



**STUDIO OSSERVAZIONALE DELLA
DURATA DI 1 ANNO SU 377 PAZIENTI
CHE HANNO SEGUITO IL METODO
LIGNAFORM:**

**UN REGIME ALIMENTARE IN 7 FASI, SOTTO
CONTROLLO MEDICO, A SCARICO DI
CARBOIDRATI E GRASSI**

**Middle and Long-Term Impact of a Very Low-Carbohydrate Ketogenic Diet
on Cardiometabolic Factors: A Multi-Center, Cross-Sectional, Clinical Study**

Arrigo F. G. Cicero, Maddalena Benelli, Marco Brancaleoni, Giuseppe Dainelli,
Desiré Merlini, Raffaele Negri

High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention; December 2015, Volume 22, Issue 4, pp 389–394

Introduzione

Il sovrappeso e l'obesità sono due dei problemi più comuni tra quelli correlati al moderno stile di vita e sono in costante aumento soprattutto nei Paesi Occidentali. Queste condizioni patologiche sono considerate due dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di numerose patologie croniche quali: malattie cardiovascolari e respiratorie, diabete di tipo 2, alcune forme di tumore, come anche il rischio di morte precoce...

L'obesità è una patologia multifattoriale, le cui cause possono ricercarsi in: predisposizione genetica, fattori ambientali e comportamentali, gravidanze multiple, disbiosi intestinale... L'alimentazione, i fattori comportamentali e l'attività fisica sono modificabili e sono gli unici fattori sui quali possiamo intervenire.

Al giorno d'oggi abbondano le diete "miracolose" e "fai da te" che limitano eccessivamente le calorie o escludono determinati gruppi di alimenti, anche importanti, e non possono essere seguite per lunghi periodi. Inoltre la maggior parte di queste diete non racchiude in sé il concetto di educazione alimentare e possono facilmente provocare il cosiddetto "effetto yo-yo" (aumento e calo di peso ciclico dovuto all'alternarsi di periodi di alimentazione controllata ed incontrollata) oltre che causare disturbi e carenze nell'organismo.

Arrigo F.G. Cicero

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche,
Alma Mater Studiorum Università di Bologna

Obiettivo

Il **metodo Lignaform**, un concetto globale del controllo del sovrappeso e dell'obesità, è un protocollo di educazione alimentare e fisica che ha l'obiettivo di:

- A) ridurre il peso corporeo tramite il calo della massa grassa,
- B) garantire un percorso educazionale che pone l'accento non solo sul dimagrimento ma soprattutto sul raggiungimento dei corretti stili di vita, per poter mantenere i risultati ottenuti a lungo.

Il metodo Lignaform si basa su **3 tappe fondamentali**:

- 1) una tappa di dimagrimento composta dalla fase 1 (attiva) e dalla fase 2 (selettiva), in cui l'alimentazione è essenzialmente normoproteica a basso contenuto di carboidrati (< 50gr/die) e grassi. Le proteine apportate sono di altissimo valore biologico e di origine naturale (uova, latte, soia e piselli), sotto forma di preparati in polvere e prodotti pronti per l'uso.
- 2) una tappa di reintroduzione glucidica e dell'attività fisica, suddivisa in 4 fasi, in cui vengono reintrodotti progressivamente gli alimenti in base al loro indice glicemico: questa tappa è essenziale per mantenere i risultati nel tempo educando il paziente ad un nuovo rapporto con l'alimentazione, gli alimenti e l'attività fisica, senza così dover ricorrere ad ulteriori diete;
- 3) una tappa di accompagnamento verso l'autonomia e l'equilibrio alimentare, la fase 7.

In questo studio osservazionale sono stati valutati una serie di parametri clinico-anamnestici e di laboratorio alla **prima visita (T0)**, dopo **un mese (T1)**, dopo **tre mesi (T2)** e dopo **un anno (T3)**.

La raccolta dei dati ottenuti è stata utilizzata per valutare: **l'efficacia, la sicurezza, la qualità di vita** durante e dopo il metodo Lignaform, il ruolo del metodo applicato alla **prevenzione delle malattie cardiovascolari** e il **mantenimento dei risultati** a breve e lungo termine.

Metodi

Sono stati selezionati **377 pazienti**, di cui **80 uomini e 297 donne** con età compresa tra 30 e 69 anni, con **BMI** compreso tra **27,0 e 37,0 e circonferenza addominale ≥ a 98 cm negli uomini e ≥ a 86 cm nelle donne**. Sono stati esclusi tutti i pazienti che presentavano insufficienza renale (creatinina >1,5 mg/dl), depressione maggiore, psicosi e disturbi del comportamento alimentare, insufficienza epatica grave, diabete mellito insulino trattato, pazienti in terapia anticoagulante orale, pazienti in trattamento con chemioterapici e antitumorali, donne in gravidanza e allattamento. Gli esami di laboratorio previsti alla prima visita e a 30-90-365 giorni dall'inizio della dieta sono riportati nel grafico in basso.

I parametri clinico-anamnestici misurati nelle 4 visite sono: peso, altezza, circonferenza addominale, pressione arteriosa sistolica e diastolica.

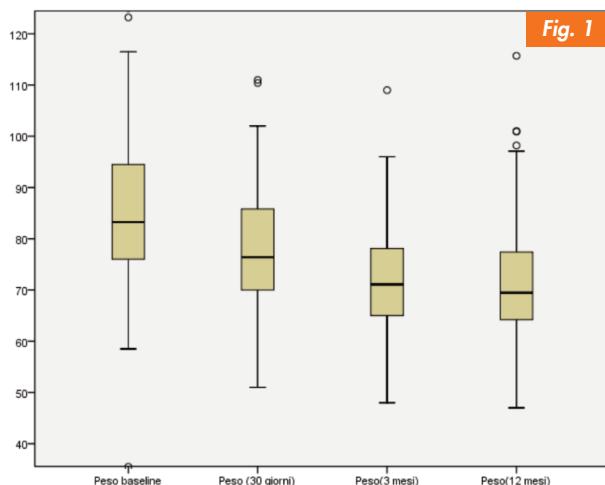
Dei 377 pazienti selezionati, 311 si sono presentati alla visita a 30 giorni (T1), 236 si sono presentati alla visita a 90 giorni (T2) e 192 si sono presentati al controllo a un anno (T3). Le ragioni dei drop out sono da ricercarsi in: mancata compliance al programma (13.87%), patologie e traumi intercorrenti (2.89%), problemi familiari (8.67%), intolleranza ai preparati (2.89 %), altro (15.60%) e pazienti che non si sono presentati nelle visite di controllo (57.06%).

1 VISITA	30 GIORNI	3 MESI	12 MESI
Peso in kg	Peso in kg	Peso in kg	Peso in kg
Altezza	Altezza	Altezza	Altezza
BMI	BMI	BMI	BMI
Circonferenza addominale	Circonferenza addominale	Circonferenza addominale	Circonferenza addominale
PA Sistolica	PA Sistolica	PA Sistolica	PA Sistolica
PA Diastolica	PA Diastolica	PA Diastolica	PA Diastolica
Colesterolto totale mg/dl		Colesterolto totale mg/dl	Colesterolto totale mg/dl
HDL mg/dl		HDL mg/dl	HDL mg/dl
LDL		LDL	LDL
Trigliceridi mg/dl		Trigliceridi mg/dl	Trigliceridi mg/dl
Glicemia mg/dl	Glicemia mg/dl	Glicemia mg/dl	Glicemia mg/dl
Emoglobina glicata in %		Emoglobina glicata in %	Emoglobina glicata in %
Microalbuminuria mg/l		Microalbuminuria mg/l	Microalbuminuria mg/l
AST U/litro	AST U/litro	AST U/litro	AST U/litro
ALT U/litro	ALT U/litro	ALT U/litro	ALT U/litro
gamma GT U/litro	gamma GT U/litro	gamma GT U/litro	gamma GT U/litro
Creatinina mg/dl	Creatinina mg/dl	Creatinina mg/dl	Creatinina mg/dl
Uricemia mg/dl	Uricemia mg/dl	Uricemia mg/dl	Uricemia mg/dl
Emocromo	Emocromo	Emocromo	Emocromo
PH urine	PH urine	PH urine	PH urine
Chetonuria	Chetonuria	Chetonuria	Chetonuria
Proteinuria	Proteinuria	Proteinuria	Proteinuria
Glicosuria	Glicosuria	Glicosuria	Glicosuria
TSH uUI/ml		TSH uUI/ml	TSH uUI/ml
Potassio mEq/litro	Potassio mEq/litro	Potassio mEq/litro	Potassio mEq/litro
Sodio mEq/litro	Sodio mEq/litro	Sodio mEq/litro	Sodio mEq/litro
Magnesio mg/dl		Magnesio mg/dl	Magnesio mg/dl
Calcio mg/dl	Calcio mg/dl	Calcio mg/dl	Calcio mg/dl

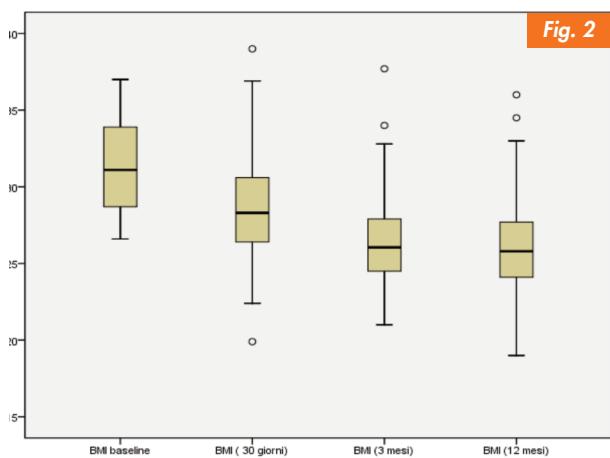
Risultati

● Evoluzione del peso, del BMI, della circonferenza addominale

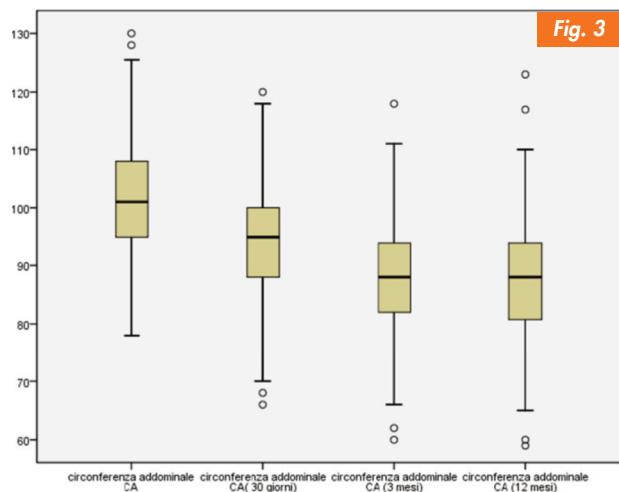
La prima analisi dei dati eseguita è stata la valutazione dell'**andamento del peso** a 30-90-365 giorni: quello che si è osservato è stato un calo significativo con una perdita media di 7 ± 5 kg dopo 1 mese più altri 5 ± 3 kg nei successivi due mesi, e di circa 14 ± 10 kg in un anno. FIGURA 1



Per quanto riguarda il **BMI** può essere fatto un discorso analogo al precedente, in quanto il BMI segue lo stesso trend del peso corporeo con una riduzione di 3 ± 2 unità nel primo mese più ulteriori 2 ± 2 unità nei due mesi successivi, e di circa 5 ± 3 unità in un anno. Si assiste poi ad un rallentamento del calo ponderale, con stabilizzazione sia del peso che del BMI dal terzo trimestre fino all'anno di trattamento. FIGURA 2

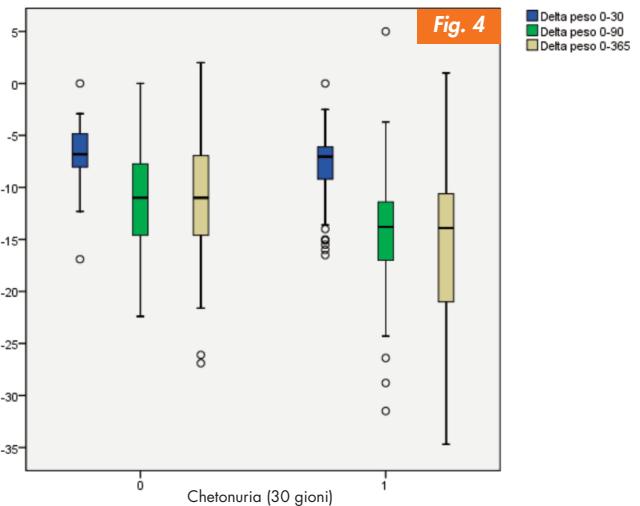


La **circonferenza addominale** ha lo stesso trend del peso corporeo. Cala di circa 7 ± 4 cm nel primo mese, di ulteriori 5 ± 7 cm il terzo mese e di circa 13 ± 7 cm in un anno di trattamento. FIGURA 3



I risultati ottenuti possono essere spiegati grazie al tipo di alimentazione seguita con il metodo Lignaform. Nella prima fase si ha un'alimentazione normoproteica a scarico di carboidrati appositamente studiata per creare una chetogenesi. Questo tipo di chetogenesi viene considerata fisiologica [1] e porta l'organismo a consumare inizialmente i depositi di riserva (glicogeno) e successivamente a produrre energia utilizzando i depositi di grasso: in questo modo si ha una riduzione del peso corporeo e del BMI senza andare a intaccare la massa muscolare [2]. Questo processo di lipolisi dà origine ai corpi chetonici, che hanno un effetto taglia fame stimolando il centro della sazietà a livello ipotalamico [3], un effetto positivo sull'umore [4] e fungono da carburante ("super fuel") per muscoli, cuore e cervello [5].

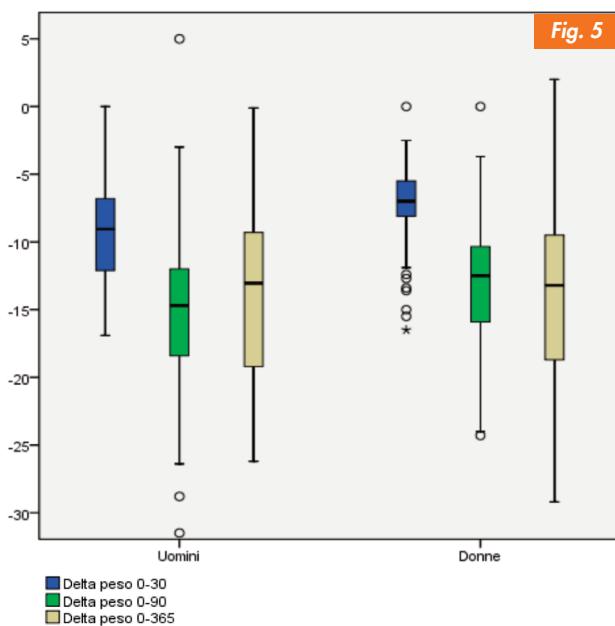
I corpi chetonici in eccesso vengono eliminati con le urine determinando chetonuria. Il dato di fatto è che i pazienti che hanno avuto una chetonuria hanno conseguito una migliore e significativa risposta in termini di calo ponderale sia a breve che a lungo termine rispetto a quelli che non l'hanno avuta, testimoniando l'utilizzo della massa grassa. FIGURA 4



Bisogna considerare quindi che lo sviluppo di un metabolismo chetogenetico, in pazienti non diabetici insulino-dipendenti, può assicurare un calo ponderale significativo in tempi relativamente brevi e, soprattutto, può conseguire risultati positivi a lungo temine (12 mesi) se il metodo Lignaform viene eseguito nella sua interezza.

Le proteine contenute nei preparati sono ad elevato valore biologico, quindi facilmente assorbibili e utilizzabili dall'organismo per sintetizzare glucosio e per produrre ossalato indispensabile per far entrare l'Acetyl-CoA fornito dai corpi chetonici nel ciclo di Krebs [6]. Tutto ciò permette quindi di proteggere la massa muscolare mantenendo una maggior tonicità dei tessuti ed elasticità della pelle [7].

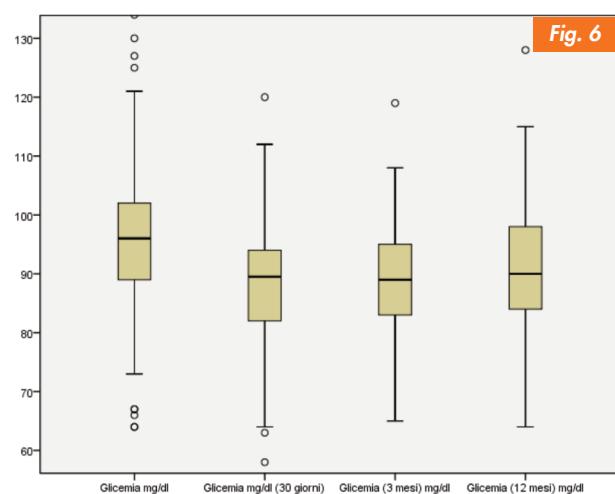
Confrontando i dati ottenuti negli uomini con quelli ottenuti nelle donne possiamo affermare che si assiste complessivamente a un calo ponderale simile sia negli uomini che nelle donne, anche se nella prima fase la riduzione del peso è maggiore negli uomini: gli uomini sembrano rispondere meglio delle donne sia a 30 che a 90 giorni, mentre la differenza si annulla a 365 giorni. FIGURA 5



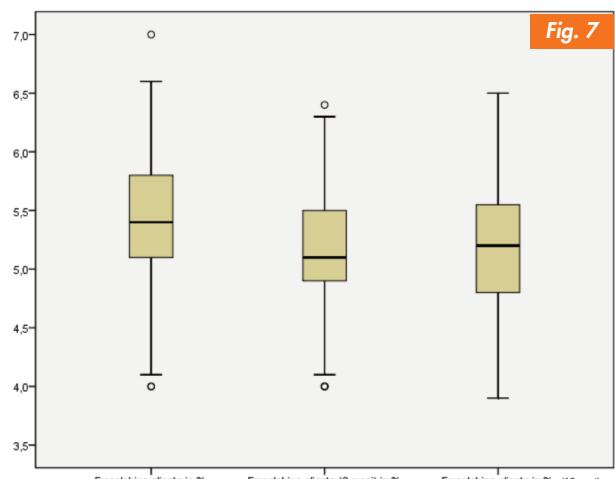
La spiegazione della differenza di calo di peso nella prima fase può essere attribuita al fatto che gli uomini tendono ad avere una massa muscolare maggiore rispetto alle donne. Il tessuto muscolare brucia molte calorie e consuma energia, favorendo così la riduzione del peso per diminuzione della massa grassa. A sostegno di questo, è noto che con l'età si ha una riduzione della massa muscolare, il metabolismo basale è ridotto e viene eseguita meno attività fisica: tutti questi fattori contribuiscono a spiegare anche perché in un paziente anziano è più difficile perdere peso.

Regolazione della glicemia

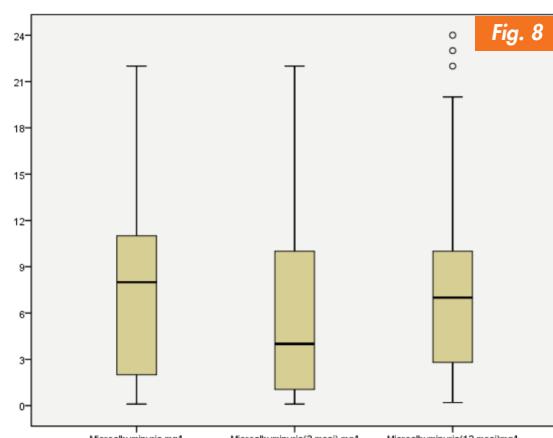
La **glicemia** migliora di 8.7 ± 15.3 mg/dL nei primi 30 giorni e si mantiene costante per tutto il primo anno di dieta. FIGURA 6



Ugualmente l'**emoglobina glicata** cala significativamente nel corso dei primi mesi ($0.26 \pm 0.74\%$) per poi mantenersi costante durante l'anno. FIGURA 7



La **microalbuminuria** si riduce significativamente nel primo mese di dieta ($2,3 \pm 8,1$ mg/dL) per poi riaumentare nella fase successiva al livello basale. FIGURA 8



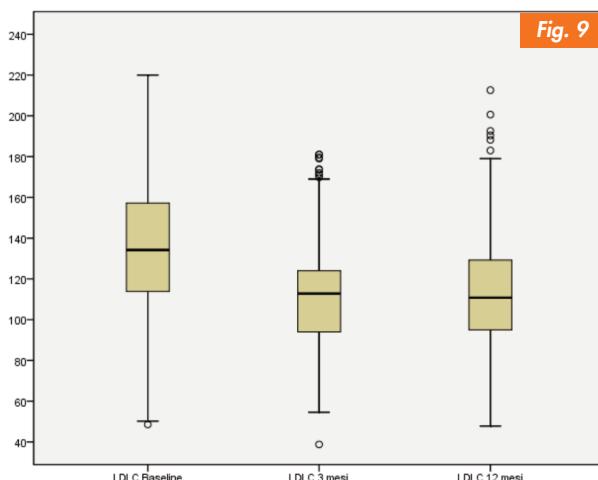
La riduzione dei livelli circolanti di glucosio e il miglioramento del controllo glicemico sono dovuti a diversi fattori:

- inizialmente il metodo Lignaform, come già spiegato precedentemente, è a scarico di carboidrati: questo comporta un minor introito di glucosio e un miglioramento dell'insulino-resistenza;
- in secondo luogo, i livelli di corpi chetonici che si formano durante la chetogenesi sono inversamente correlati ai livelli di glucosio prodotti dal fegato^[8], determinando così un ulteriore miglioramento del controllo glicemico.

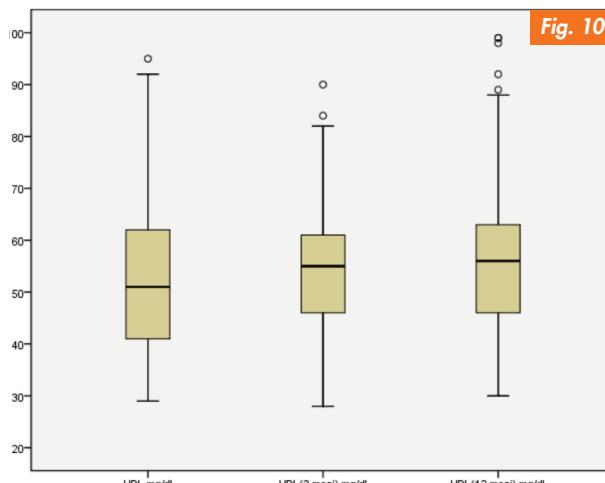
● Riduzione dei fattori di rischio cardiovascolare

COLESTEROLO

Il **colesterolo LDL** cala significativamente nel corso dei primi mesi (19 ± 31 mg/dl) per poi mantenersi costante durante l'anno. FIGURA 9

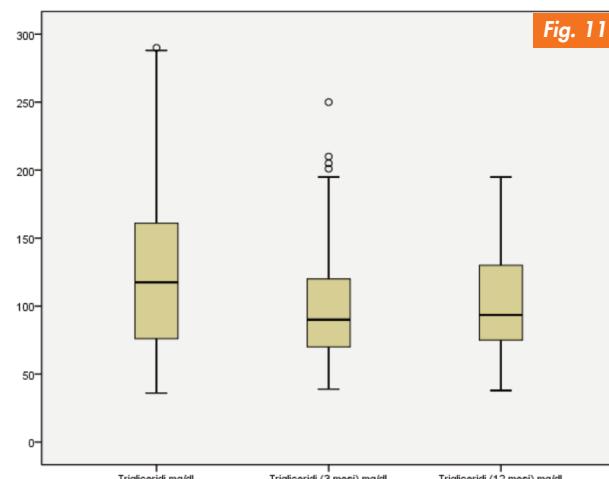


Il **colesterolo HDL** aumenta significativamente dal terzo al dodicesimo mese, ottenendo il massimo aumento a un anno (3.5 ± 13.1 mg/dl). FIGURA 10



TRIGLICERIDI

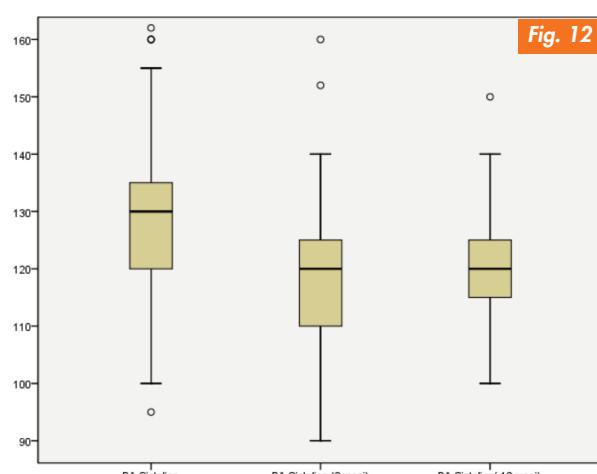
La **trigliceridemia** cala significativamente nel corso dei primi mesi (23 ± 61 mg/dl) per poi mantenersi costante durante l'anno. FIGURA 11



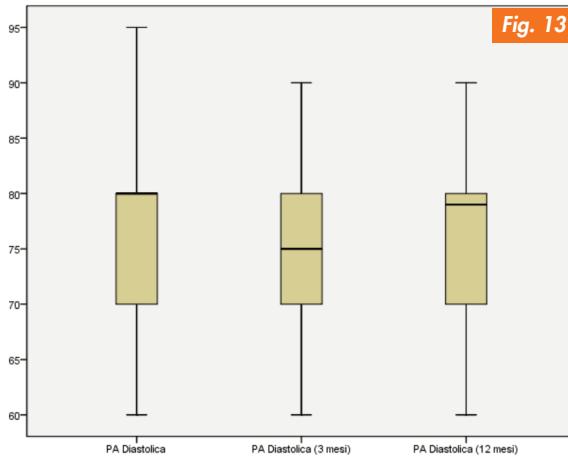
I risultati ottenuti sono confermati ampiamente in letteratura: molti studi dimostrano come diete a scarico di carboidrati, che favoriscono lo sviluppo di corpi chetonici, riducono i livelli di trigliceridi, colesterolo totale, colesterolo LDL e favoriscono un aumento di HDL^[9]. La riduzione di peso può spiegare in parte l'aumento dei livelli di Hdl-c e la riduzione di trigliceridi: infatti, come descritto nella metanalisi di Dattilo and Kris-Etherton, per ogni Kg perso si ha aumento di Hdl-c di 0,009 mmol/L e una riduzione di TG di 0,015 mmol/L^[10]. Inoltre, la riduzione della stimolazione insulinica che si ottiene porta a una ridotta stimolazione della 3-idrossi-metil-glutaril-CoA reduttasi (enzima chiave nella sintesi di colesterolo) con conseguente riduzione della sintesi di colesterolo endogeno^[11].

PRESSIONE ARTERIOSA

Un'ulteriore analisi è stata eseguita sul controllo della pressione. In generale, la **pressione sistolica** cala significativamente nel corso dei primi 3 mesi (10 ± 12 mmHg) per poi mantenersi costante durante l'anno. FIGURA 12



La **pressione diastolica** cala significativamente nel corso dei primi mesi (2 ± 6 mmHg) per poi mantenersi costante durante l'anno. FIGURA 13



In letteratura esistono numerose metanalisi sulla relazione peso/pressione che confermano il dato da noi ottenuto e mostrano inoltre una riduzione dell'utilizzo di farmaci antipertensivi in pazienti ipertesi in seguito ad una perdita di peso [13].

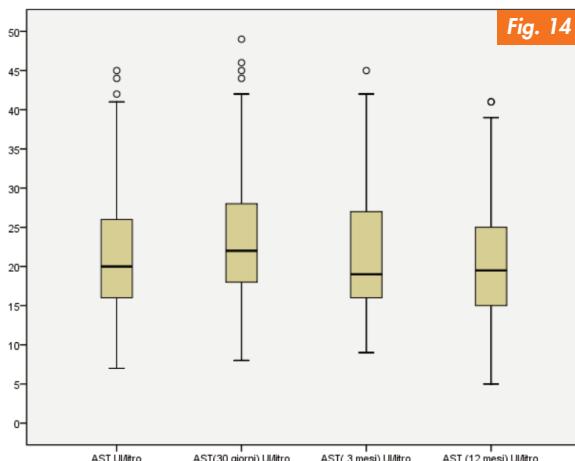
I meccanismi biologici che possono spiegare la riduzione della pressione arteriosa parallela alla perdita di peso sono diversi: riduzione dell'insulino-resistenza, riduzione dell'attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone e dell'attività del sistema simpatico, aumento dei peptidi natriuretici [12] [14]. Anche l'attività fisica eseguita dai pazienti, oltre ad essere fondamentale nella perdita del peso, ha un ruolo rilevante nel miglioramento dei parametri della pressione arteriosa [15].

Regolazione dei fattori metabolici epatico-renali

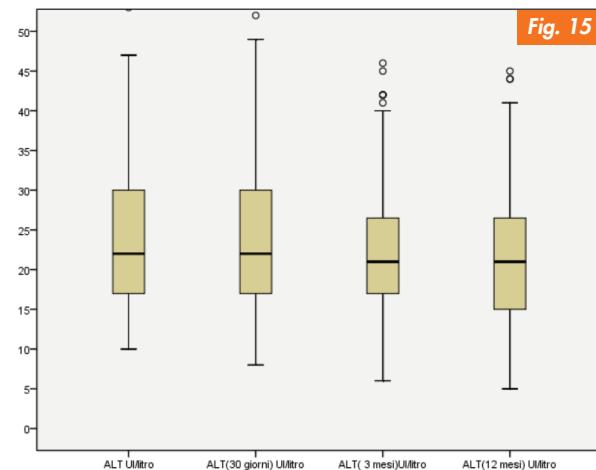
Si sono osservati anche miglioramenti dei parametri di funzionalità epatica e renale. Nello specifico sono stati presi in considerazione, a livello di laboratorio, i seguenti parametri: transaminasi (ALT, AST, GAMMA GT), creatinina, uricemia.

La **AST** si riduce in modo lievissimo ma significativo col proseguire della dieta fino ad 1 anno.

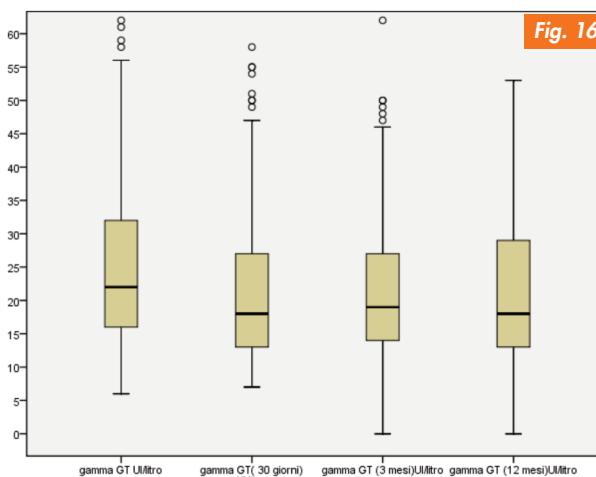
FIGURA 14



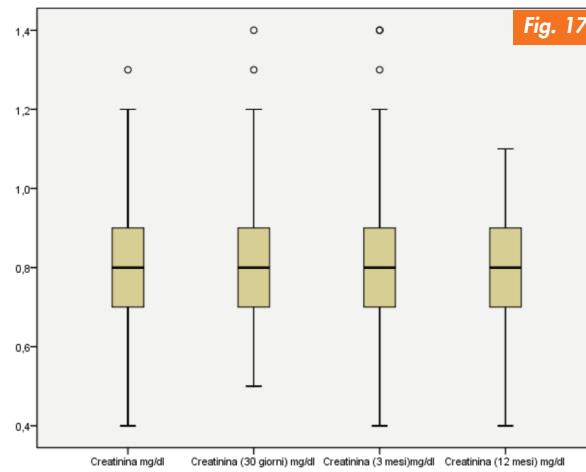
La **ALT** si riduce significativamente fra il primo ed il terzo mese di dieta e resta ridotta fino alla fine dell'anno di dieta ($3,8\pm12,4$ U/l). FIGURA 15



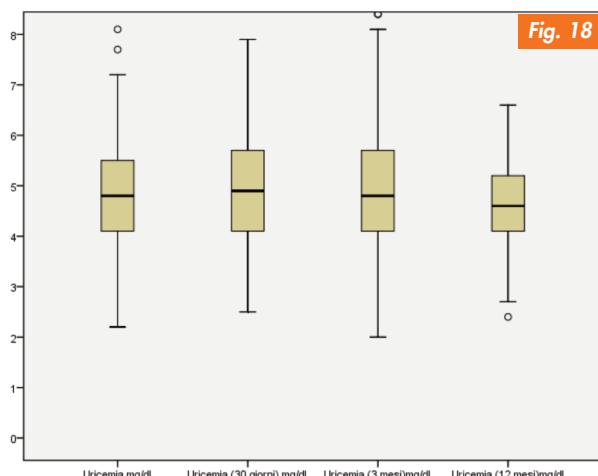
La **gamma-GT** si riduce significativamente nel corso del primo mese (4 ± 11 U/l) e non si modifica nel corso dell'anno di trattamento. FIGURA 16



La **creatininemia** non si è modificata nel corso dello studio, salvo una lieve ma significativa riduzione fra il terzo ed il dodicesimo mese, riduzione che, però, non si è mantenuta rispetto al basale. FIGURA 17



L'uricemia tende a ridursi solo dopo il terzo mese (0.4 ± 2.9 mg/dL) e tende a mantenersi ridotta fino a fine osservazione. **FIGURA 18**



Conclusione

Valutazione della sicurezza

Intendiamo con il termine "sicurezza" per l'individuo la valutazione dei parametri metabolico-laboratoristici. Il metodo è in grado di ottenere risultati sulla perdita di peso e sui fattori di rischio cardiovascolare senza alterare i parametri metabolico-laboratoristici e lo stato di salute del paziente.

Valutazione dell'efficacia

Il risultato che si vuole ottenere da un protocollo di gestione del sovrappeso e dell'obesità è la perdita di peso. I dati ottenuti dallo studio osservazionale dimostrano appunto il calo del peso e della circonferenza addominale. Un altro parametro fondamentale da prendere in considerazione è il mantenimento del peso perso: i dati dimostrano come il peso rimanga stabile dopo 1 anno di trattamento.

Valutazione degli effetti metabolici

Durante lo studio osservazionale si assiste ad un miglioramento di alcuni parametri metabolici e dei fattori di rischio cardiovascolare, in particolare: riduzione del colesterolo totale, riduzione dei trigliceridi, riduzione delle LDL, non variazione delle HDL, riduzione della glicemia; si assiste ugualmente alla riduzione dei valori pressori sisto-diastolici. Si ottiene un miglioramento anche della funzionalità epatica.

Valutazione della qualità di vita

Ai pazienti che hanno partecipato allo studio è stato richiesto a ogni visita di dare un punteggio da 1 (assenza di sintomi) a 5 (massimo dei sintomi del disturbo) per i seguenti parametri riguardanti la qualità di vita: affaticamento, mancanza di concentrazione, difficoltà di respiro, disturbi del sonno, disturbi dell'umore e dolori articolari. Dai risultati si evince che tutti i parametri migliorano significativamente con la prosecuzione del metodo.

Questo studio osservazionale dimostra che il **metodo Lignaform**, eseguito sotto controllo medico, è un approccio dietetico - nutrizionale efficace a breve e a medio termine, senza effetti secondari; si ottiene infatti un miglioramento dei fattori di rischio cardiovascolare e, principalmente, della pressione arteriosa, e di alcuni parametri metabolici. Il **metodo Lignaform** è quindi un metodo interessante per la gestione dei pazienti in sovrappeso e obesi, che presentano le relative complicanze, e che hanno avuto insuccessi nelle diete precedenti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) *The regulation of the release of ketonebodies by the liver.* Adv. Enzym. Regul. 1966; *the truth about ketones and ketosis.*
- 2) Cahill GF Jr, Veech RL. *Ketoacids? Good medicine?* Trans Am Clin Climatol Assoc. 2003; 114:149-61; discussion 162-3.
- 3) Fukao T1, Lopaschuk GD, Mitchell GA. *Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2004 Mar;70(3):243-51.
- 4) Ballestri M1, Casoli T, Di Stefano G, Giorgetti B, Aicardi G, Fattoretti P. *Ketogenic diets: an historical antiepileptic therapy with promising potentialities for the aging brain.* Ageing Res Rev. 2010 Jul;9(3):273-9.
- 5) Veech RL. *The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2004 Mar;70(3):309-19.
- 6) *I principi di biochimica di Lehninger di David L. Nelson, Michael M. Cox.* 2010
- 7) Grunenberger F., Schilienger J.L. *Effets métaboliques et hormonaux des régimes à très basses calories. Différences entre régimes hyper- et hypo-protidiques.* Rev. Franç. Endocrinol. Clin., 37, 1996
- 8) Bistrian BR, Blackburn GL, Flatt JP, Sizer J, Scrimshaw NS, Sherman M. *Nitrogen metabolism and insulin requirements in obese diabetic adults on a proteinsparing modified fast.* Diabetes 1976; 25: 494-504.
- 9) Sharman MJ, Kraemer WJ, Love DM, Avery NG, Gomez AL, Scheett TP et al. *A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men.* J Nutr 2002; 132: 1879-1885.
- 10) Dattilo, A. M. & Kris-Etherton PM. *Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis.* Am J Clin Nutr. 1992 Aug;56(2):320-8.
- 11) Volek JS, Phinney SD, Forsythe CE, Quann EE, Wood RJ, Puglisi MJ et al. *Carbohydrate restriction has a more favorable impact on the metabolic syndrome than a low fat diet.* Lipids 2009; 44: 297-309.
- 12) Rocchini AP. *Obesity and Blood Pressure Regulation.* Handbook of Obesity: Etiology and Pathophysiology. Bray G and Bouchard C (eds), New York: Marcel Dekker, II ed, 2004 pp 873-889
- 13) Neter JE, Stam BE, Kok FJ, Grobbee DE, Gelseijns JM. *Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials.* Hypertension. 2003; 42: 878-884.
- 14) Staessen J, Fagard R, Amery A. *The relationship between body weight and blood pressure.* J Hum Hypertens. 1988; 2: 207-217.
- 15) Hagberg JM1, Park JJ, Brown MD. *The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update.* Sports Med. 2000 Sep;30(3):193-206.

ORIGINAL ARTICLE

Middle and Long-Term Impact of a Very Low-Carbohydrate Ketogenic Diet on Cardiometabolic Factors: A Multi-Center, Cross-Sectional, Clinical Study

Arrigo F. G. Cicero¹ · Maddalena Benelli² · Marco Brancaleoni³ · Giuseppe Dainelli³ · Desiré Merlini³ · Raffaele Negri³

Received: 26 February 2015 / Accepted: 22 April 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract

Introduction Obesity is a constantly growing illness in developed countries and it is strictly related to cardiovascular (CV) diseases, i.e. the main cause of mortality throughout industrialised areas.

Aim to test the ability of trained general physician to safely and effectively prescribe a very-low carbohydrate ketogenic (VLCK) diet in clinical practice, with a specific attention to the effect of this approach on overweight related CV risk factors (anthropometric measures) blood pressure, lipid levels, glucose metabolism).

Methods The study has been carried out on a group of 377 patients scattered across Italy and monitored during 1 year. The proposed VLCK diet is a nutritional regimen characterized by low-fat and low-carbohydrates formulations and a protein content of 1.2/1.5 g/kg of ideal body weight, followed by a period of slow re-insertion and alimentary re-education.

Results All the predetermined goals—namely safety, reduction of body weight and CV risk factors levels—have been reached with a significant reduction of body weight (from baseline to 4 weeks (-7 ± 4 cm, $p < 0.001$), from 4 to 12 weeks (-5 ± 3 kg, $p < 0.001$), no changes from

12 weeks to 12 months; waistline (from baseline to 4 weeks (-7 ± 4 cm, $p < 0.001$), from 4 to 12 weeks (-5 ± 7 cm, $p < 0.001$), no changes from 12 weeks to 12 months; fatty mass (from baseline to 4 weeks (-3.8 ± 3.8 %, $p < 0.001$), from 4 to 12 weeks (-3.4 ± 3.5 %, $p < 0.001$), no changes from 12 weeks to 12 months; SBP from baseline to 3 months (-10.5 ± 6.4 mmHg, $p < 0.001$), no further changes after 1 year of observation).

Conclusion the tested VLCD diet suggested by trained general physicians in the setting of clinical practice seems to be able to significantly improve on the middle-term a number of anthropometric, haemodynamic and laboratory with an overall good tolerability.

Keywords Ketogenic diet · General practice · Safety · Cardiovascular risk factors

1 Introduction

Overweight and obesity are pandemic conditions [1] associated to increased risk for type 2 diabetes, cardiovascular disease, cancer and all cause-mortality [2, 3], and a dramatic increase in public health expense to their management [4, 5]. Mediterranean diet seems to be a model to preserve a good health, especially when followed for the life-span. However, the large amount of carbohydrate included in the modern Mediterranean diet could be not adequately metabolized in strongly sedentary people and favor body weight increase [6]. Several randomized clinical trials carried out in specialized medical setting have clearly shown that a short-term ketogenic diet could be useful to obtain a quick and relatively safe weight loss in selected patients [7, 8]. Moreover, the efficacy on body weight loss seems to be associated to a large number of

Lignaform Study Group: M. Benelli, M. Brancaleoni, G. Dainelli, D. Merlini, R. Negri.

✉ Arrigo F. G. Cicero
afgcicero@cardionet.it; arrigo.cicero@unibo.it

¹ Medical and Surgical Sciences Department, Sant'Orsola-Malpighi University Hospital, University of Bologna, U.O. Medicina Interna Borghi-Via Albertoni, 15, Bologna, Italy

² Santa Chiara Foundation, Lodi, Italy

³ National Public Health System, Rome, Italy

positive metabolic changes, potentially useful to mitigate the features of the metabolic syndrome and contrasting the development of type 2 diabetes [9, 10]. In particular, a recent meta-analysis of randomized clinical trials, showed that ketogenic diets induce a long-term more significant improvement in body weight, diastolic blood pressure, triglycerides and HDL-cholesterol, when compared to low fat diets [11]. However, there are no many studies testing if this approach could be useful, feasible and safe also in a setting of general medicine [12]. This scientific question is of primary relevance, given the large prevalence of obesity in general population, that could not be managed in a hospital setting.

In this context, the aim of our study was to evaluate the efficacy and tolerability of a ketogenic diet suggested and monitored in the setting of general practice, in term of long and mid-term weight loss and modification of the main cardiovascular (CV) disease risk factors.

2 Methods

General practitioners, well acquainted with VLCK diets methods selected by a senior physician already expert in the tested method, after a further specific training, have carried out this observational study.

The selected patients met the following inclusion requirements: they are aged between 30–69 years, have a BMI between 27–37 kg/m² and an abdominal circumference of 98 cm or more for men and 87 cm or more for women.

The exclusion from this study occurred in case of renal impairment (i.e. creatinine greater or equal to than 1.5 mg/dL), major depressive with eating disorders, serious hepatic impairment, insulin-dependent type 1 diabetes, oral anti-coagulant treatment. Furthermore, patients with an ongoing anti-cancer treatment as well as pregnant or breast-feeding women were not taken into account.

The 21.1 % of the subjects was affected by arterial hypertension, the 10 % by impaired fasting glucose; the 6.4 % by type 2 diabetes, the 3.2 % was in secondary prevention for cardiovascular diseases. The 12.2 % had pharmacologically compensated hypothyroidism.

After to have signed a specific informed consent form, eligible patients, at time zero, were subjected to a general medical examination and an evaluation of anthropometric and bio-humoral parameters.

Thirty-seven general practitioners identified, in three months' time, 377 eligible patients (M 21.2 %, W 78.8 %). Among them, 311 were selected, as they were the only participants to the first monitoring visit at 30 days. Sixty-six patients dropped-out for different reasons, but none of which of a clinical matter.

The next monitoring visits were planned first after 3 months and then after 12 months.

The enrolled patients have been subjected to VLCK diet (as implemented by Lignaform), a nutritional regimen is a VLCK diet, based on the use of high biological level protein formulation of milk/egg/legumes origin (peas and NO OGM soybeans), with a content of 15–18 g in proteins, 2–6 g in carbohydrates, 3 g in fats for a caloric intake of 100 kcal. Additionally, vegetables were allowed. The preparations were personally bought by patients.

Our method is articulated in different stages: in the first step we provide a protein intake of 1.2–1.5 g/kg of ideal body weight [13], in association with low-glycemic index vegetables. Thus, it is a normal-protein regime compared to the ideal weight, but hyper-protein diet in relation to the others nutrients consumed.

Afterwards, the formulations are replaced by natural protein foods and the diet is gradually completed with other aliments on the base of glycemic index following a multiphasic scheme.

Firstly, patients were exclusively treated with formulations and vegetables (stage 1). Then, only one formulation was replaced by a protein aliment (meat, fish, eggs) and vegetables (stage 2). Immediately after, another formulation was substituted with another protein food (conclusion of stage 2). Eventually, patients inserted, in sequential, fruit, dairy products, cereals and legumes (stages 3–4–5–6). The duration of each stage is proportional to weight loss during the ketogenic periods. The last stage (stage 7) consisted in a re-education to the Mediterranean diet based on patient's expenditure of energy.

However, from the very beginning an integration of calcium, magnesium, potassium, omega 3 fatty acids (500 mg) and olive oil is necessary.

The following variables have been measured with standardized methods or calculated at the baseline, at the monitoring visit at 30 days, then after 3 and 12 months: height, weight, body mass index (BMI), waist circumference (WC), index of central obesity (ICO = ratio of waist circumference and height), impedentiometrically estimated fat mass, systolic (SBP), diastolic (DBP) and pulse pressure (PP), thyroid stimulating hormone (TSH), fasting plasma glucose (FPG), glycated haemoglobin (HbA1c), total cholesterol (TC), LDL cholesterol (LDL-C), HDL cholesterol (HDL-C), triglycerides, liver transaminases, gamma-glutamyl transferase (gGT), creatinine, estimated glomerular filtration rate (eGFR, CKD-EPI formula), microalbuminuria, uric acid (SUA), serum potassium, sodium, magnesium and calcium.

A complete descriptive analysis was carried out for continuous and categorical parameters. Categorical parameters were compared by the chi-square test followed by the Fisher exact test. Normally distributed parameters were

compared with ANOVA for paired and unpaired samples, followed by the Student t-test, while not-normally distributed parameters with Kruskal–Wallys analysis of variance followed by Mann–Whitney U test. The predictor of a more significant weight loss were identified by the application of a logistic regression test. A significance level of 0.05 has been chosen for all tests. All the analyses were carried out with the help of SPSS 21.0, version for Windows.

3 Results

The main characteristics of the enrolled patients are resumed in Table 1. Throughout the study, 82.5 % of the patients involved in the study, completed the first 4 week period, 71.1 % the first 12-week period, 52 % continued the protocol until 12 months.

All the measured anthropometric variables exhibited a similar trend.

Body weight significantly improved from baseline to 4 weeks (-7 ± 5 kg, $p < 0.001$), from 4 to 12 weeks (-5 ± 3 kg, $p < 0.001$), while no changes were observed from 12 weeks to 12 months (-1 ± 2 kg, $p = 0.06$). Therefore, after 1 year the subjects experienced a mean total body weight loss of 14 ± 10 kg.

The BMI significantly improved from baseline to 4 weeks (-3 ± 2 kg/m², $p < 0.001$), from 4 to 12 weeks (-2 ± 2 kg/m², $p < 0.001$), while no changes were observed from 12 weeks to 12 months (-0.2 ± 0.9 kg/m², $p = 0.08$). Therefore, after 1 year the subjects experienced a mean total body weight loss of 5 ± 3 kg/m².

The WC significantly improved from baseline to 4 weeks (-7 ± 4 cm, $p < 0.001$), from 4 to 12 weeks (-5 ± 7 cm, $p < 0.001$), while no significant changes were observed from 12 weeks to 12 months (-0.2 ± 1.1 cm, $p = 0.68$), so after 1 year the subjects experienced a mean total body weight loss of 13 ± 7 cm.

The ICO improved from baseline to 4 weeks (-0.04 ± 0.02 , $p < 0.001$), from 4 to 12 weeks (-0.03 ± 0.04 , $p < 0.001$), while no significant changes were observed from 12 weeks to 12 months (-0.01 ± 0.04 , $p = 0.64$). Therefore after 1 year the subjects experienced a mean total body weight loss of 0.8 ± 0.4 .

The estimated percentage of body fat significantly improved from baseline to 4 weeks (-3.8 ± 3.8 %, $p < 0.001$), from 4 to 12 weeks (-3.4 ± 3.5 %, $p < 0.001$), while no significant changes were observed from 12 weeks to 12 months (-0.2 ± 1.1 cm, $p = 0.89$), therefore after 1 year the subjects experienced a mean total body weight loss of 8.1 ± 5.9 % (Fig. 1).

Regarding the haemodynamic parameters, SBP significantly improved from baseline to 3 months (-10.5 ± 6.4 mmHg,

Table 1 Main anthropometric, haemodynamic and laboratory characteristics of the enrolled subjects at the baseline (value compared between genders)

Variable	Men	Women
Age (years)	$48.3 \pm 10.9^*$	45.6 ± 9.9
Body weight (kg)	$97.5 \pm 10.8^*$	81.9 ± 10.4
Body mass index (kg/m ²)	$32.1 \pm 2.8^*$	31.2 ± 3.1
Waist circumference (cm)	$108.3 \pm 9.6^*$	99.6 ± 10.0
Index of central obesity	0.62 ± 0.05	0.61 ± 0.06
Fat mass (%)	$41.4 \pm 16.3^*$	37.3 ± 15.9
Systolic blood pressure (mmHg)	$132.5 \pm 14.2^*$	128.0 ± 15.1
Dyastolic blood pressure (mmHg)	$78.9 \pm 7.7^*$	75.9 ± 11.3
Pulse pressure (mmHg)	53.5 ± 12.8	52.1 ± 14.6
TSH (uUI/mL)	2.1 ± 1.3	2.6 ± 2.5
Fasting plasma glucose (mg/dL)	$104.6 \pm 21.8^*$	95.7 ± 27.0
Glycated haemoglobin (%)	5.5 ± 0.9	5.5 ± 0.8
Total cholesterol (mg/dL)	215.6 ± 35.4	211.8 ± 39.3
HDL cholesterol (mg/dL)	$45.2 \pm 10.5^*$	56.3 ± 14.9
LDL cholesterol (mg/dL)	138.7 ± 31.7	132.9 ± 36.1
Triglycerides (mg/dL)	$158.9 \pm 75.3^*$	117.0 ± 67.9
AST (U/L)	$25.0 \pm 10.9^*$	21.2 ± 7.5
ALT (U/L)	$33.3 \pm 19.5^*$	23.4 ± 10.8
Gamma glutamyl transferase (U/L)	$32.6 \pm 16.9^*$	23.2 ± 17.4
Creatinine (mg/dL)	$0.93 \pm 0.15^*$	0.80 ± 0.15
Serum uric acid (mg/dL)	$5.6 \pm 1.2^*$	4.5 ± 1.2
Microalbuminuria (mg/L)	$10.3 \pm 7.2^*$	8.9 ± 9.3
Serum potassium (mEq/L)	4.9 ± 1.8	4.3 ± 1.3
Serum sodium (mEq/L)	139.4 ± 3.8	139.2 ± 3.1
Serum magnesium (mg/dL)	2.0 ± 0.6	1.9 ± 0.5
Serum calcium (mg/dL)	8.9 ± 1.2	8.9 ± 1.2

* $p < 0.05$, men vs. women

$p < 0.001$) but no changes were observed after 1 year of observation. A similar trend, has been noticed for DBP (-2.2 ± 3.1 mmHg, $p < 0.001$) and PP (-8.3 ± 6.2 mmHg, $p < 0.001$).

FPG significantly improved from baseline to 4 weeks (-8.7 ± 15.3 mg/dL, $p < 0.001$) and no change were observed after 1 year of monitor. Similarly, HbA1c improved from baseline to 3 months (-0.3 ± 0.7 mg/dL, $p < 0.001$) and held steady after 1 year of observation.

About lipid parameters, LDL-C significantly improved from baseline to 3 months (-19.5 ± 16.9 mg/dL, $p < 0.001$) and we noticed no change after 1 year of observation. A similar trend has been observed for TG (-23.4 ± 30.2 mg/dL, $p < 0.001$), while HDL-C improved from baseline to 4 weeks ($+1.8 \pm 5.6$ mg/dL, $p = 0.038$), and even more after 12 months ($+3.5 \pm 3.3$ mg/dL, $p < 0.001$).

As regards the liver parameters, AST significantly improved from 1 to 3 months (-2.2 ± 3.2 U/L, $p < 0.001$), and no other changes were marked after 1 year of observation. A

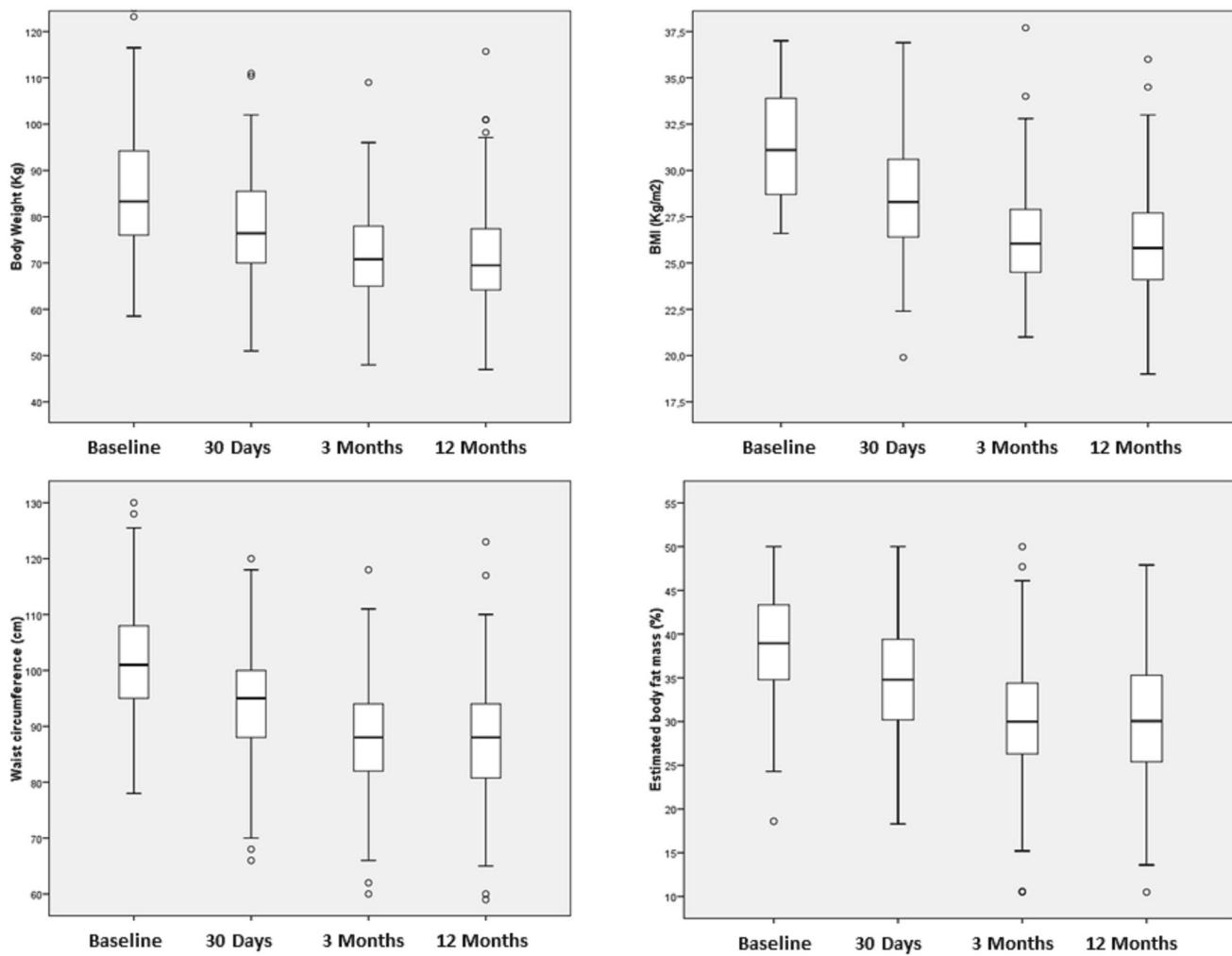


Fig. 1 Body weight, BMI, waist circumference, and estimated body fat mass changes during the different study phases

similar trend has been observed for ALT (-3.1 ± 5.3 U/L, $p < 0.001$), while gamma-GT improved from baseline to 4 weeks (-4.1 ± 5.2 mg/dL, $p < 0.001$), with no other significant changes after 1 year of observation.

With reference to renal parameters, estimated glomerular filtration rate (eGFR), creatinine level and microalbuminuria were not significantly modified during the observation period, while uricemia mildly but significantly improved from the 3rd month to the end of the study (-0.4 ± 1.5 mg/dL, $p = 0.048$).

No significant change has been observed as regards serum level of potassium, sodium and magnesium. However calcemia mildly but significantly decreased from baseline to 30 days (-0.35 ± 0.82 mg/dL, $p = 0.001$), while it improved in the following period from 30 to 90 days ($+0.21 \pm 0.71$ mg/dL, $p = 0.017$).

No changes have been observed in the standard urinalysis.

The short-term body weight loss was quicker in men than in women ($p < 0.05$), greater in those subjects

experiencing a ketonuria in the first period of diet ($p < 0.001$), and was directly related to the baseline body weight (RR 1.10, 95 % CI 1.04–1.16, $p < 0.001$), and inversely to patient age (RR -0.20 , 95 % CI -0.27 to -0.15 , $p < 0.001$), while the long term body weight loss was greater in those subjects experiencing a ketonuria in the first period of diet ($p < 0.05$), and was directly related to the baseline body weight (RR 1.26, 95 % CI 1.27–1.18, $p < 0.001$) and body fat mass (RR 1.17, 95 % CI 1.01–1.33, $p = 0.033$).

4 Discussion

The international guidelines for cardiovascular disease prevention suggest, as a first step, the optimization of dietary habits in order to improve the cardiovascular disease risk [14, 15]. In our study, carried out in the setting of general practice, we observed that a short-term ketogenic diet is able to improve both on the short and long-term a

large number of anthropometric, haemodynamic and metabolic parameters related to the cardiovascular disease risk. In particular we examined a significant improvement in body weight, BMI, WC, ICO, estimated body fat, SBP, DBP, PP, FPG, HbA1c, LDL-C, TG and HDL-C levels, that tend to remain stable after 1 year from the end of the short ketogenic period. The mild improvement of uricemia observed in the trial could also have some relevant prognostic implication [16].

These changes have not been associated to any clinically relevant adverse event.

Our results, in terms of body weight and lipid control improvement, are in good agreement with previous short-term randomized clinical trials comparing the effect of high protein diets to standard protein nutritional regimes [17]. A more recent meta-analysis of 17 randomized clinical trials involving 1141 obese patients confirmed our observation, showing that low-carb/high protein diets are also associated to a significant improvement of systolic and diastolic BP, basal glycaemia and HbA1c [18]. Beyond the low intake of carbohydrate, low-fat diets induce improvement in basal insulinemia depending on protein content in the diet itself, as high protein diets are associated to improved insulinemia, and consequently improved glucose metabolism [19]. The long-term positive effects on body weight and other metabolic parameters observed in our study could be explained by the maintenance of a low-glycaemic index diet after the ketogenic hyperproteic period of the tested method [20]. Nevertheless, our study has a few relevant limitations worth to be considered.

First, it is not a randomized but an observational clinical trial. Thus, one can say that observed effects are related to the reduction of energy intake per se rather than the tested dietary method [21].

Moreover, one can argue that the baseline characteristics of the enrolled patients were not homogenous as well as different physician ability to discuss the methods could have influenced the efficacy of the method itself. This can be understood looking at the goal we wanted to reach, that was to mimic real patients that a general practitioner usually cope with.

However, at the best of our knowledge, this is the first report one can find in the literature of the efficacy and tolerability of a short-term ketogenic intervention on overweight and obese patients outside highly specialized centres, with a relatively long follow-up after intervention end [22].

5 Conclusion

With the limitation of an observational study, in our experience a short-term ketogenic diet managed in the setting of general practice seemed to be able to improve a large

number of anthropometric, haemodynamic and metabolic parameters related to the cardiovascular disease risk, with improvements maintained also on the long-term [23, 24]. Further randomized clinical trials are expect to confirm these positive results.

Acknowledgments Authors gratefully acknowledge Therascience nutritional laboratory for developing Lignaform method. We feel indebted to all of the physicians that participated in this study by collecting data as well as taking care of the patients who took part in this work. We also thank Alessandra Conte for reading manuscript and useful suggestions.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384:766–81.
- Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, Hayflick L, Butler RN, Allison DB, Ludwig DS. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*. 2005;352:1138–45.
- Koh-Banerjee P, Wang Y, Hu FB, Spiegelman D, Willett WC, Rimm EB. Changes in body weight and body fat distribution as risk factors for clinical diabetes in US men. *Am J Epidemiol*. 2004;159:1150–9.
- Cicero AF, Rosticci M, D'Addato S, Baronio C, Grossi G, Grandi E, Borghi C. Population health needs assessment and healthcare services use in a 3 years follow-up on administrative and clinical data: results from the Brisighella Heart Study. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2014;21(1):45–51.
- Finkelstein EA, Ruhm CJ, Kosa KM. Economic causes and consequences of obesity. *Annu Rev Public Health*. 2005;26:239–57.
- Bellisle F. Infrequently asked questions about the Mediterranean diet. *Public Health Nutr*. 2009;12:1644–7.
- Johnstone AM, Horgan GW, Murison SD, Bremner DM, Lobley GE. Effects of a high-protein ketogenic diet on hunger, appetite, and weight loss in obese men feeding ad libitum. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:44–55.
- Paoli A, Bianco A, Grimaldi KA, Lodi A, Bosco G. Long term successful weight loss with a combination biphasic ketogenic Mediterranean diet and Mediterranean diet maintenance protocol. *Nutrients*. 2013;5:5205–17.
- Schugar RC, Crawford PA. Low-carbohydrate ketogenic diets, glucose homeostasis, and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15:374–80.
- Paoli A, Rubini A, Volek JS, Grimaldi KA. Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67:789–96.
- Bueno NB, de Melo IS, de Oliveira SL, da Rocha Ataide T. Very-low-carbohydrate ketogenic diet v. low-fat diet for long-term

- weight loss: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr.* 2013;110:1178–87.
12. Paoli A. Ketogenic diet for obesity: friend or foe? *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11:2092–107.
 13. Hoffer LJ, Bistrian BR, Young VR, Blackburn GL, Matthews DE. Metabolic effects of very low calorie weight reduction diets. *J Clin Invest.* 1984;73:750–8.
 14. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J.* 2011;32:1769–818.
 15. The American College of Cardiology, American Heart Association Task force on Practice Guidelines and the Obesity society. AHA/ACC/TOS Guideline for the management of overweight and obesity in adults. *J Am Coll Cardiol.* 2013;2014(63):2985–3023.
 16. Cicero AF, Rosticci M, Reggi A, Derosa G, Parini A, Grandi E, D'Addato S, Borghi C. Relationship between serum uric acid and electrocardiographic alterations in a large sample of general population: data from the Brisighella Heart Study. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2014 (Epub ahead of print) PubMed PMID:25512187.
 17. Clifton PM, Bastiaans K, Keogh JB. High protein diets decrease total and abdominal fat and improve CVD risk profile in overweight and obese men and women with elevated triacylglycerol. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009;19:548–54.
 18. Santos FL, Esteves SS, da Costa Pereira A, Yancy WS Jr, Nunes JP. Systematic review and meta-analysis of clinical trials of the effects of low carbohydrate diets on cardiovascular risk factors. *Obes Rev.* 2012;13:1048–66.
 19. Schwingshackl L, Hoffmann G. Long-term effects of low-fat diets either low or high in protein on cardiovascular and metabolic risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Nutr J.* 2013;12:48.
 20. Schwingshackl L, Hoffmann G. Long-term effects of low glycemic index/load vs. high glycemic index/load diets on parameters of obesity and obesity-associated risks: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23:699–706.
 21. Moreno B, Bellido D, Sajoux I, Goday A, Saavedra D, Crujeiras AB, Casanueva FF. Comparison of a very low-calorie-ketogenic diet with a standard low-caloriediet in the treatment of obesity. *Endocrine.* 2014;47:793–805.
 22. Cotter DG, Schugar RC, Crawford PA. Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304:H1060–76.
 23. Bravata DM, Sanders L, Huang J, Krumholz HM, Olkin I, Gardner CD, Bravata DM. Efficacy and safety of low-carbohydrate diets: a systematic review. *JAMA.* 2003;289:1837–50.
 24. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, McGuckin BG, Brill C, Mohammed BS, Szapary PO, Rader DJ, Edman JS, Klein S. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med.* 2003;348:2082–90.

www.therascience.com/it



IT73