

REVIEW

ACIDI GRASSI ω 3: EVIDENZE, NOVITÀ E PROSPETTIVE

Omega-3 fatty acids: evidences, novelties and perspectives

GIOVANNI BATTISTA VIGNA, ALFREDO DE GIORGI

Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara

SUMMARY

Sea-food derived long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA: eicosapentenoic acid, EPA, and docosahexenoic acid, DHA) have been extensively studied in humans either as fish-oil/dietetic advice or ethyl-ester or reesterified triglyceride supplements. They are a family of biologically active substances showing some promise in cardiovascular (CV) disease prevention. The many actions of LC n-3 PUFA seem to involve multiple mechanisms:

- 1) they appear to act via receptors or sensors, so regulating signaling processes that influence patterns of gene expression;
- 2) they modify membrane fatty acid composition, affecting membrane functionality, lipid raft formation and the production of lipid and peptide intracellular mediators;
- 3) they may act directly (as free fatty acids) regulating some trans-membrane ion flux or through the formation of peculiar eicosanoids and some new product (resolvins and protectins) mitigating the inflammatory process.

The most extensive data evaluating CV consequences of these compounds come from many recent controlled trials performed in both primary and secondary CV prevention. Even if LC n-3 PUFA seem to exert some effects that may prove favorable (triglyceride lowering; antiarrhythmic action, ...), they do not show, on the whole, a significant reduction in death or CV event rate. Only a few trials (performed in patients with heart failure or within a few months from a myocardial infarction) evidenced some reduction in selected CV outcome (in particular sudden death). Meta-analyses similarly did not contribute to a better insight into these potential benefits and have been criticized because of many biases.

In conclusion, while the Italian regulative Agency (AIFA) fixed the reimbursability of LC n-3 PUFA only to a limited extent, according to the evidences available, it must be recognized that these drugs/supplements need further evaluation for their potential usefulness in specific settings of subjects or clinical conditions, and that a cost/effectiveness analysis may be considered.

Keywords: *Polyunsaturated n-3 fatty acids, fish oil, omega-3 index, cardiovascular prevention, atherosclerosis.*

Introduzione

Gli acidi grassi a lunga catena (LC PUFA, Long Chain Poly Unsaturated Fatty Acids) derivati dal pesce (eicosapentaenoico, EPA; docosapentaenoico, DPA; docosaesaenoico, DHA) e l'acido linolenico (ALA, a catena corta e di origine vegetale) sono a.g. poliinsaturi defini-

Indirizzo per la corrispondenza

Dr. Giovanni B. Vigna
U.O. Medicina Interna Universitaria
Azienda Ospedaliera di Ferrara, Polo di Cona
Via A. Moro, 8
44124 Ferrara
E-mail: vgg@unife.it

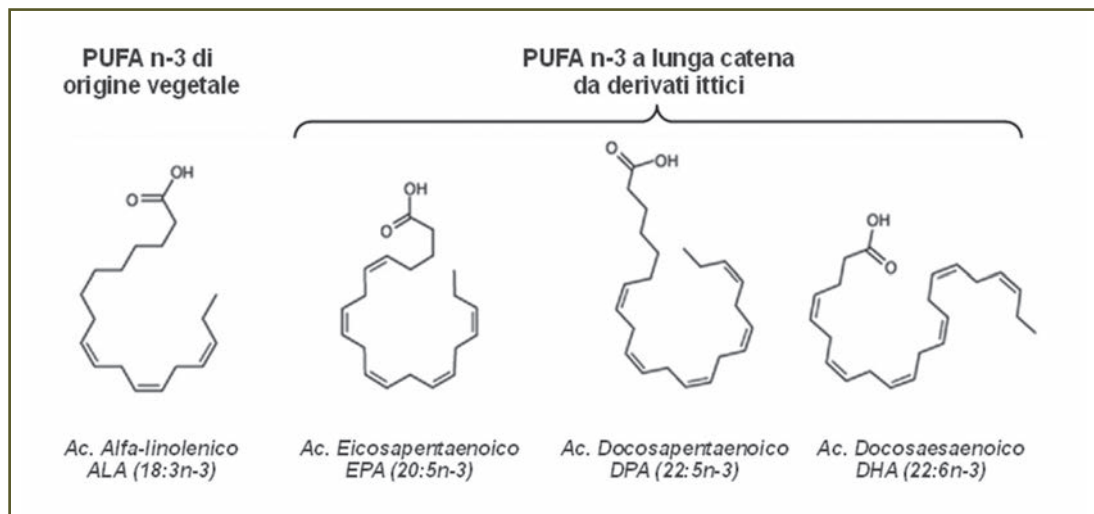


Figura 1 - Acidi grassi polinsaturi della serie omega 3, in rapporto ad origine, lunghezza della catena e numero di doppi legami.

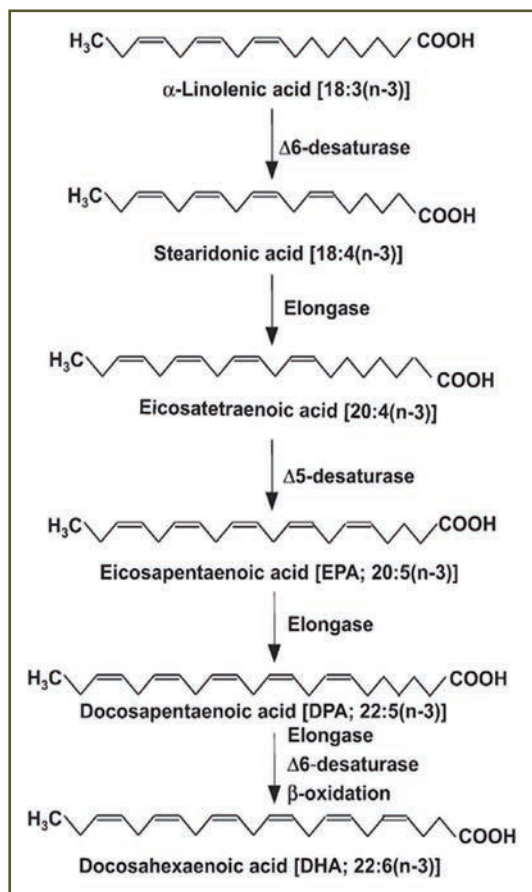


Figura 2 - Biosintesi dei LC PUFA n-3.

ti essenziali poiché l'uomo è incapace di sintetizzarli (*Figura 1*).

Vengono riferiti alla serie ω -3 (detta anche n-3) in rapporto al loro primo doppio legame che si trova a livello dell'atomo di carbonio 3 dell'estremo metil-terminale (carbonio *omega*).

Alcune categorie di soggetti quali i neonati prematuri, gli ipertesi, i diabetici, gli anziani, per una ridotta capacità di allungare e desaturare ALA (*Figura 2*), sono ulteriormente dipendenti dall'introduzione di PUFA n-3 con la dieta.

I soggetti adulti presentano un'attività variabile del complesso enzimatico dell'ALA desaturasi, e comunque relativamente bassa per cui necessitano comunque di integrazione alimentare.

Vari studi hanno dimostrato che EPA e DHA sono importanti nello sviluppo del sistema nervoso e di quello visivo; quindi la dieta della donna gravida e del neonato devono contenerne adeguate quantità.

Già nel 1944 Sinclair descrisse il tasso ridotto di cardiopatia ischemica negli Inuit (Eschimesi della Groenlandia), ponendolo in rapporto all'elevato consumo

dietetico di cetacei, foche e pesce. Queste osservazioni furono approfondite negli anni '70 del secolo scorso da Dyerberg e Bang, i quali evidenziarono che nonostante un basso apporto alimentare di frutta e verdura ed un'elevata assunzione di grassi saturi e colesterolo, la concentrazione dei lipidi plasmatici era inferiore negli Inuit rispetto ai soggetti emigrati in Danimarca o ai nativi danesi, e minore l'incidenza di infarto miocardico anche dopo stratificazione per età e sesso. Documentarono che gli effetti benefici rivolti prevalentemente al sistema cardiovascolare erano verosimilmente correlati all'elevato apporto dietetico di LC PUFA n-3 (EPA, DPA, e DHA per circa 13 g/die *vs* 0,8 g/die dei danesi) (1, 2).

Successive indagini condotte in Giappone, Norvegia, ed altre nazioni hanno ulteriormente esteso la portata di queste prime osservazioni, mentre i trial clinici più recenti, condotti integrando l'alimentazione con LC PUFA n-3, hanno sollevato numerose perplessità. Scopo di questa breve rassegna è riassumere i dati oggi disponibili, derivanti dalla ricerca di base e da sperimentazioni controllate, indicare le formulazioni presenti in commercio e proporre un loro possibile utilizzo *evidence-based*.

Meccanismo d'azione dei LC PUFA n-3

Gli effetti protettivi a livello cardiovascolare dei LC PUFA n-3 sembrano mediati da differenti meccanismi a carico di diversi fattori di rischio e vie metaboliche (Tabella 1, Figura 3).

A livello lipoproteico essi determinano prevalentemente una ridotta sintesi epatica di acidi grassi, trigliceridi, VLDL (lipoproteine a bassissima densità), oltre che un aumentato catabolismo delle VLDL e loro conversione in LDL (lipoproteine a bassa densità) per azione delle lipoproteinlipasi (3). Recenti studi hanno inoltre evidenziato un effetto indiretto mediato dai recettori PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) di cui i PUFA n-3 rappresenterebbero, assieme a numerosi eicosanoidi, i fisiologici ligandi endogeni: essi modulerebbero in particolare l'attivazione dei PPAR α e quella di fattori di trascrizione nucleare quali SREBP-1c (sterol regulator element-binding protein-1c) (4).

I LC PUFA n-3 presenti nei fosfolipidi cellulari, possono essere rilasciati dall'azione della Fosfolipasi A2, indotta da svariati stimoli. Essi vengono allora convertiti attraverso molteplici percorsi in mediatori di segnale: le vie classiche riguardano

Tabella 1 - Ruolo fisiologico e potenziali benefici dei PUFA n-3.

Ruolo fisiologico degli AG ω3	Benefici clinici potenziali	Target
Regolazione pressoria	↓ pressione arteriosa	Ipertensione; MCV
Regolazione piastrinica	↓ rischio di trombosi	MCV
Regolazione della coagulazione	↓ rischio di trombosi	MCV
Regolazione livelli di trigliceridi	↓ trigliceridemia	MCV
Regolazione funzione vascolare	↑ FMD	MCV
Regolazione ritmo cardiaco	↑ tono vagale, ↓ aritmie	MCV
Regolazione funzione miocardica	↑ compliance ed efficienza VS	MCV
Regolazione dell'infiammazione	↓ infiammazione	Malattie infiammatorie; MCV
Regolazione sensibilità insulinica	↑ sensibilità insulinica	Diabete tipo 2; MCV

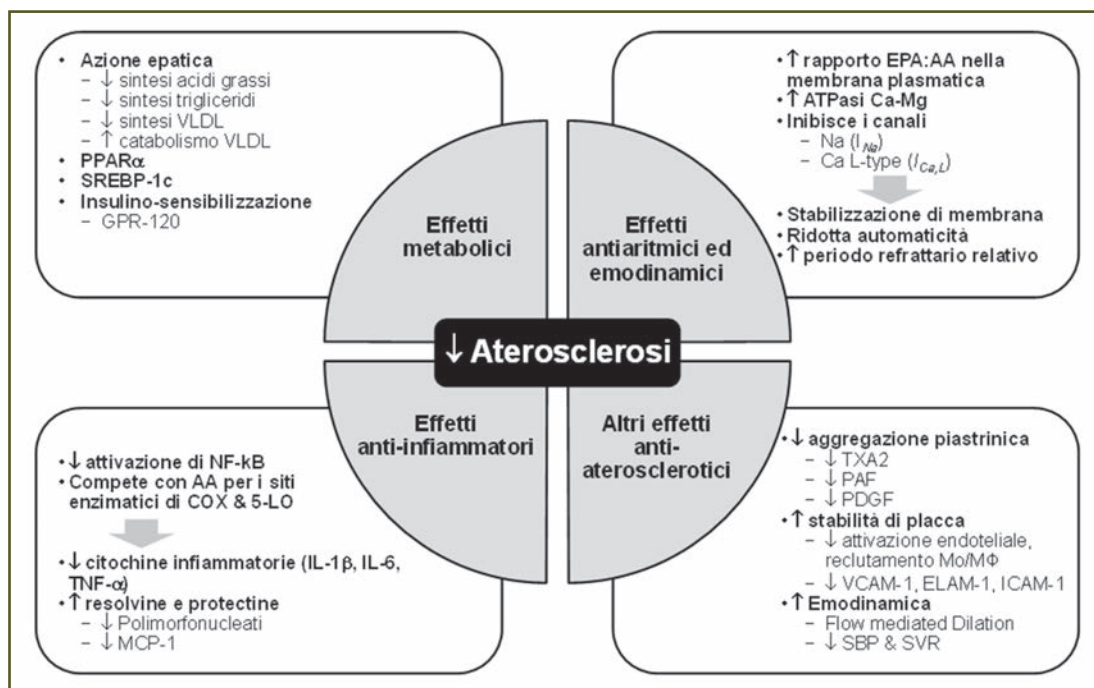


Figura 3 - Potenziali effetti benefici dei PUFA n-3.

AA, Acido Arachidonico; COX, Ciclossigenasi; 5-LO, 5 Lipossigenasi; TXA2, Trombossano A2; Mo/M Φ , sistema dei Monociti-Macrofagi; SBP, Pressione arteriosa Sistolica; SVR, Resistenze Vascolari Sistemiche (per altre abbreviazioni: vedi testo).

reazioni catalizzate da enzimi come cicloossigenasi e lipoossigenasi, che danno origine ad eicosanoidi biologicamente attivi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni).

I composti derivati dai LC PUFA n-3 sono in genere mediatori locali molto meno potenti di quelli che originano dall'ac. arachidonico (di derivazione da PUFA n-6) e questo "antagonismo funzionale" ne spiega l'effetto antinfiammatorio. I meccanismi attraverso cui sembrano agire questi composti sono molteplici: essi intervengono nell'inibizione di NF- κ B (nuclear factor - κ B), tramite il reclutamento di Toll-like receptor-4, inibizione delle cicloossigenasi (COX), in particolare COX-2, inibizione delle molecole di adesione (VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1) e della sintesi di citochine pro-infiammatorie quali

IL-1 β , IL-6, TNF- α (5). Recentemente si è evidenziato come i LC PUFA n-3 siano anche trasformati in composti di nuova identificazione, quali epossidi, alcoli, dioli e chetoni. Queste sostanze, attive in un range di concentrazione nanomolare, sono stereoselettive, svolgono azioni antinfiammatorie e sono prodotte durante la fase di risoluzione dell'infiammazione attraverso vie sintetiche trans-cellulari: sono state definite "resolution- phase interaction products" (resolvine: protectine, maresine e lipoxine) (6); tali citochine limitano l'infiltrazione tissutale di polimorfonucleati (PMN), favoriscono la degradazione dei PMN apoptotici da parte dei macrofagi, inibiscono l'espressione di COX-2, TNF- α e della proteina di chemo-attrazione dei macrofagi (MCP-1) (7, 8). Tutte queste azioni si possono estrinsecare nella inibi-

zione dei meccanismi che portano alla formazione della placca aterosclerotica (ad es. attraverso una diminuita attivazione piastrinica per la ridotta produzione di fattori quali trombossano A_3 - TXA₃ -, fattore di attivazione piastrinica - PAF -, fattore di crescita di derivazione piastrinica - PDGF) e in una maggior stabilità delle lesioni vascolari già instaurate (riduzione della flogosi e aumento di spessore del cappuccio fibroso) (9, 10).

Parte di questi effetti antinfiammatori sono invece conseguenza diretta del processo di integrazione dei LC PUFA n-3 all'interno delle membrane cellulari. La loro presenza nei fosfolipidi di membrana rappresenta un meccanismo generale capace di determinare modifiche funzionali nelle cellule interessate; in particolare essi si localizzerebbero al di fuori di particolari domini della membrana cellulare (definiti "lipid-rafts", ricchi in colesterolo, sfingolipidi e contenenti molte proteine coinvolte nella transduzione di segnali cellulari) influenzandone la formazione e la funzione. Anche a livello delle cellule dell'endotelio vascolare ciò pare favorire un incremento della fluidità della membrana stessa ed una conseguente alterazione di espressione e attivazione di recettori, capace di regolare il flusso ematico e le resistenze vascolari (11). Proprio per le ragioni appena esposte si è identificato un parametro analitico, il cosiddetto *Indice Omega-3*, che sembra costituire un determinante biologico utile ad esprimere livelli efficaci di LC PUFA n-3. Esso viene calcolato come somma di EPA+DHA presenti nelle membrane eritrocitarie, ed espresso come percentuale degli acidi grassi totali dei globuli rossi. È stato validato in rapporto all'assunzione alimentare di LC PUFA n-3 e si è visto correlare da vicino con la riduzione della mortalità cardiovascolare (*Figura 4*) (19).

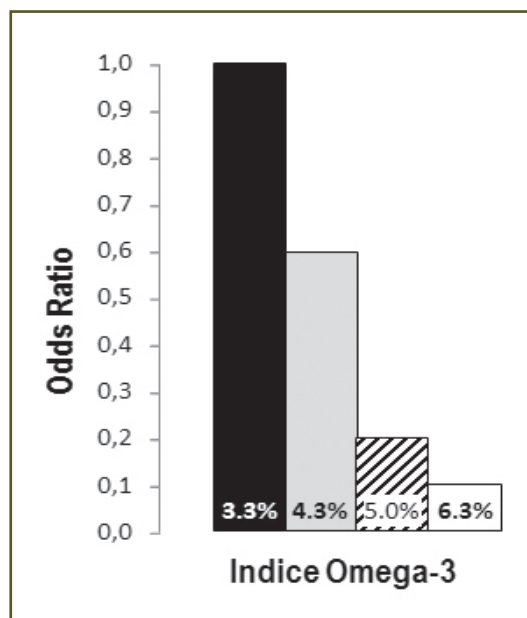


Figura 4 - Rapporto tra l'indice Omega-3 ed il rischio di arresto cardiaco (Odds Ratio) in uno studio caso-controllo. Modificato da (11).

In concentrazioni micromolari i LC PUFA n-3 mostrano effetti diretti che non implicano un loro preventivo metabolismo.

Ad esempio l'azione antiaritmica si manifesta rapidamente dopo assunzione di queste molecole, e non presuppone la loro esterificazione a fosfolipidi e incorporazione nelle membrane (10).

Nei miociti infatti sono in grado di modulare per interferenza sterica la subunità α dei canali del Na^+ , determinando un innalzamento della soglia per la loro apertura; per tale motivo solo una stimolazione superiore del 40-50% rispetto al normale valore di eccitabilità è in grado di indurre l'insorgenza di un potenziale d'azione.

I LC PUFA n-3, inoltre, interagendo con i canali del Ca^{++} , sono in grado di inibire le correnti voltaggio-dipendenti di tipo L, riducendo le fluttuazioni di Ca^{++} nel citosol.

L'effetto complessivo è quello di una mi-

Tabella 2 - Formulazioni commerciali.

Prodotto	Metodo produttivo	Osservazioni
Fish oil	Raffinazione ($\omega 3 \sim 30\%$ degli AG totali)	Scarsa compliance causa le elevate quantità da ingerire
Fosfolipidi	Raffinazione	
Etil-esteri	Etanolisi + Distillazione \Rightarrow Etilsteri ($\omega 3 \sim 85\%$ AG totali)	La formulazione farmacologica in commercio. Costosa.
Acidi grassi liberi	Idrolisi ($\omega 3 \sim 60\%$ degli AG totali)	Con elevata biodisponibilità
Trigliceridi riesterificati	Ri-esterificazione ($\omega 3 \sim 60\%$ AG totali)	Buona biodisponibilità

nor eccitabilità dei miociti, che unitamente ad un equilibrio simpato-vagale favorente il tono colinergico a scapito di quello adrenergico, giustifica le evidenze sperimentali nell'animale in cui condizioni quali l'infarto miocardico acuto, lo scompenso cardiaco acuto e l'intossicazione digitalica vedono una minor incidenza di morte improvvisa (12).

Formulazioni commerciali di LC PUFA n-3: diversa biodisponibilità

Parallelamente alle evidenze sull'ipotetico ruolo svolto dai LC PUFA n-3 nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, si è assistito ad un progressivo incremento del loro consumo sotto forma di farmaci o nutraceutici, in rapporto anche alle raccomandazioni fornite da numerose società scientifiche (13).

I LC PUFA n-3 sono attualmente commercializzati sotto forma di acidi grassi liberi (FFA), di etil-esteri (EE) o di trigliceridi riesterificati (rTG), a cui vanno aggiunti i prodotti derivati dagli oli di pesce (FO).

Vario è il contenuto di principio attivo in essi presente, potendo essere compreso tra il 30% e oltre l'80% in peso, e variabile anche la loro efficacia che dipende non solo dalla concentrazione di LC PUFA n-3

nei diversi prodotti commerciali ma anche dalla loro biodisponibilità (Tabella 2). Nei triacil-gliceroli è verosimile che quest'ultima dipenda anche dalla distribuzione posizionale dei residui di AG (in natura EPA si troverebbe soprattutto in posizione sn1-3, mentre DHA è maggiormente rappresentato in sn-2).

Dyerberg et al., in una sperimentazione condotta su 72 volontari sani, evidenziarono come i rTG (ottenuti attraverso un processo industriale volto a legare almeno 2 residui di LC PUFA n-3 ad una stessa molecola di glicerolo) mostrassero la maggiore biodisponibilità, seguiti da FFA e FO e quindi, ultimi, dagli EE (14).

Più recentemente due trial clinici (15, 16) hanno riscontrato come le nuove formulazioni di FFA, contenenti un complesso mix di acidi grassi polinsaturi liberi, presentassero una biodisponibilità superiore rispetto agli EE e al placebo, con una più elevata efficacia sulla riduzione della concentrazione plasmatica dei trigliceridi.

Altri autori hanno infine evidenziato come alcuni oli estratti da invertebrati marini e ricchi di LC PUFA n-3, mostrassero biodisponibilità paragonabile a quella dei rTG (17).

Sempre in relazione alla biodisponibilità si desidera rimarcare come l'assunzione di LC PUFA n-3 a stomaco vuoto ne riduca significativamente l'assorbimento (18).

Studi di coorte e trial di intervento con LC PUFA n-3

Un'analisi cumulativa degli studi osservazionali prospettici volti a correlare l'assunzione dietetica di EPA/DHA ed il rischio cardiovascolare in popolazioni non affette da cardiopatia ischemica, ha evidenziato un rapporto non lineare con la mortalità coronarica (Figura 5). Il massimo beneficio parrebbe ottenibile con l'assunzione di 250-500 mg/die di LC PUFA n-3 mentre un apporto superiore non si assocerebbe ad ulteriori vantaggi. Si tratta di un'osservazione importante, ma il cui valore è reso dubitativo dall'estrema dispersione dei dati e dall'incertezza insita nella stima dell'introito alimentare, basata su questionari di frequenza (19).

Lo studio *DART (Diet And Reinfarction Trial)*, pubblicato quasi 25 anni or sono, ha rappresentato il primo esempio di trial che intendeva valutare gli effetti di una in-

tegrazione con LC PUFA n-3 in individui ad elevato rischio cardiovascolare (20). Oltre 2.000 soggetti maschi con storia di infarto miocardico furono assegnati, in un disegno sperimentale in aperto, a seguire una di tre raccomandazioni dietetiche: riduzione dell'assunzione di grassi con aumento del rapporto polinsaturi/saturi; incremento di fibre derivate dai cereali; aumentata assunzione di pesce (200-400 g/settimana, con apporto giornaliero di LC PUFA n-3 pari a circa 500-800 mg/die) o integrazione con capsule di olio di pesce (900 mg EPA/DHA al giorno). Solo quest'ultima raccomandazione si rivelava un'efficace misura preventiva, comportando una riduzione della mortalità totale a 2 anni del 29%, mentre non veniva influenzata l'incidenza del reinfarto. Interessante notare come un analogo studio proposto alcuni anni dopo dai medesimi autori (*Diet and Angina Randomized Trial, DART-2*) e condotto in 3.114 pazienti maschi con

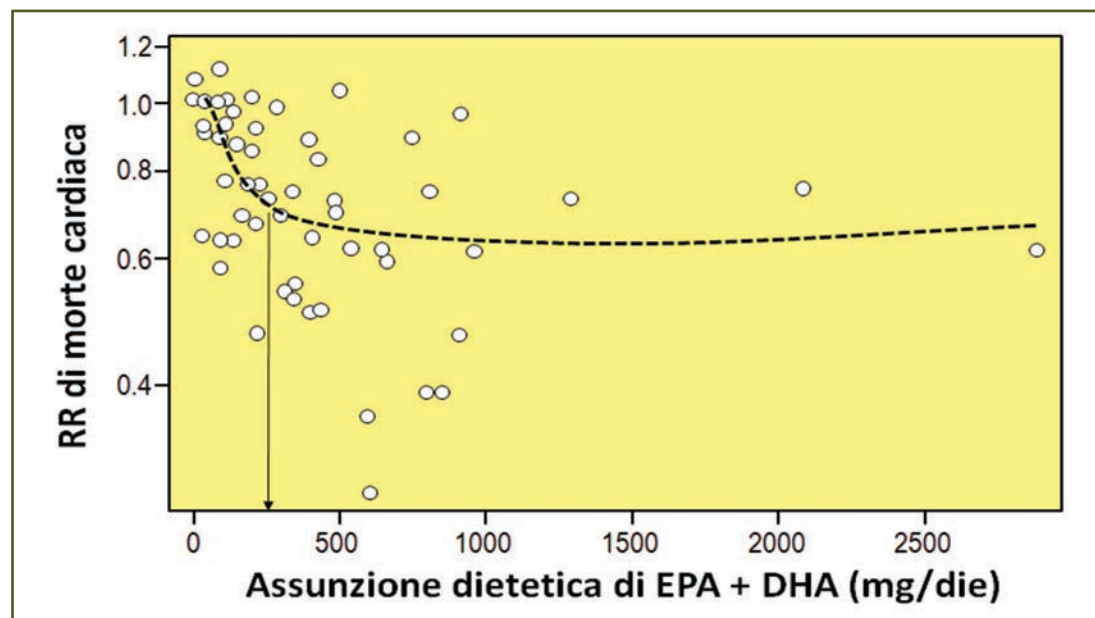


Figura 5 - Consumo dietetico di EPA/DHA e mortalità cardiaca in 326.572 soggetti sani (da 16 studi prospettici condotti in Europa, U.S.A., Cina e Giappone). La freccia indica il valore di EPA/DHA a livello del quale la curva modifica il proprio profilo (non benefici aggiuntivi apparenti).

storia clinica di angina ed età inferiore a 70 anni, mostrò che consigli volti ad aumentare il consumo di pesce grasso o ad assumere capsule di olio di pesce per un periodo di 3-9 anni, non modificavano la mortalità coronarica ma si associavano ad un significativo aumento di morti improvvise (+54%, $p=0,018$) soprattutto nel sottogruppo che assumeva LC PUFA n-3 sotto forma di integrazione farmacologica. Nonostante molteplici tentativi di spiegazione, non è apparso chiaro il perché di queste differenze (21).

Altro importante studio in aperto, ma

condotto utilizzando una formulazione standardizzata di etil-esteri di PUFA n-3, è stato quello condotto dal Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico (*GISSI-Prevenzione*) (22). Il trial interessò 11.324 pazienti italiani con recente infarto miocardico (da meno di 3 mesi), seguiti per un periodo di 3,5 anni, evidenziando come la somministrazione di 1 g di LC PUFA n-3 si associasse a riduzione del 10% di morte per tutte le cause, infarto miocardico e ictus non fatale e del 13% di morte per eventi cardiovascolari (*Tabella 3*). Nel 2010 una simile coorte di

Tabella 3 - Risultati dei principali studi di prevenzione cardiovascolare con LC PUFA n-3.

Studio	Popolazione	Intervento	Anni	Endpoint	RR (IC 95%)
GISSI Prevenzione Marchioli R, 1999 (22)	11.324 pz post-IMA (≤ 3 mesi)	1 g LC PUFA n-3 vs placebo	3,5	MACE	0,89 (0,80-1,01)
		LC PUFA n-3 EE		Mortalità CV	0,83 (0,71-0,97)
JELIS Yokoyama M, 2007 (27)	18.645 pz CT ≥ 250 mg/dl	1.800 mg EPA + statina vs statina	4,6	MACE	0,81 (0,69-0,95)
		LC PUFA n-3 EE		Mortalità CHD	0,94 (0,57-1,56)
GISSI HF Tavazzi L, 2008 (28)	7.466 pz ICC NYHA II-IV	850 mg EPA/DHA vs pl. (e rosuva)	3,9	Mortalità totale	0,91 (0,83-0,99)
		LC PUFA n-3 EE		Mortalità + ricoveri	0,92 (0,85-1,00)
Alpha Omega Kromhout D, 2010 (25)	4.837 pz IMA (mediana 3.7 aa.)	376 mg EPA/DHA vs ALA e placebo	3,4	MACE	1,01 (0,87-1,17)
		fish oil		Mortalità CHD	0,95 (0,68-1,32)
OMEGA Rauch B, 2010 (23)	3.851 pz IMA recente (≤ 2 sett.)	840 mg EPA/DHA vs placebo	1	MACE	1,21 (0,96-1,52)
		LC PUFA n-3 EE		Morte improvvisa	0,95 (0,56-1,60)
SU.FOL.OM3 Galan P, 2010 (24)	2.501 pz SCA o TIA/ictus < 1 aa	600 mg EPA/DHA vs placebo e vit. B	4,2	MACE	1,08 (0,79-1,47)
		LC PUFA n-3 EE		Mortalità CHD	-
ORIGIN Bosch J, 2012 (29)	12.536 pz disglicemia	840 mg EPA/DHA vs placebo	6,2	MACE	1,01 (0,93-1,10)
		LC PUFA n-3 EE		Mortalità CV	0,98 (0,87-1,10)
Risk & Prevention Roncaglioni MC, 2013 (30)	12.513 pz rischio CV, no IMA	850 mg EPA/DHA vs placebo	5,0	MACE	0,97 (0,88-1,08)
		LC PUFA n-3 EE		Mortalità CV	1,03 (0,82-1,30)

IMA, infarto miocardico acuto; MACE, major adverse coronary events; EE, etil-esteri; CHD, coronary heart disease; SCA, sindrome coronarica acuta; CT, colesterolo totale; ICC, insufficienza cardiaca congestizia; CV, cardiovascolare.

3.851 pazienti, di età media 64 anni e con storia recente di infarto miocardico (3-14 giorni), non mostrò al contrario differenze significative dopo 1 anno di follow-up, nell'incidenza di eventi cardiovascolari e nella mortalità, in seguito a trattamento randomizzato con LC PUFA n-3 (1 g/die) (23). Tale studio presentava una insufficiente potenza statistica (power del 44% di rilevare una riduzione del rischio di morte improvvisa del 45%) ed era inoltre inficiato da una elevata assunzione "background" di EPA/DHA (45% dei pz assumevano pesce "molte volte alla settimana"). Sempre nell'ambito della prevenzione secondaria, la *Tabella 3* riporta altri recenti trial randomizzati con analoghi risultati negativi: *SU.FOL.OM3* (24) e *ALPHA-OMEGA* (25) (in pazienti con storia di infarto miocardico acuto, dopo un *follow-up* di 4,7 e 3,7 anni rispettivamente). Nello studio *ALPHA-OMEGA* va osservato che la dose di EPA/DHA utilizzata (376 mg/die) era particolarmente bassa a fronte di un loro elevato introito con l'alimentazione (130 mg/die *vs* 20 mg/die negli USA), che il disegno fattoriale risultava improprio (volto a valutare, confrontandoli, nutrienti che operano con lo stesso meccanismo - EPA/DHA e ALA) e, infine, che l'infarto miocardico anamnestico risultava di molto antecedente rispetto all'arruolamento (in media 4 anni prima). Una sottoanalisi di tale studio, incentrata su pazienti diabetici (26), ha comunque permesso di evidenziare una significativa riduzione delle aritmie ventricolari (-16%) nei pazienti trattati con EPA+DHA rispetto al gruppo placebo ed inoltre minore incidenza di morte improvvisa (-13%) e minore necessità di impiantare un defibrillatore (-19%).

Sorprendentemente lo studio *JELIS* (27), condotto in 18.645 pazienti giapponesi ipercolesterolemici (prevenzione primaria) trattati con statine e con *follow-up*

medio di 4,6 anni, evidenziò come il trattamento aggiuntivo con LC PUFA n-3 (1.800 mg/die) si associasse ad una significativa minor incidenza di evidenzii eventi cardiovascolari e di angina instabile rispetto al gruppo placebo. Non veniva invece ritrovata alcuna favorevole influenza esercitata dalla terapia sulla mortalità totale e cardiovascolare o sull'insorgenza di eventi cerebrovascolari. I risultati si prestano comunque a critica: non si trattava di una sperimentazione controllata *vs* placebo e, anche in tal caso, il consumo di pesce nella popolazione indagata (giapponese) era decisamente elevato (85 g al dì, 900 mg di EPA e DHA).

Lo studio *GISSI-HF* (28) valutò invece l'utilità della somministrazione di LC PUFA n-3 1 g/die in una popolazione affetta da scompenso cardiaco seguita per un periodo medio di 3,9 anni. I soggetti trattati presentarono rispetto al gruppo placebo una riduzione del 9% del rischio di mortalità per tutte le cause, del 10% di mortalità cardiovascolare ed un tasso di ricospitalizzazione per scompenso inferiore del 7%. Una particolare attenzione a condizioni di elevato rischio cardiovascolare è la caratteristica propria degli studi *ORIGIN* e *Rischio & Prevenzione*, che risultano ad oggi le più ampie sperimentazioni che hanno valutato gli effetti dei LC PUFA n-3. Il primo, condotto in oltre 12.500 pazienti con disturbi del metabolismo glucidico (ridotta tolleranza glucidica o franco diabete mellito) e nel 50% dei casi affetti anche da cardiopatia ischemica, mostrò assenza di beneficio da parte di questi farmaci su tutti gli outcome cardiovascolari di mortalità o morbilità considerati, nell'ambito di un follow-up medio di 6,2 anni (29). Ancora una volta i risultati sono stati giudicati con prudenza causa l'elevata assunzione "background" di EPA/DHA (210 mg/die - circa 10 volte superiore all'intake medio

negli USA). Il trial *Rischio & Prevenzione*, condotto in un numero di soggetti analogo al precedente, senza storia di infarto miocardico e con fattori di rischio cardiovascolari multipli, evidenziò una riduzione del rischio di ospedalizzazione nei pazienti trattati per 5 anni, specie se donne, ma non differenze significative in termini di mortalità ed eventi cardiovascolari (30).

In generale tutti i recenti trial condotti con LC PUFA n-3, qui sommariamente descritti, non sono stati in grado di evidenziare un chiaro effetto favorevole di queste sostanze sul tasso di eventi cardiovascolari. Oltre alla possibile reale inefficacia di questi composti (in particolare la formulazione farmacologica), varie possibilità che limitano la generalizzazione dei risultati devono essere tenute ben presenti.

Esse sono così riassumibili: dosi inadeguate (basse) o inadeguata biodisponibilità dei composti utilizzati; elevata dose basale di LC PUFA n-3 assunta con l'alimentazione dalla popolazione generale (di recente osservazione); follow-up limitato in alcuni degli studi considerati; elevati standard di trattamento farmacologico nella popolazione (che renderebbero mal riconoscibili contributi addizionali); recente riduzione del rischio di eventi o di morte improvvisa con numero insufficiente di eventi da analizzare.

Metanalisi e loro significato

Sono state condotte numerose metanalisi degli studi sopra menzionati sui rapporti tra LC PUFA n-3 ed eventi cardiovascolari, con lo scopo di aumentare il numero di osservazioni e consensualmente la potenza statistica: esse hanno variamente documentato un beneficio evidente, parziale o assente. Ciò anziché dissipare i dubbi e chiarire il significato dei risultati, come appariva auspicabile, ha contribuito

invece a rendere più nebuloso il panorama prospettato.

I diversi autori hanno incluso trial differenti nei loro lavori riassuntivi, e ciò necessariamente in rapporto agli studi al momento pubblicati, ma hanno spesso attuato scelte non coincidenti per identificare i criteri in base ai quali selezionare i singoli studi.

Inoltre sono stati considerati end-point differenti (prevenzione tout-court vs. secondaria; mortalità; morbilità) analizzati attraverso metodi e artifici statistici talora arbitrari.

Volendo considerare solo i lavori più significativi e recenti, Delgado-Lista et al. hanno posto in evidenza una riduzione cumulativa significativa del 10%, 9% e 18% rispettivamente del rischio di eventi cardiovascolari totali, mortalità cardiaca ed eventi coronarici (fatali + non fatali) tra i soggetti trattati con LC PUFA n-3 vs placebo, ed un trend di riduzione del 5% per quanto riguarda la mortalità totale (31). Tale metanalisi non ha considerato i dati dello studio *ALPHA-OMEGA* introducendo tra i criteri di esclusione quello di un trattamento attivo con ALA: scelta quasi "ad hoc" per tale studio.

Contemporaneamente Kwak et al. pubblicavano un lavoro simile ma in ambito di prevenzione cardiovascolare secondaria (32). Tra i criteri per la scelta degli studi gli autori menzionavano i soli trial randomizzati e controllati: pertanto il *GISSI-Prevenzione*, con disegno "open label", non risultava incluso.

Tutti gli end-point cardiovascolari considerati (eventi totali, mortalità totale, morte improvvisa, infarto miocardico, ...), con la sola eccezione della mortalità cardiovascolare (HR 0,91, IC 95% 0,84-0,99), non risultavano significativamente influenzati dal trattamento con LC PUFA n-3, anche dopo esame per sottogruppi (durata del

trattamento, dosaggio farmacologico utilizzato, qualità metodologica dei trial, area geografica, anamnesi cardiologica dettagliata, terapia concomitante, ...).

La metanalisi forse più soddisfacente, pubblicata sempre nello stesso anno, è quella di Rizos et al., che tuttavia ha il torto di proporre un livello di significatività statistica particolarmente basso ($p=0,0063$) in rapporto ad un discutibile aggiustamento per confronti multipli (33). Questo lavoro ha incluso 20 trial randomizzati, controllati per placebo o open-label, e i due studi DART (prevalentemente basati su consigli nutrizionali).

Sebbene come per l'analisi di Kwak et al., gli autori concludano per una mancanza di significatività statistica dei sup-

plementi di LC PUFA n-3 sul rischio cardiovascolare, se si fosse ricondotta la p al valore usuale di 0,05, la mortalità cardiaca sarebbe apparsa ridotta in modo significativo del 9%, con trend favorevole di altri outcome vascolari (Figura 6).

Date le problematiche comuni a tutte le metanalisi e i diversi bias comunque irrisolti (e a cui si è già accennato nella sezione relativa all'esame dei singoli trial) è verosimile che sia opportuno mantenere un atteggiamento prudente nel trarre qualsiasi conclusione.

Piuttosto che affermare crudemente "I nostri risultati non giustificano l'utilizzo di n-3 come intervento strutturato nella pratica clinica o le linee guida che indicano la somministrazione dietetica di LC PUFA

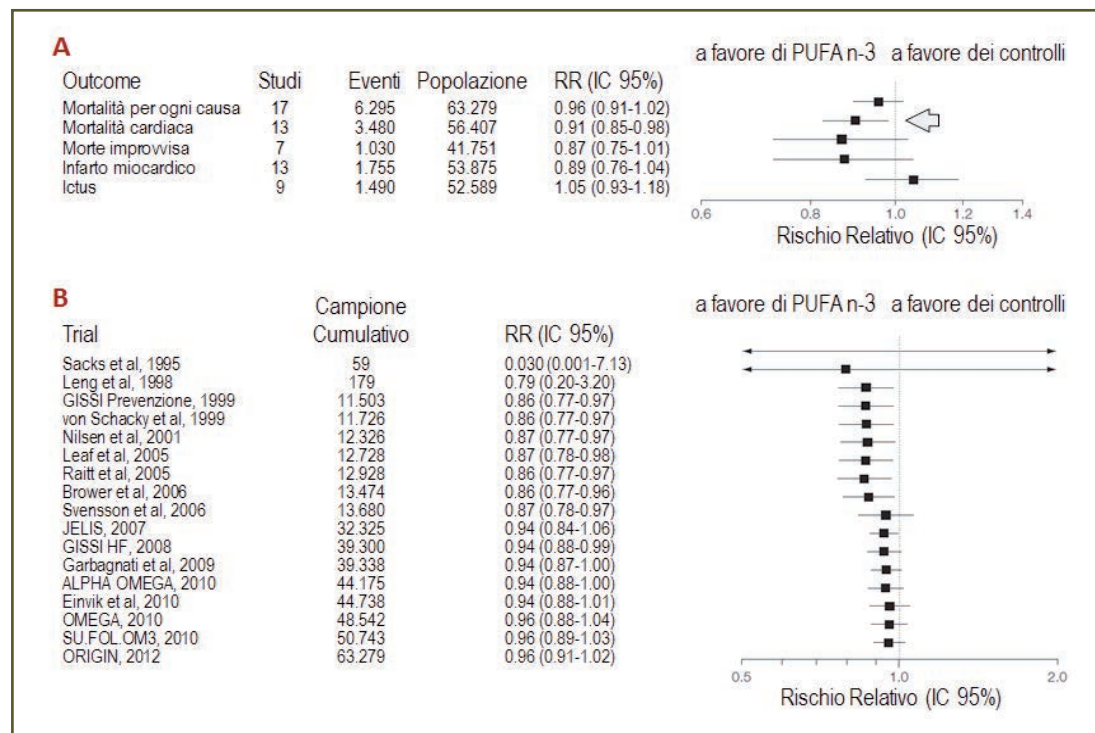


Figura 6 - Metanalisi LC PUFA n-3 e malattia cardiovascolare: eventi (A) e mortalità cumulativa (B). La freccia in alto indica il dato di mortalità cardiaca, significativo per $p=0,01$ ma non al livello prefissato dalla metanalisi ($p=0,0063$). La sezione B indica come si è progressivamente modificata la mortalità cumulativa in rapporto alla pubblicazione in anni successivi di diversi studi che hanno analizzato l'efficacia preventiva dei LC PUFA n-3.

n-3", Rizos et al. avrebbero potuto meglio contestualizzare quanto ottenuto, concludendo con un'affermazione più accettabile quale, ad esempio, avrebbe potuto essere la seguente: "In pazienti di età media 63 anni, con molteplici tipi di malattia cardiovascolare in trattamento farmacologico ottimizzato, la somministrazione di 1 g di EPA/DHA per circa 2 anni (durata media dei trial delle loro analisi) non ha ridotto significativamente il rischio di eventi cardiovascolari principali".

Infatti iniziando la terapia precocemente, o a dosi superiori o per un periodo più protratto o in un contesto clinico diverso, si sarebbe potuto forse osservare un esito differente. Deve essere anche ricordato che i LC PUFA n-3, sia sotto forma alimentare che di nutraceutici o farmaci, presentano una ottima tollerabilità per cui anche un beneficio "tendenziale" potrebbe essere guardato con favore, dati i trascurabili rischi associati alla loro somministrazione (34).

Accanto alle metanalisi di significato clinico, ne sono state elaborate altre per valutare l'effetto biologico di tali farmaci. In particolare una recente revisione basata su 16 trial clinici condotti sia in pazienti sani che malati (diabetici, dislipidemici, ipertesi, cardiopatici), ha evidenziato come la somministrazione di LC PUFA n-3 si associ ad un significativo miglioramento della funzione endoteliale vascolare (incremento della flow-mediated dilation), senza influenzare la vasodilatazione endotelio-indipendente (11).

Un effetto sulla riduzione della stiffness arteriosa è stata confermata dalla metanalisi di Pase et al. (35; Gao et al. (36), infine, in 55 trials controllati hanno evidenziato come il trattamento con LC PUFA n-3 si associ ad una ridotta aggregabilità piastrinica nei pazienti coronaropatici, ma non nei soggetti sani.

Indicazioni attuali e prospettive

Le più recenti linee guida cardiovascolari non forniscono indicazioni relative all'utilizzo di LC PUFA n-3 se non per il trattamento delle dislipidemie (13).

Da un punto di vista regolatorio l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) ha definito l'ambito di rimborsabilità da parte del SSN di tali sostanze in due diverse note limitative che fungono anche da mezzo per assicurare la loro appropriatezza d'impiego.

L'aggiornamento della *nota 13*, pubblicato sulla G.U. del 9 aprile 2013, prevede il loro utilizzo esclusivamente nelle gravi iperchilomicronemie e ipertrigliceridemie in eventuale alternativa/associazione ai fibrati, e in caso di elevati livelli di trigliceridi (≥ 500 mg/dl) in corso di insufficienza renale cronica.

La nuova *nota 94*, pubblicata sulla G.U. del 5 dicembre 2013, indica nella sindrome coronarica acuta, in atto (ricovero) o recente (nei 90 giorni precedenti la prescrizione), le condizioni in cui i LC PUFA n-3 possono essere prescritti a carico del SSN, e per un periodo di 12 mesi (se con frazione di eiezione miocardica (FE) $>40\%$) o 18 mesi (in caso di bassi valori di FE).

Va riconosciuto come il trattamento con LC PUFA n-3 in corso di ipertrigliceridemie non risulti più efficace del trattamento con fibrati (in particolare fenofibrato) (37), né possieda in questo contesto evidenze cliniche di poter ridurre significativamente l'incidenza di endpoint cardiovascolari, e nel contempo appaia più costoso. I LC PUFA n-3 EE sono comunque farmaci ottimamente tollerati, il cui utilizzo deve essere considerato qualora si verifichino o temano reazioni avverse in rapporto all'utilizzo di fibrati, o in corso di insufficienza renale (condizione in cui l'utilizzo

di questi ultimi dovrebbe essere evitato) o, infine, in associazione ai fibrati stessi per potenziarne l'effetto.

In tali condizioni la loro posologia dovrebbe essere di 3-4 g al dì, in una o più somministrazioni, con una riduzione attesa della trigliceridemia del 25-35% (38).

D'altra parte, per quanto è stato ampiamente discusso in questa rassegna, riteniamo condivisibili e certamente non restrittive le indicazioni AIFA all'utilizzo di LC PUFA n-3 in ambito cardiovascolare.

Esse, prospettando un loro utilizzo nel periodo perinfartuale (12-18 mesi), particolarmente in soggetti con insufficienza miocardica, si allineano alle principali conclusioni dei trial preventivi condotti nel nostro Paese (22, 28) e supportano alcune esperienze sperimentali che sembrano indicare un incremento della FE e capacità funzionale miocardica, una riduzione della classe NYHA e dei ricoveri ospedalieri connessi al loro impiego (39, 40).

È verosimile che il contesto delle aritmie debba ricevere ulteriore attenzione, nonostante alcune esperienze non favorevoli relative al trattamento della fibrillazione atriale post-operatoria (41, 42).

Auspichiamo che vengano ulteriormente caratterizzati alcuni ambiti terapeutici potenzialmente interessanti relativi a sottogruppi di pazienti cardiopatici, quali i soggetti portatori di defibrillatore impiantabile: 3 piccoli trial randomizzati e controllati hanno dato risultati contrastanti e sarebbe interessante uno studio più ampio (43).

Infine non possiamo che incoraggiare principalmente l'utilizzo di pesce (in particolare pesce azzurro), e solo in seconda battuta quello di farmaci o nutraceutici contenenti LC PUFA n-3, quantunque il rischio di una contaminazione dei prodotti ittici da parte di metalli pesanti sia sempre presente (44).

Conclusioni

ILC PUFA n-3 rivestono un ruolo ancora incompletamente definito nell'ambito della prevenzione cardiovascolare e le attuali evidenze scientifiche sembrano riservare loro uno spazio marginale nell'insieme dei trattamenti oramai codificati. Sicuramente si conosce molto sui loro effetti biologici e potenzialità d'impiego, ma scarse sono ancora le evidenze significative ad oggi acquisite. Non pare tuttavia verosimile un loro utilizzo ampio e incondizionato, in quanto essi appaiono per lo più scevri da importanti effetti collaterali, ma sono farmaci costosi, e richiedono una attenta valutazione farmaco-economica. Pertanto non si può che invocare il loro eventuale inserimento in una terapia contestualizzata, laddove vengano considerate le potenziali interazioni farmacologiche, la variabilità interindividuale nel loro metabolismo, il tipo di composto da preferire ed insieme la specifica patologia da affrontare o prevenire.

Glossario

- AA:** Acido Arachidonico
- ALA:** Ac. Alfa-Linolenico
- DHA:** Ac. Docosaesaenoico
- DPA:** Ac. Docosapentaenoico
- EPA:** Ac. Eicosapentaenoico
- FFA:** Free Fatty Acids (Acidi Grassi Liberi)
- EE:** Etil Esteri
- FO:** Fish Oil
- LC:** Long Chain
- LDL:** Low Density Lipoprotein
- MCV:** Malattie Cardiovascolari
- PPAR:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
- PUFA:** Polyunsaturated Fatty Acid (Ac. Grasso Polinsaturo)
- rTG:** Trigliceridi Riesterificati
- SREBP-1c:** Sterol Regulator Element-Binding Protein-1c
- VLDL:** Very Low Density Lipoprotein

RIASSUNTO

Gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena derivati dal pesce (LC n-3 PUFA: ac. eicosapentaenoico, EPA, e ac. docosaesaenoico, DPA) sono stati ampiamente studiati nell'uomo sia come integrazione di olio di pesce/consigli dietetici, così come etil-esteri o trigliceridi riesterificati. Si tratta di una famiglia di sostanze biologicamente attive, promettenti nel campo della prevenzione cardiovascolare (CV). Le loro molteplici azioni sembrano coinvolgere numerosi meccanismi:

- 1) attraverso recettori o sensori, regolando in tal modo processi di segnalazione che influenzano le modalità di espressione genica;
- 2) modificando la composizione in ac. grassi delle membrane cellulari, alterandone la funzionalità e la produzione di lipid-raft o di mediatori lipici o proteici intracellulari;
- 3) agendo direttamente (sotto forma di ac. grassi liberi) sulla regolazione di alcuni flussi ionici transmembrana o attraverso la formazione di eicosanoidi particolari o di alcune nuove molecole (resolvine e protettine) capaci di "spegnere" la reazione infiammatoria.

Numerosi trial clinici controllati hanno recentemente fornito ampie informazioni sulle conseguenze del trattamento con queste sostanze in ambito di prevenzione CV primaria e secondaria. Anche se l'utilizzo di LC n-3 PUFA sembrano esercitare effetti in qualche modo favorevoli (riduzione della trigliceridemia, azione antiaritmica, ...), esso non permette di cogliere complessivamente una riduzione significativa del tasso di mortalità o eventi cardiovascolari. Solo alcuni trial (condotti in pazienti con scompenso cardiaco o entro alcuni mesi da un infarto miocardico) hanno osservato una riduzione nell'ambito di endpoint cardiovascolari selezionati (in particolare della morte improvvisa). Analogamente le metanalisi di questi studi non hanno consentito un ulteriore approfondimento dei potenziali benefici, e sono state criticate a causa delle loro molteplici limitazioni.

In conclusione, mentre l'Agenzia regolatoria italiana (AIFA) ha fissato la rimborsabilità dei LC n-3 PUFA solamente in pochi casi, concordemente alle evidenze disponibili, si deve riconoscere come tali farmaci/integratori necessitino di ulteriori indagini per valutarne l'utilizzo potenziale in ambiti di specifici pazienti o malattie, effettuando nel contempo una doverosa analisi di costo/efficacia.

Parole chiave: *Acidi grassi polinsaturi n-3, olio di pesce, Indice omega-3, prevenzione cardiovascolare, aterosclerosi.*

Bibliografia

1. Dyerberg J, Bang HO, Hjørne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr.* 1975; 28: 958-66.
2. Bang HO, Dyerberg J, Hjørne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand.* 1976; 200: 69-73.
3. Mori TA, Beilin LJ. Long-chain omega-3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction. *Curr Opin Lipidol.* 2001; 12: 11-7.
4. Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 2010; 21: 781-92.
5. Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 58: 2047-67.
6. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol.* 2010; 177: 1576-91.
7. Weylandt KH, Chiu C-Y, Gomolka B, et al. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvins and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2012; 97: 73-82.
8. Marcon R, Bento AF, Dutra RC, et al. Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, exerts protective actions in murine models of colitis. *J Immunol.* 2013; 191: 4288-98.
9. Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56: 1073-80.
10. De Caterina R. n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2011; 364: 2439-50.
11. Wang Q, Liang X, Wang L, et al. Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis.* 2012; 221: 536-43.
12. Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3

- polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation*. 2003; 107: 2646-52.
13. Task Force for the management of dyslipidaemias. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis*. 2011; 217: S1-44.
 14. Dyerberg J, Madsen P, Møller JM, et al. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010; 83: 137-41.
 15. Maki KC, Orloff DG, Nicholls SJ, et al. A highly bioavailable omega-3 free fatty acid formulation improves the cardiovascular risk profile in high-risk, statin-treated patients with residual hypertriglyceridemia (the ESPRIT trial). *Clin Ther*. 2013; 35: 1400-11.
 16. Offman E, Marenco T, Ferber S, et al. Steady-state bioavailability of prescription omega-3 on a low-fat diet is significantly improved with a free fatty acid formulation compared with an ethyl ester formulation: the ECLIPSE II study. *Vasc Health Risk Manag*. 2013; 9: 563-73.
 17. Schuchardt JP, Schneider I, Meyer H, et al. Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations - a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids Health Dis*. 2011; 10: 145.
 18. Davidson MH, King D, Maki MC. Novel developments in omega-3 fatty acid-based strategies. *Curr Opin Lipidol*. 2011; 22: 437-44.
 19. Harris WS, Mozaffarian D, Lefevre M, et al. Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *J Nutr*. 2009; 139: 804S-19S.
 20. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*. 1989; 2: 757-61.
 21. Burr ML. Secondary prevention of CHD in UK men: the Diet and Reinfarction Trial and its sequel. *Proc Nutr Soc*. 2007; 66: 9-15.
 22. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. 1999; 354: 447-55.
 23. Rauch B, Schiele R, Schneider S, et al. OMEGA-3, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction. *Circulation*. 2010; 122: 2152-9.
 24. Galan P, Kesse-Guyot E, Czernichow S, et al. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial. *BMJ*. 2010; 341: c6273.
 25. Kromhout D, Giltay EJ, Geleijnse JM, et al. n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2010; 363: 2015-26.
 26. Kromhout D, Geleijnse JM, de Goede J, et al. n-3 fatty acids, ventricular arrhythmia-related events, and fatal myocardial infarction in post-myocardial infarction patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34: 2515-20.
 27. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*. 2007; 369: 1090-8.
 28. Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008; 372: 1223-30.
 29. Bosch J, Gerstein HC, Dagenais GR, et al. n-3 fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia. *N Engl J Med*. 2012; 367: 309-18.
 30. Roncaglioni MC, Tombesi M, Avanzini F, et al. n-3 fatty acids in patients with multiple cardiovascular risk factors. *N Engl J Med*. 2013; 368: 1800-8.
 31. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F. Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. *Br J Nutr*. 2012; 107: S201-13.
 32. Kwak SM, Myung SK, Lee YJ, Seo HG; Korean Meta-analysis Study Group. Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Arch Intern Med*. 2012; 172: 686-94.
 33. Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, et al. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2012; 308: 1024-33.
 34. Harris WS. Are n-3 fatty acids still cardiopro-

- tective? *Curr Opin Nutr Metab Care*. 2013; 16: 141-9.
35. Pase MP, Grima NA, Sarris J. Do long-chain n-3 fatty acids reduce arterial stiffness? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr*. 2011; 106: 974-80.
36. Gao LG, Cao J, Mao QX, et al. Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acid-supplementation on platelet aggregation in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis*. 2013; 226: 328-34.
37. Han SH, Oh PC, Lim S, et al. Comparative cardiometabolic effects of fibrates and omega-3 fatty acids. *Int J Cardiol*. 2013; 167: 2404-11.
38. Pirillo A, Catapano AL. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of hypertriglyceridaemia. *Int J Cardiol*. 2013; 170: S16-20.
39. Marchioli R, Levantesi G. n-3 PUFAs and heart failure. *Int J Cardiol*. 2013; 170: S28-32.
40. Tang WHW, Samara MA. Polyunsaturated fatty acids in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57: 880-3.
41. Mozaffarian D1, Marchioli R, Macchia A, et al. Fish oil and postoperative atrial fibrillation: the Omega-3 Fatty Acids for Prevention of Post-operative Atrial Fibrillation (OPERA) randomized trial. *JAMA*. 2012; 308: 2001-11.
42. Calò L, Martino A, Tota C. The anti-arrhythmic effects of n-3 PUFAs. *Int J Cardiol*. 2013; 170: S21-7.
43. Brouwer IA, Raitt MH, Dullemeyer C, et al. Effect of fish oil on ventricular tachyarrhythmia in three studies in patients with implantable cardioverter defibrillators. *Eur Heart J*. 2009; 30: 8206.
44. Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health. Evaluating the risks and the benefits. *JAMA*. 2006; 296: 1885-99.