra studio con nutrienti e studio di controllo; AUC, area sotto la curva. Mod da Tricò et al., Eur J Nutr 2019 (60).



### Ormoni incretinici

Gli effetti ipoglicemizzanti di proteine e grassi potrebbero essere mediati dal rilascio di ormoni intestinali, quali il GLP-1 e il *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP) (22, 47-48, 72-77). GLP-1 e GIP sono comunemente indicati come "ormoni incretinici" in virtù della loro ben documentata azione insulinotropica sulle  $\beta$ -cellule pancreatiche. Questo effetto è glucosio- e dose-dipendente e, nel caso del GLP-1, appare ampiamente conservato nel soggetto diabetico (72, 78). Le incretine hanno tuttavia uno spettro di azione pleiotropico, che include una modulazione della motilità gastro-intestinale (GLP-1) (72, 78) e della clearance epatica dell'insulina (GIP) (76-77). Il rilascio di GLP-1 è stimolato indifferentemente dall'assunzione di proteine o grassi, mentre la secrezione di GIP sembrerebbe stimolata dalle proteine e inibita dai grassi, quando ingeriti separatamente (21-22, 28, 47-48, 53). Quando consumati insieme, proteine e grassi possono raddoppiare la secrezione di GIP stimolata dal glucosio e determinare un aumento più modesto ma significativo dei livelli di GLP-1 plasmatico (25). Questi effetti risultano quantitativamente paragonabili tra le varie classi di tolleranza glucidica, con una tendenza ad essere più pronunciati nei soggetti con alterata tolleranza al glucosio e diabetici (25, 31). In modo analogo, Kuwata et al. (33) hanno osservato che il consumo di carne o pesce prima dei carboidrati nello stesso pasto produce concentrazioni più elevate di GLP-1 e GIP, particolarmente in soggetti diabetici.

### Sistema nervoso centrale

Proteine e grassi possono modulare la risposta glicemica postprandiale anche in virtù degli effetti che esercitano sul cosiddetto asse intestino-cervello. Le proteine, in particolare, sono coinvolte nell'attivazione di segnali neuro-ormonali che determinano la sensazione di appetito e sazietà (79). Un pasto proteico determina un aumento della sensazione di sazietà che è maggiore, in entità, rispetto a quello di un pasto ad elevato contenuto di grassi o carboidrati (80-84). Questo effetto è dose-dipendente (27, 85) e potrebbe essere mediato dal rilascio di ormoni del sistema neuroendocrino intestinale ad azione ipressizzante, quali colecistochinina (CCK), peptide YY (PYY) e GLP-1 (86-87), unito alla soppressione della grelina (81). In acuto, i cambiamenti ormonali indotti dal consumo di proteine si potrebbero tradurre in una riduzione dell'introito calorico al pasto successivo (27, 88-89). Bowen et al. (89) hanno infatti osservato che una prolungata soppressione postprandiale della grelina ed un'elevazione di GLP-1 e CCK dopo il consumo di proteine si associava ad un minore consumo di calorie durante un successivo pasto *ad libitum*. Proteine di diversa origine sembrerebbero avere un effetto quantitativamente eterogeneo. Nello specifico, l'effetto più rilevante è stato dimostrato per le proteine

del siero del latte (86), le quali eserciterebbero una maggiore stimolazione sul rilascio del PYY rispetto ad altre (47). Il rilascio di CCK, PYY e GLP-1 stimolato da proteine (22, 47) e grassi (90-91), così come l'attivazione di feedback neuronali, potrebbe anche essere il meccanismo alla base del rallentamento della motilità gastro-intestinale e quindi dell'assorbimento postprandiale del glucosio. Infine, l'effetto insulinotropico dei macronutrienti potrebbe essere mediato dalla stimolazione sensoriale di vista, olfatto e gusto, i quali potrebbero innescare segnali parasimpatici responsabili del rilascio anticipato di insulina prima ancora dell'ingestione e digestione del pasto (92). Il contributo della cosiddetta "fase cefalica" della secrezione dell'insulina nell'uomo tuttavia è modesto (~1% del rilascio di insulina postprandiale) e transitorio (8-10 minuti dalla stimolazione sensoriale) (92). Inoltre, osservazioni sperimentali non supportano il ruolo dell'attivazione parasimpatica sul rilascio di insulina in seguito al consumo di proteine e grassi (25). Queste considerazioni suggeriscono che tale sistema rivesta un ruolo minore.

### **Glucagone**

Il consumo di proteine e grassi è in grado di stimolare acutamente la secrezione di glucagone (25, 31, 33, 48), il quale potrebbe diminuirne l'effetto ipoglicemizzante promuovendo la gluconeogenesi e la glicogenolisi. Tuttavia, è stato dimostrato che la soppressione della produzione endogena di glucosio durante OGTT non è influenzata dal consumo di proteine e grassi (25, 31), per cui la rilevanza e il significato dell'incremento della glucagonemia in questo contesto rimangono controversi.

## **IMPATTO DELLA SEQUENZA DI ASSUNZIONE DEI MACRONUTRIENTI SULLA GLICEMIA POSTPRANDIALE IN INDIVIDUI CON DIVERSA TOLLERANZA GLUCIDICA**

### **Diabete mellito di tipo 2**

Nei soggetti con DT2 il consumo di proteine e grassi - da soli o in combinazione - prima del pasto principale si è dimostrato efficace nel ridurre fino a normalizzare l'iperglicemia postprandiale (Tab. 1). Nel 2006, Gentilcore et al. (21) osservarono che l'assunzione di 30 ml di olio d'oliva 30 minuti prima di un pasto ad elevato contenuto di carboidrati permetteva di ritardare e ridurre l'escursione glicemica postprandiale in 6 soggetti diabetici. Nel 2009, lo stesso gruppo ha osservato una riduzione della glicemia postprandiale ancora più pronunciata dopo l'assunzione di 55 g di proteine del siero del latte in 8 soggetti con DT2 (22). Studi successivi hanno ripetutamente confermato che, all'interno dello stesso pasto, consumare alimenti ricchi in proteine o grassi prima di alimenti ricchi di carboidrati si traduce in una marcata riduzione dell'escursione glicemica postprandiale in pazienti con DT2, sia in termini di picco glicemico (-40%) che di escursione glicemica totale (fino a -70%) (25, 28, 31-33, 35, 53, 70, 93-94). Questo effetto è dose-dipendente e risulta quantitativamente minore quando proteine e grassi sono assunti separatamente rispetto alla loro combinazione, a causa degli effetti additivi e complementari su svuotamento gastrico e secrezione insulinica delle due classi di macronutrienti (79). Negli studi condotti dal nostro gruppo (25, 31), un piccolo "antipasto" ricco di proteine e grassi (50 g di parmigiano e un uovo sodo) si associava a una riduzione del 30-50% dell'area sotto la curva della glicemia durante OGTT in pazienti con DT2 ben controllati. Analogamente, Jakubowicz et al. (53) hanno mostrato una riduzione del 30% della glicemia postprandiale in seguito all'assunzione di 50 g di proteine del siero del latte prima di un pasto ad alto indice glicemico.

Da un punto di vista clinico, è interessante osservare come l'effetto di queste strategie nutrizionali appaia di entità sovrapponibile, se non addirittura maggiore, rispetto a quanto ottenibile con i farmaci antidiabetici orali attualmente disponibili. Wu et al. (32) hanno infatti documentato che l'effetto ipoglicemizzante acuto di una piccola quantità di proteine (25 g) è paragonabile a quello di un inibitore della dipeptidil peptidasi-4 (vildagliptin 50 mg) quando assunti prima di un carico di carboidrati. La combinazione di proteine e vildagliptin, inoltre, risulta più efficace nella riduzione della glicemia postprandiale rispetto a ciascuno dei due trattamenti singolarmente, suggerendo quindi un effetto additivo delle due strategie terapeutiche.

### Alterata tolleranza al glucosio

In soggetti con ridotta tolleranza al glucosio (*Impaired Glucose Tolerance*, IGT), l'ingestione di alimenti ricchi di proteine e grassi 30 minuti prima dell'OGTT è capace di ridurre la glicemia postprandiale del 37% rispetto a un OGTT di controllo (25) (Tab. 1). Shukla et al. (95) hanno osservato un effetto simile (-39%) nei soggetti IGT che consumavano alimenti proteici e verdure prima dei carboidrati, rispetto allo stesso pasto con alimenti consumati nell'ordine inverso. Infine, in 20 soggetti IGT e/o con glicemia isolata ad un'ora  $\geq 160$  mg/dl, una piccola quantità di mandorle (14 g) si è dimostrata efficace nel ridurre la glicemia postprandiale del 15% (96). In questo studio, l'effetto delle mandorle era maggiore nei soggetti con glicemia a 2 ore più elevata durante l'OGTT di controllo, suggerendo una correlazione inversa tra effetto ipoglicemizzante e grado individuale di tolleranza al glucosio (96).

### Normale tolleranza al glucosio

L'ottimizzazione della sequenza di assunzione dei macronutrienti sembra efficace nel ridurre l'iperglicemia postprandiale anche in soggetti con normale tolleranza al glucosio (*Normal Glucose Tolerance*, NGT) (Tab. 1). Assumere proteine del siero del latte o derivate dalla soia (27, 41, 47), cioccolato arricchito di proteine (28) o margarina (20) prima di un pasto ricco di carboidrati riduce la glicemia postprandiale in soggetti NGT in maniera dose-dipendente. In accordo con quanto sopra, il nostro gruppo ha dimostrato che alimenti ricchi di proteine e grassi consumati prima di un OGTT riducono del 32% l'escursione glicemica postprandiale (25). Infine, altri studi hanno mostrato che l'ingestione di carne, pesce o verdure prima di una porzione di riso ritarda di 30-60 minuti il picco glicemico postprandiale e lo riduce di quasi il 50% rispetto al medesimo pasto consumato in ordine inverso (33, 71).

### Diabete di tipo 1

La terapia del diabete di tipo 1 si basa sulla somministrazione di insulina esogena, la quale, nonostante i recenti miglioramenti farmacologici e tecnologici, è ancora gravata da aumentato rischio di ipoglicemia iatrogena. L'unico studio che ha valutato l'effetto della sequenza di assunzione dei macronutrienti nel diabete di tipo 1 è stato recentemente condotto da Faber et al. (97), i quali hanno dimostrato che proteine e grassi consumati 15 minuti prima dei carboidrati riducono di circa il 10% i livelli glicemici medi in una piccola popolazione di bambini e adolescenti affetti diabete di tipo 1. Questo studio è interessante in quanto ci permette di quantificare l'effetto dei macronutrienti sulla tolleranza glucidica indipendentemente dalle modifiche della secrezione insulinica endogena. Inoltre, da un punto di vista clinico è importante evidenziare che la riduzione dei livelli glicemici postprandiali, per quanto di entità relativamente modesta, non si associava ad un aumentato rischio di ipoglicemia (97).

### Diabete gestazionale

L'intolleranza al glucosio in gravidanza aumenta l'incidenza di complicanze peri- e postpartum nonché il rischio di malattie metaboliche nella madre e nel neonato. In un recente studio, Li et al. (30) hanno osservato una riduzione della glicemia sia a digiuno che postprandiale in donne affette da diabete gestazionale che assumevano un "antipasto" a basso contenuto di carboidrati dalla 24-28<sup>a</sup> settimana di gestazione al parto, rispetto ad un gruppo che assumeva un "antipasto" ad alto contenuto di carboidrati. Malgrado i risultati promettenti di questo studio, l'assenza di un gruppo di controllo non in trattamento impedisce di determinare con certezza l'efficacia e la sicurezza di questo approccio nutrizionale nel diabete gestazionale.

## EFFICACIA E SICUREZZA A LUNGO TERMINE

Malgrado numerosi studi sperimentali abbiano confermato l'effetto favorevole sulla glicemia postprandiale del consumo di proteine e grassi prima dei carboidrati nel singolo pasto, sono poche le evidenze circa l'efficacia, la fattibilità e la sicurezza in un orizzonte temporale più ampio. I risultati disponibili tuttavia sono confortanti ed in linea con le osservazioni nel breve periodo. In soggetti con DT2, anteporre il consumo di 25 g di proteine ad ogni pasto per 4 settimane ha

portato ad un miglioramento sostenuto dell'iperglicemia postprandiale, con una riduzione dei livelli di fruttosamina prossima alla significatività statistica ( $p=0,06$ ) (98). Inoltre, il consumo per 8-12 settimane di un piccolo "antipasto" composto da macronutrienti e fibre in polvere, a basso contenuto di carboidrati, è stato associato ad un miglioramento del controllo glicemico in individui con DT2 (29) e diabete gestazionale (30); la mancanza di un adeguato gruppo di controllo in questi studi, d'altro canto, richiede cautela nell'interpretazione dei risultati.

Gli studi citati hanno testato strategie dietetiche che richiedevano il consumo di integratori alimentari (ad es., proteine in polvere) in aggiunta a ciascun pasto, esponendo così i pazienti al rischio di un incremento ponderale conseguente al supplemento calorico. In questi studi tuttavia non sono state riscontrate variazioni significative di peso corporeo. Questo può essere attribuito al periodo di osservazione relativamente breve ma anche all'effetto saziante delle proteine, menzionato in precedenza (27, 29, 99-103). Un altro possibile limite di questo tipo di trattamenti è l'effettiva attuabilità degli stessi al di fuori di un contesto sperimentale. Tralasciando le considerazioni economiche, potrebbe essere infatti difficoltoso rispettare le dosi (spesso elevate) e le tempistiche (generalmente 30 minuti prima del pasto) di questi "antipasti" nella quotidianità. Tale problema potrebbe essere aggirato proponendo il consumo di dosi più modeste di nutrienti immediatamente prima del pasto, come recentemente suggerito (79).

Per sfruttare l'effetto ipoglicemizzante di proteine e grassi limitando il rischio di un incremento ponderale, nonché aumentando la fattibilità e il rapporto costo-efficacia di questi interventi, è stato proposto di manipolare la sequenza di assunzione dei macronutrienti all'interno del pasto, in alternativa all'aggiunta di alimenti specifici o formule artificiali all'inizio del pasto (19, 33-35, 70-71, 95, 104). In uno studio pilota della durata di 8 settimane, l'aderenza a raccomandazioni dietetiche focalizzate sull'ordine di assunzione dei macronutrienti è stata eccellente e ha determinato un miglioramento significativo del controllo glicemico postprandiale in soggetti con DT2, senza associarsi a variazioni di peso o alterazioni del profilo lipidico (104). Questi dati, se pur preliminari e non ulteriormente confermati, supportano l'implementazione di schemi nutrizionali caratterizzati dall'assunzione di alimenti ad alto contenuto di carboidrati al termine del pasto quale strategia comportamentale efficace e sicura per limitare le escursioni glicemiche postprandiali.

## CONCLUSIONI

La sequenza di ingestione dei macronutrienti durante il pasto è un fattore determinante nel modulare i complessi meccanismi fisiologici responsabili dell'omeostasi glicemica. È stato infatti dimostrato che l'adozione di specifici schemi alimentari caratterizzati dall'assunzione di alimenti proteici e lipidici all'inizio del pasto è in grado di determinare un ritardo nello svuotamento gastrico, un aumento della secrezione di insulina stimolata dal glucosio e una riduzione della clearance epatica dell'insulina. Questo si traduce, rispettivamente, in un più lento assorbimento intestinale del glucosio e un incremento della risposta insulinemica, che a loro volta possono determinare una netta riduzione dell'escursione glicemica postprandiale (21-22, 60). Le evidenze cliniche disponibili suggeriscono che questo effetto ipoglicemizzante sia di entità paragonabile a quello dei farmaci antidiabetici di uso corrente (32), persistente nel lungo periodo (104) e maggiore in individui con malattia conclamata rispetto ai soggetti con IGT e NGT (36).

Strategie dietetiche basate sull'assunzione di piccoli "antipasti" proteici o lipidici potrebbero essere efficaci nella gestione dell'iperglicemia postprandiale nel paziente diabetico, da sole o in combinazione con trattamenti farmacologici, con i quali mostrerebbero effetti additivi (32). Sarebbero inoltre particolarmente utili in contesti clinici in cui le opzioni farmacologiche a disposizione sono limitate, quali il diabete di tipo 1 (97) e il diabete gestazionale (30), o presentano un basso rapporto costo-efficacia, come nel "prediabete" (25, 95). Un simile effetto sarebbe ottenibile anche tramite l'ottimizzazione della sequenza di ingestione dei macronutrienti durante il pasto (19, 33-35, 70-71, 95, 104). Questo approccio non aumenterebbe il consumo calorico giornaliero e mostrerebbe un miglior rapporto costo-efficacia. Nonostante le evidenze sperimentali siano numerose e in rapido aumento, sono tuttavia necessari studi più ampi per confermare l'efficacia e la sicurezza clinica di questi interventi nutrizionali nei diversi contesti clinici, soprattutto nel lungo periodo.

In sintesi, dati sperimentali indicano che l'ordine di ingestione dei macronutrienti durante il pasto è uno dei principali determinanti della risposta glicemica postprandiale, supportando l'adozione di schemi alimentari caratterizzati dal consumo di alimenti ricchi di proteine e grassi all'inizio del pasto quale approccio terapeutico efficace, sicuro ed economicamente sostenibile per la prevenzione e la gestione dell'iperglicemia postprandiale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ingelfinger JR, Jarcho JA. Increase in the Incidence of Diabetes and Its Implications. *N Engl J Med* 376(15): 1473-4, 2017.
2. Lebovitz HE. Postprandial hyperglycaemic state: importance and consequences. *Diabetes Res Clin Pract* 40 Suppl: S27-8, 1998.
3. Monnier L, Lapinski H, Colette C. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients: variations with increasing levels of HbA(1c). *Diabetes Care* 26(3): 881-5, 2003.
4. Abdul-Ghani MA, Abdul-Ghani T, Ali N, Defronzo RA. One-hour plasma glucose concentration and the metabolic syndrome identify subjects at high risk for future type 2 diabetes. *Diabetes Care* 31(8): 1650-5, 2008.
5. Gerstein HC, Santaguida P, Raina P, Morrison KM, Balion C, Hunt D, et al. Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: a systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Res Clin Pract* 78(3): 305-12, 2007.
6. Kawasaki R, Wang JJ, Wong TY, Kayama T, Yamashita H. Impaired glucose tolerance, but not impaired fasting glucose, is associated with retinopathy in Japanese population: the Funagata study. *Diabetes Obes Metab* 10(6): 514-5, 2008.
7. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 22(6): 920-4, 1999.
8. Leiter LA, Ceriello A, Davidson JA, Hanefeld M, Monnier L, Owens DR, et al. Postprandial glucose regulation: new data and new implications. *Clin Ther* 27 Suppl B: S42-56, 2005.
9. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe*. *Lancet* 354(9179): 617-21, 1999.
10. Cavalot F, Pagliarino A, Valle M, Di Martino L, Bonomo K, Massucco P, et al. Postprandial blood glucose predicts cardiovascular events and all-cause mortality in type 2 diabetes in a 14-year follow-up: lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study. *Diabetes Care* 34(10): 2237-43, 2011.
11. Ceriello A, Hanefeld M, Leiter L, Monnier L, Moses A, Owens D, et al. Postprandial glucose regulation and diabetic complications. *Arch Intern Med* 164(19): 2090-5, 2004.
12. Chiasson JL, Josse RG, Comis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M, et al. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA* 290(4): 486-94, 2003.
13. Raz I, Ceriello A, Wilson PW, Battiou C, Su EW, Kerr L, et al. Post hoc subgroup analysis of the HEART2D trial demonstrates lower cardiovascular risk in older patients targeting postprandial versus fasting/premeal glycemia. *Diabetes Care* 34(7): 1511-3, 2011.
14. DeFronzo RA, Tripathy D, Schwenke DC, Banerji M, Bray GA, Buchanan TA, et al. Pioglitazone for diabetes prevention in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 364(12): 1104-15, 2011.
15. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 41(12): 2669-701, 2018.
16. Evert AB, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ, et al. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care* 36(11): 3821-42, 2013.
17. Evert AB, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ, et al. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care* 37(Suppl 1): S120-43, 2014.

18. Gerich J. Pathogenesis and management of postprandial hyperglycemia: role of incretin-based therapies. *Int J Gen Med* 6: 877-95, 2013.
19. Trico D, Natali A. Modulation of postprandial glycaemic responses by noncarbohydrate nutrients provides novel approaches to the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 106(2): 701-2, 2017.
20. Cunningham KM, Read NW. The effect of incorporating fat into different components of a meal on gastric emptying and postprandial blood glucose and insulin responses. *The British journal of nutrition* 61(2): 285-90, 1989.
21. Gentilcore D, Chaikomin R, Jones KL, Russo A, Feinle-Bisset C, Wishart JM, et al. Effects of fat on gastric emptying of and the glycaemic, insulin, and incretin responses to a carbohydrate meal in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 91(6): 2062-7, 2006.
22. Ma J, Stevens JE, Cukier K, Maddox AF, Wishart JM, Jones KL, et al. Effects of a protein preload on gastric emptying, glycaemia, and gut hormones after a carbohydrate meal in diet-controlled type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32(9): 1600-2, 2009.
23. Meng H, Matthan NR, Ausman LM, Lichtenstein AH. Effect of macronutrients and fiber on postprandial glycaemic responses and meal glycaemic index and glycaemic load value determinations. *Am J Clin Nutr* 105(4): 842-53, 2017.
24. Wolever TM, Nuttall FQ, Lee R, Wong GS, Josse RG, Csima A, et al. Prediction of the relative blood glucose response of mixed meals using the white bread glycaemic index. *Diabetes Care* 8(5): 418-28, 1985.
25. Trico D, Baldi S, Tulipani A, Frascerra S, Macedo MP, Mari A, et al. Mechanisms through which a small protein and lipid preload improves glucose tolerance. *Diabetologia* 58(11): 2503-12, 2015.
26. Nesti L, Mengozzi A, Trico D. Impact of Nutrient Type and Sequence on Glucose Tolerance: Physiological Insights and Therapeutic Implications. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 144, 2019.
27. Akhavan T, Luhovyy BL, Brown PH, Cho CE, Anderson GH. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycaemia and insulin responses in young adults. *Am J Clin Nutr* 91(4): 966-75, 2010.
28. Bae JH, Kim LK, Min SH, Ahn CH, Cho YM. Postprandial glucose-lowering effect of premeal consumption of protein-enriched, dietary fiber-fortified bar in individuals with type 2 diabetes mellitus or normal glucose tolerance. *J Diabetes Investig* 9(5): 1110-8, 2018.
29. Li CJ, Norstedt G, Hu ZG, Yu P, Li DQ, Li J, et al. Effects of a Macro-Nutrient Preload on Type 2 Diabetic Patients. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6: 139, 2015.
30. Li L, Xu J, Zhu W, Fan R, Bai Q, Huang C, et al. Effect of a macronutrient preload on blood glucose level and pregnancy outcome in gestational diabetes. *J Clin Transl Endocrinol* 5: 36-41, 2016.
31. Trico D, Filice E, Baldi S, Frascerra S, Mari A, Natali A. Sustained effects of a protein and lipid preload on glucose tolerance in type 2 diabetes patients. *Diabetes Metab* 42(4): 242-8, 2016.
32. Wu T, Little TJ, Bound MJ, Borg M, Zhang X, Deacon CF, et al. A Protein Preload Enhances the Glucose-Lowering Efficacy of Vildagliptin in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 39(4): 511-7, 2016.
33. Kuwata H, Iwasaki M, Shimizu S, Minami K, Maeda H, Seino S, et al. Meal sequence and glucose excursion, gastric emptying and incretin secretion in type 2 diabetes: a randomised, controlled crossover, exploratory trial. *Diabetologia* 59(3): 453-61, 2016.
34. Monnier L, Bonnet F, Colette C. Tailoring nutrient sequence and content to improve glucose tolerance: Why and how to do it. *Diabetes Metab* 42(4): 211-4, 2016.
35. Shukla AP, Iliescu RG, Thomas CE, Aronne LJ. Food Order Has a Significant Impact on Postprandial Glucose and Insulin Levels. *Diabetes Care* 38(7): e98-9, 2015.
36. Trico D, Natali A. Modulation of postprandial glycaemic responses by noncarbohydrate nutrients provides novel approaches to the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 106(2): 701-2, 2017.
37. Chaikomin R, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Upper gastrointestinal function and glycaemic control in diabetes mellitus. *World journal of gastroenterology* 12(35): 5611-21, 2006.
38. Horowitz M, Edelbroek MA, Wishart JM, Straathof JW. Relationship between oral glucose tolerance and gastric emptying in normal healthy subjects. *Diabetologia* 36(9): 857-62, 1993.

39. Fiacchini G, Cerchiai N, Trico D, Sellari-Franceschini S, Casani AP, Dallan I, et al. Frey Syndrome, First Bite Syndrome, great auricular nerve morbidity, and quality of life following parotidectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 275(7): 1893-902, 2018.
40. Jones KL, Horowitz M, Carney BI, Wishart JM, Guha S, Green L. Gastric emptying in early noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 37(10): 1643-8, 1996.
41. Sun L, Tan KWJ, Han CMS, Leow MK, Henry CJ. Impact of preloading either dairy or soy milk on postprandial glycemia, insulinemia and gastric emptying in healthy adults. *Eur J Nutr* 56(1): 77-87, 2017.
42. Houghton LA, Mangnall YF, Read NW. Effect of incorporating fat into a liquid test meal on the relation between intragastric distribution and gastric emptying in human volunteers. *Gut* 31(11): 1226-9, 1990.
43. Collier G, O'Dea K. The effect of coingestion of fat on the glucose, insulin, and gastric inhibitory polypeptide responses to carbohydrate and protein. *Am J Clin Nutr* 37(6): 941-4, 1983.
44. Lin HC, Zhao XT, Wang L. Fat absorption is not complete by midgut but is dependent on load of fat. *The American journal of physiology* 271(1 Pt 1): G62-7, 1996.
45. Chaikomin R, Russo A, Rayner CK, Feinle-Bisset C, O'Donovan DG, Horowitz M, et al. Effects of lipase inhibition on gastric emptying and alcohol absorption in healthy subjects. *The British journal of nutrition* 96(5): 883-7, 2006.
46. O'Donovan D, Horowitz M, Russo A, Feinle-Bisset C, Murolo N, Gentilcore D, et al. Effects of lipase inhibition on gastric emptying of, and on the glycaemic, insulin and cardiovascular responses to, a high-fat/carbohydrate meal in type 2 diabetes. *Diabetologia* 47(12): 2208-14, 2004.
47. Akhavan T, Luhovyy BL, Panahi S, Kubant R, Brown PH, Anderson GH. Mechanism of action of pre-meal consumption of whey protein on glycemic control in young adults. *J Nutr Biochem* 25(1): 36-43, 2014.
48. Bjornshave A, Holst JJ, Hermansen K. Pre-Meal Effect of Whey Proteins on Metabolic Parameters in Subjects with and without Type 2 Diabetes: A Randomized, Crossover Trial. *Nutrients* 10(2), 2018.
49. Jenkins DJ, Wolever TM, Leeds AR, Gassull MA, Haisman P, Dilawari J, et al. Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: importance of viscosity. *British medical journal* 1(6124): 1392-4, 1978.
50. Kesaniemi YA, Tarpila S, Miettinen TA. Low vs high dietary fiber and serum, biliary, and fecal lipids in middle-aged men. *Am J Clin Nutr* 51(6): 1007-12, 1990.
51. Raben A, Tagliabue A, Christensen NJ, Madsen J, Holst JJ, Astrup A. Resistant starch: the effect on postprandial glycemia, hormonal response, and satiety. *Am J Clin Nutr* 60(4): 544-51, 1994.
52. Kim EK, Oh TJ, Kim LK, Cho YM. Improving Effect of the Acute Administration of Dietary Fiber-Enriched Cereals on Blood Glucose Levels and Gut Hormone Secretion. *Journal of Korean medical science* 31(2): 222-30, 2016.
53. Jakubowicz D, Froy O, Ahren B, Boaz M, Landau Z, Bar-Dayana Y, et al. Incretin, insulinotropic and glucose-lowering effects of whey protein pre-load in type 2 diabetes: a randomised clinical trial. *Diabetologia* 57(9): 1807-11, 2014.
54. Trico D, Trifiro S, Mengozzi A, Morgantini C, Baldi S, Mari A, et al. Reducing Cholesterol and Fat Intake Improves Glucose Tolerance by Enhancing beta Cell Function in Nondiabetic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 103(2): 622-31, 2018.
55. Floyd JC, Jr., Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* 45(9): 1487-502, 1966.
56. van Loon LJ, Saris WH, Verhagen H, Wagenmakers AJ. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr.* 72(1): 96-105, 2000.
57. Floyd JC, Jr., Fajans SS, Pek S, Thiffault CA, Knopf RF, Conn JW. Synergistic effect of certain amino acid pairs upon insulin secretion in man. *Diabetes* 19(2): 102-8, 1970.
58. Newsholme P, Cruzat V, Arfuso F, Keane K. Nutrient regulation of insulin secretion and action. *The Journal of endocrinology* 221(3): R105-20, 2014.
59. Nilsson M, Stenberg M, Frid AH, Holst JJ, Bjorck IM. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr* 80(5): 1246-53, 2004.

60. Trico D, Frascerra S, Baldi S, Mengozzi A, Nesti L, Mari A, et al. The insulinotropic effect of a high-protein nutrient preload is mediated by the increase of plasma amino acids in type 2 diabetes. *Eur J Nutr* 58(6): 2253-61, 2019.
61. Haraguchi FK, Pedrosa ML, Paula H, Santos RC, Silva ME. Evaluation of biological and biochemical quality of whey protein. *Journal of medicinal food* 13(6): 1505-9, 2010.
62. Pasin G, Comerford KB. Dairy foods and dairy proteins in the management of type 2 diabetes: a systematic review of the clinical evidence. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*. 6(3): 245-59, 2015.
63. Gannon MC, Nuttall FQ. Amino acid ingestion and glucose metabolism--a review. *IUBMB life* 62(9): 660-8, 2010.
64. Natali A, Baldi S, Bonnet F, Petrie J, Trifiro S, Trico D, et al. Plasma HDL-cholesterol and triglycerides, but not LDL-cholesterol, are associated with insulin secretion in non-diabetic subjects. *Metabolism* 69: 33-42, 2017.
65. Trico D, Natali A, Mari A, Ferrannini E, Santoro N, Caprio S. Triglyceride-rich very low-density lipoproteins (VLDL) are independently associated with insulin secretion in a multiethnic cohort of adolescents. *Diabetes Obes Metab* 20(12): 2905-10, 2018.
66. Seghieri M, Trico D, Natali A. The impact of triglycerides on glucose tolerance: Lipotoxicity revisited. *Diabetes Metab* 43(4): 314-22, 2017.
67. Alsalm W, Tura A, Pacini G, Omar B, Bizzotto R, Mari A, et al. Mixed meal ingestion diminishes glucose excursion in comparison with glucose ingestion via several adaptive mechanisms in people with and without type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 18(1): 24-33, 2016.
68. Lan-Pidhainy X, Wolever TM. The hypoglycemic effect of fat and protein is not attenuated by insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 91(1): 98-105, 2010.
69. Muscelli E, Frascerra S, Casolaro A, Baldi S, Mari A, Gall W, et al. The amino acid response to a mixed meal in patients with type 2 diabetes: effect of sitagliptin treatment. *Diabetes Obes Metab* 16(11): 1140-7, 2014.
70. Shukla AP, Andono J, Touhamy SH, Casper A, Iliescu RG, Mauer E, et al. Carbohydrate-last meal pattern lowers postprandial glucose and insulin excursions in type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care* 5(1): e000440, 2017.
71. Nishino K, Sakurai M, Takeshita Y, Takamura T. Consuming Carbohydrates after Meat or Vegetables Lowers Postprandial Excursions of Glucose and Insulin in Nondiabetic Subjects. *Journal of nutritional science and vitaminology* 64(5): 316-20, 2018.
72. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews* 87(4): 1409-39, 2007.
73. Seino Y, Fukushima M, Yabe D. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *J Diabetes Investig* 1(1-2): 8-23, 2010.
74. Karamanlis A, Chaikomin R, Doran S, Bellon M, Bartholomeusz FD, Wishart JM, et al. Effects of protein on glycemic and incretin responses and gastric emptying after oral glucose in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 86(5): 1364-8, 2007.
75. Pupovac J, Anderson GH. Dietary peptides induce satiety via cholecystinin-A and peripheral opioid receptors in rats. *The Journal of nutrition* 132(9): 2775-80, 2002.
76. Shuster LT, Go VL, Rizza RA, O'Brien PC, Service FJ. Incretin effect due to increased secretion and decreased clearance of insulin in normal humans. *Diabetes* 37(2): 200-3, 1988.
77. Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AF. Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53(9): 2359-65, 2004.
78. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab* 17(6): 819-37, 2013.
79. King DG, Walker M, Campbell MD, Breen L, Stevenson EJ, West DJ. A small dose of whey protein co-ingested with mixed-macronutrient breakfast and lunch meals improves postprandial glycemia and suppresses appetite in men with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 107(4): 550-7, 2018.
80. Clifton PM, Keogh J. Metabolic effects of high-protein diets. *Curr Atheroscler Rep*. 9(6): 472-8, 2007.

81. Bendtsen LQ, Lorenzen JK, Bendtsen NT, Rasmussen C, Astrup A. Effect of dairy proteins on appetite, energy expenditure, body weight, and composition: a review of the evidence from controlled clinical trials. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md) 4(4): 418-38, 2013.
82. Porrini M, Crovetti R, Testolin G, Silva S. Evaluation of satiety sensations and food intake after different preloads. *Appetite* 25(1): 17-30, 1995.
83. Poppitt SD, McCormack D, Buffenstein R. Short-term effects of macronutrient preloads on appetite and energy intake in lean women. *Physiol Behav* 64(3): 279-85, 1998.
84. Latner JD, Schwartz M. The effects of a high-carbohydrate, high-protein or balanced lunch upon later food intake and hunger ratings. *Appetite* 33(1): 119-28, 1999.
85. Petersen BL, Ward LS, Bastian ED, Jenkins AL, Campbell J, Vuksan V. A whey protein supplement decreases post-prandial glycemia. *Nutr J* 8: 47, 2009.
86. Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *The British journal of nutrition* 89(2): 239-48, 2003.
87. Luhovyy BL, Akhavan T, Anderson GH. Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *J Am Coll Nutr* 26(6): 704S-12S, 2007.
88. Zafar TA, Waslien C, AlRaefaei A, Alrashidi N, AlMahmoud E. Whey protein sweetened beverages reduce glycemic and appetite responses and food intake in young females. *Nutr Res* 33(4): 303-10, 2013.
89. Bowen J, Noakes M, Clifton PM. Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake. *J Clin Endocrinol Metab* 91(8): 2913-9, 2006.
90. Liddle RA. Regulation of cholecystokinin secretion in humans. *J Gastroenterol* 35(3): 181-7, 2000.
91. Vincent RP, le Roux CW. The satiety hormone peptide YY as a regulator of appetite. *J Clin Pathol* 61(5): 548-52, 2008.
92. Teff KL. How neural mediation of anticipatory and compensatory insulin release helps us tolerate food. *Physiol Behav* 103(1): 44-50, 2011.
93. Chen MJ, Jovanovic A, Taylor R. Utilizing the second-meal effect in type 2 diabetes: practical use of a soya-yogurt snack. *Diabetes Care* 33(12): 2552-4, 2010.
94. Clifton PM, Galbraith C, Coles L. Effect of a low dose whey/guar preload on glycemic control in people with type 2 diabetes--a randomised controlled trial. *Nutr J* 13: 103, 2014.
95. Shukla AP, Dickison M, Coughlin N, Karan A, Mauer E, Truong W, et al. The impact of food order on postprandial glycaemic excursions in prediabetes. *Diabetes Obes Metab* 21(2): 377-81, 2019.
96. Crouch MA, Slater RT, 3rd. Almond "Appetizer" Effect on Glucose Tolerance Test (GTT) Results. *J Am Board Fam Med* 29(6): 759-66, 2016.
97. Faber EM, van Kampen PM, Clement-de Boers A, Houdijk E, van der Kaay DCM. The influence of food order on postprandial glucose levels in children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 19(4): 809-15, 2018.
98. Ma J, Jesudason DR, Stevens JE, Keogh JB, Jones KL, Clifton PM, et al. Sustained effects of a protein 'preload' on glycaemia and gastric emptying over 4 weeks in patients with type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract* 108(2): e31-4, 2015.
99. Ahn CH, Bae JH, Cho YM. Premeal Consumption of a Protein-Enriched, Dietary Fiber-Fortified Bar Decreases Total Energy Intake in Healthy Individuals. *Diabetes Metab J*, 2019.
100. Tey SL, Salleh N, Henry CJ, Forde CG. Effects of Consuming Preloads with Different Energy Density and Taste Quality on Energy Intake and Postprandial Blood Glucose. *Nutrients*. 10(2), 2018.
101. Abou-Samra R, Keersmaekers L, Brienza D, Mukherjee R, Mace K. Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter. *Nutr J* 10: 139, 2011.
102. Astbury NM, Stevenson EJ, Morris P, Taylor MA, Macdonald IA. Dose-response effect of a whey protein preload on within-day energy intake in lean subjects. *The British journal of nutrition* 104(12): 1858-67, 2010.

103. Giezenaar C, Trahair LG, Rigda R, Hutchison AT, Feinle-Bisset C, Luscombe-Marsh ND, et al. Lesser suppression of energy intake by orally ingested whey protein in healthy older men compared with young controls. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309(8): R845-54, 2015.
104. Trico D, Filice E, Trifiro S, Natali A. Manipulating the sequence of food ingestion improves glycemic control in type 2 diabetic patients under free-living conditions. *Nutr Diabetes* 6(8): e226, 2016.