

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

## SCUOLA DI SCIENZE MFN

Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA SPERIMENTALE ED APPLICATA**  
Curricula Alimenti e Nutrizione



**Studio di fattibilità e sicurezza di cicli di regime dietetico ipoproteico per  
il trattamento di Mild Cognitive Impairment e malattia di Alzheimer**

Relatore:  
Prof. Alessio Nencioni

Candidato:  
Dott. Luca Rolla

Correlatore:  
Dott.ssa Anna Laura Cremonini

## Sommario

Abstract .....	2
Introduzione .....	2
Quantità nell'alimentazione .....	4
Restrizione calorica (CR) .....	5
Digiuno .....	5
Il Digiuno Intermittente .....	5
Qualità dell'alimentazione .....	6
Dieta Mediterranea .....	7
DASH Diet .....	7
MIND Diet .....	8
Dieta chetogenica (KD) .....	8
Mild Cognitive Impairment (MCI) e Malattia di Alzheimer (AD) .....	9
Meccanismi alla base di un potenziale collegamento tra dieta e salute del cervello .....	11
Disfunzioni neurovascolari .....	11
Stress ossidativo .....	11
Neuroinfiammazione .....	12
Disbiosi del microbiota intestinale .....	12
Neurogenesi ippocampale adulta .....	13
Strategie dietetiche per la prevenzione ed il trattamento del decadimento cognitivo .....	14
Risposte cellulari e sistemiche al digiuno .....	15
Potenzialità del digiuno intermittente nel decadimento cognitiv .....	17
Protocollo e obiettivi della ricerca .....	20
Endpoint primario dello studio .....	20
Endpoint secondari .....	21
Materiali e Metodi .....	21
Arruolamento .....	21
Criteri di inclusione .....	21
Criteri di esclusione .....	21
Disegno sperimentale e modalità di somministrazione .....	21
Dettaglio della dieta ProlonAD™ .....	24
Supplementi forniti nel kit "S" (braccio sperimentale) .....	27
Dettaglio dieta placebo .....	30
Valutazione dello stato nutrizionale .....	33
Analisi biochimiche .....	35
Valutazione dello stato emotivo, cognitivo e funzionale .....	35
Analisi statistiche .....	35
Risultati e discussione .....	35
Caratteristiche dei pazienti .....	36
Endpoint primario: fattibilità .....	36
Endpoint primario: sicurezza .....	37
Analisi degli eventi avversi .....	37
Analisi dello stato nutrizionale .....	38
Endpoint secondari .....	38
Conclusioni e prospettive .....	39

## Abstract

Mild Cognitive Impairment (MCI), in italiano *compromissione cognitiva lieve*, è una condizione diagnosticata agli individui con deficit cognitivi maggiori rispetto a quelli statisticamente attesi per la loro età e istruzione, ma che non interferiscono significativamente con le loro attività giornaliere.<sup>1</sup> Quando la perdita di memoria diventa il sintomo predominante, la MCI si definisce di tipo "amnestico" (a-MCI), la quale viene indicata frequentemente come un fattore di rischio per la malattia di Alzheimer<sup>2</sup>. Il presente studio clinico randomizzato di fase I/II ha inteso verificare fattibilità e sicurezza di cicli di una dieta ipoproteica e moderatamente ipocalorica comparata a dieta placebo in una coorte di 40 pazienti affetti da a-MCI o malattia di Alzheimer in stadio iniziale. Come obiettivo secondario è stata valutata l'efficacia di tale dieta nel rallentare la progressione della malattia.

## Introduzione

Negli ultimi decenni si è andata sviluppando una ampia ricerca multidisciplinare incentrata sulla correlazione tra alimentazione, salute e benessere<sup>3</sup>. Significativamente una semplice ricerca su PubMed su "*nutrition AND wellness*" restituiva 100 risultati nel 1963, oltre 39.000 nel 2022.

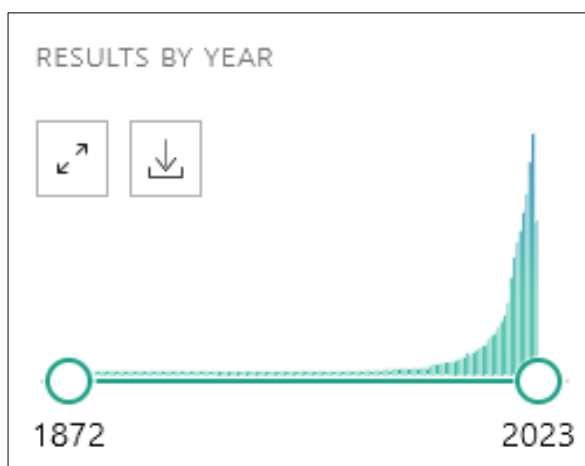


Grafico dei risultati negli anni su PubMed per la stringa di ricerca "nutrition AND wellness".

Quella che è dai tempi di Ippocrate una ovvia associazione tra vita sana, alimentazione e esercizio fisico, ha assunto un ruolo sempre più centrale nella odierna cosiddetta civiltà del benessere (purtroppo non esaustiva dell'intera popolazione mondiale) dove alla necessità del procacciamento del cibo che ha orientato le

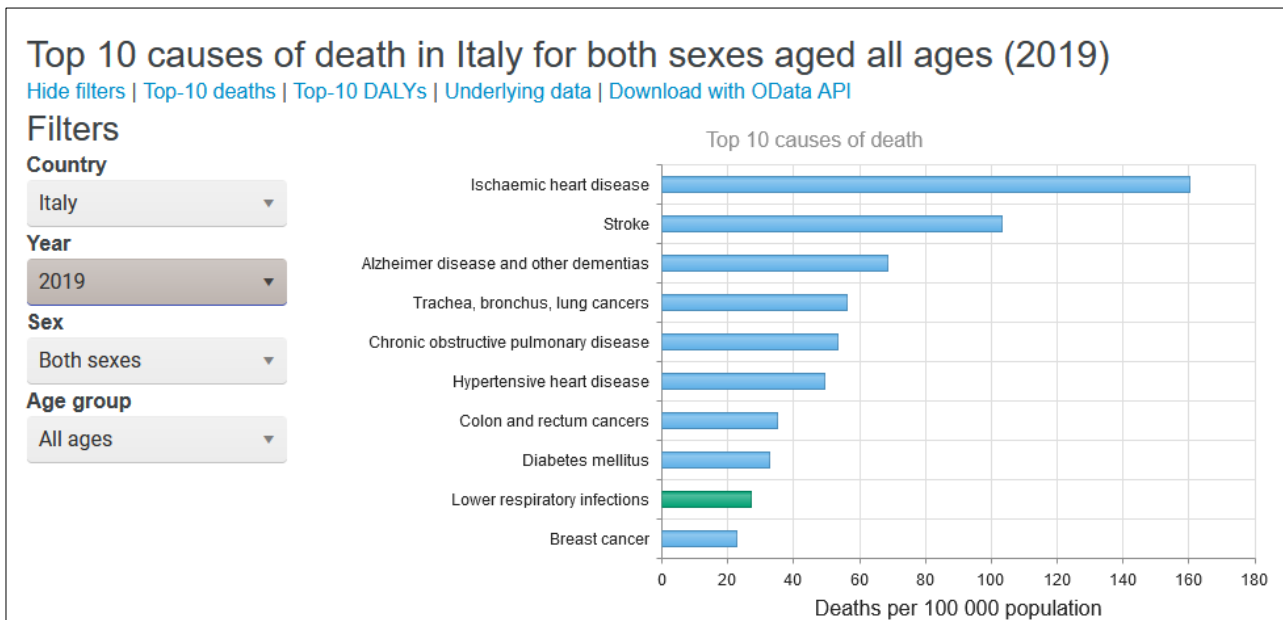
scelte alimentari dell'uomo per millenni si va sostituendo una sensibilità maggiormente focalizzata sulla *qualità* dell'alimentazione.

È sempre più chiaro infatti che la qualità di quello che mangiamo, beviamo e respiriamo è in certa buona parte responsabile dell'aumento esponenziale negli ultimi decenni di diverse patologie umane un tempo rare. Insieme all'allungamento della vita media, che è a sua volta correlato con quantità e qualità dell'alimentazione, questi fattori stanno plasmando un approccio ai concetti di *Wellness*, definita dall'OMS come "*uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale e non semplicemente l'assenza di malattia o infermità*" e *Successful aging*<sup>4</sup>, che suggerisce come una maggiore attenzione a ciò con cui ci alimentiamo nel corso dei diversi stadi della vita potrebbe fare la differenza nella prevenzione di diverse patologie, e nella qualità dell'invecchiamento in popolazioni in cui la longevità è un parametro in costante crescita.

La buona notizia è, appunto, che sulle abitudini alimentari è possibile intervenire con adeguate misure di prevenzione, peraltro a costo zero per la sanità, semplicemente creando una cultura diffusa sulle buone pratiche da seguire per godere di una vita più sana e longeva.

È indubbio che le modificazioni nelle abitudini alimentari di queste popolazioni abbiano subito un tale mutamento, sia nella quantità che nella qualità dei cibi consumati, e in un lasso di tempo talmente breve su scala evolutiva, da portare le patologie che è possibile almeno in parte

ricondere ad una alimentazione scorretta al livello di vera e propria emergenza sanitaria. Patologie del metabolismo un tempo relativamente rare sono oggi, insieme alle loro complicanze cardiovascolari, tra le prime cause di morte in tutti i paesi maggiormente sviluppati.



WHO, Global Health Observatory- Principali cause di morte in Italia nel 2019.

<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>

Nei tempi recenti è dunque avvenuta una letterale ridefinizione del significato di “malnutrizione”, modificandone il significato da quello originario di “carenza di nutrizione” all’attuale di “carente qualità dell’alimentazione”.

Oggi una nutrizione errata (tabella rischi origine alimentare) è riconosciuta tra le prime cause di rischio di tutte le patologie croniche a sviluppo lento e progressivo quali malattie cardiovascolari, tumori, diabete.

Non stupisce dunque il crescere dell’interesse multidisciplinare nei confronti dell’alimentazione degli ultimi decenni con studi che, partendo dallo studio delle diete per la cura della obesità si sono via via evolute verso un aspetto più olistico integrando la cura dell’aspetto estetico, esteriore della persona, in un più completo concetto di *wellness*, alla più recente frontiera delle diete “anti-aging” che promettono di vivere non solo meglio ma più a lungo e in salute.

Un filone parallelo dell’interesse scientifico sull’alimentazione ha interessato più nello specifico diverse patologie croniche nel tentativo di abbinare alle terapie farmacologiche diete appositamente

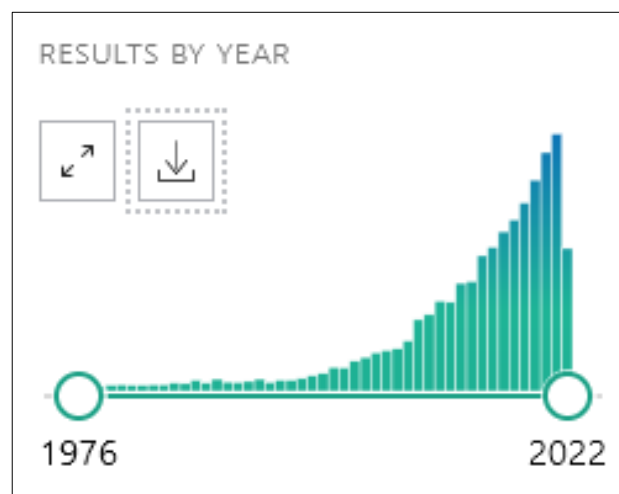


Grafico dei risultati negli anni su PubMed per la stringa di ricerca “alzheimer AND diet”.

calibrate in ottica sia curativa che preventiva <sup>5</sup>, dalla Sclerosi Multipla <sup>6</sup>, all'Alzheimer <sup>7</sup>, dal cancro <sup>8</sup> alla sindrome metabolica <sup>9</sup>.

Dalla evidente interazione tra dieta e malattie metaboliche si è rapidamente passati allo studio delle possibili implicazioni con patologie tumorali o neurodegenerative, ipotizzando in taluni casi che il rapido e costante aumento di tali patologie negli ultimi decenni possa trovare una significativa correlazione nel contestuale drastico mutamento delle abitudini alimentari di larghe fasce della popolazione.

Anche in questo caso i grafici di PubMed rendono idea della crescita esponenziale dell'interesse del mondo scientifico negli anni intorno a queste tematiche.

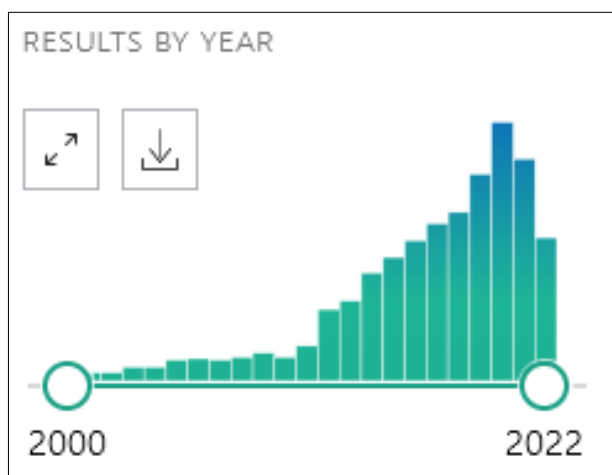


Grafico dei risultati degli ultimi 20 anni su PubMed per la stringa di ricerca "cancer AND diet".

## Quantità nell'alimentazione

Ogni dieta alimentare può essere variata intorno a numerosi parametri, due dei quali fondamentali ai fini della nostra trattazione: quantità di calorie assunte e qualità delle stesse.

Il calcolo del metabolismo basale (BMR) per una persona in buona salute viene determinato utilizzando diverse formule in base a parametri quali peso, età, altezza e sesso <sup>10,11</sup>. Applicando al valore di BMR ottenuto il tasso di attività fisica praticata dal soggetto si ottiene quello che possiamo considerare il fabbisogno energetico giornaliero di un particolare individuo

(TDEE, Total Daily Energy Expenditure) che, per semplicità di trattazione, possiamo approssimare a 2.000 kcal per un adulto con attività fisica moderata. Riducendo la quantità di calorie giornaliere assunte al di sotto del valore di TDEE individuato, il nostro organismo attinge ad un vero e proprio sistema tampone costituito da una scorta di glucosio immagazzinato sotto forma di glicogeno muscolare ed epatico che permette una autonomia di 12-18 ore in caso di digiuno completo. Esaurita questa piccola riserva e nel perdurare dello stato di carenza di alimentazione, possono essere attivati ulteriori meccanismi fisiologici (ovvero altri sistemi tampone) che consentono di mantenere per un tempo maggiore un livello di glicemia ematica in grado di soddisfare, in primis, la richiesta di cervello, midollare del surrene e eritrociti, che utilizzano il glucosio come fonte elettiva di energia.

L'accesso a riserve energetiche diverse dal glicogeno è il motivo per cui ogni dieta ipocalorica (soprattutto diete che restringano significativamente l'apporto calorico) risultano, nel breve termine, intrinsecamente chetogeniche (l'esatto meccanismo verrà approfondito più avanti).

E' importante sottolineare come, da un punto di vista strettamente evoluzionistico, gli esseri umani siano molto meglio adattati ad una alimentazione carente, al limite inframmezzata da periodi di digiuno, piuttosto che a un eccesso di alimentazione. Poiché *pathway* metabolici adattati in decine di migliaia di anni non possono cambiare con la stessa rapidità con cui abbiamo modificato le nostre abitudini alimentari, in particolare dal secondo dopoguerra ad oggi, l'assunzione di una corretta quantità giornaliera di cibo è dunque, piuttosto intuitivamente, il primo indispensabile passo verso una alimentazione sana <sup>12</sup>.

Se l'assunzione di cibo in quantità superiore alla necessità porta all'accumulo di grasso corporeo ed è la prima causa ormai appurata dell'innescare di patologie metaboliche, all'opposto è esperienza

comune come, in caso di una patologia acuta, il primo meccanismo messo in atto in maniera completamente automatica dal nostro organismo sia il digiuno. Ai primi sintomi di malessere si associa sistematicamente l'inappetenza: dunque è intuitivamente la stessa saggezza del nostro organismo a suggerire una "modalità digiuno" per attrezzarci al meglio nei confronti della malattia.

A partire da questa semplice considerazione di senso comune, numerosi studi sono stati e sono a tutt'oggi dedicati ad indagare i meccanismi molecolari mediante i quali il digiuno è effettivamente in grado di aiutarci nei confronti della malattia e se esso non sia applicabile proficuamente anche nella lotta alle patologie croniche, specie quelle lentamente progressive che tipicamente non inducono la risposta adattativa promuovente il digiuno.

E' dunque opportuno a questo punto definire meglio il termine "digiuno", declinandolo in alcune delle sue molteplici possibilità di esecuzione.

### **Restrizione calorica (CR)**

Sebbene la restrizione calorica cronica sia tecnicamente diversa dal digiuno periodico<sup>13</sup>, si vuole qui sottolineare il comune focus sugli effetti della restrizione alimentare in termini di "quantità" piuttosto che di "qualità" dei nutrienti.

La CR è un regime alimentare che prevede la riduzione dell'apporto di calorie al di sotto del fabbisogno energetico<sup>14, 15</sup>. Il taglio delle calorie può variare in un *range* piuttosto ampio, che può andare dal 20% al 40%. È però importante sottolineare che le diete a restrizione calorica vengono calibrate in modo da non causare malnutrizione, ovvero che l'apporto di vitamine, acidi grassi e amminoacidi essenziali, minerali ed acqua viene mantenuto a livelli tali da soddisfare i fabbisogni dell'organismo.

### **Digiuno**

Letteralmente per digiuno si intende l'astinenza da tutti gli alimenti, solidi o liquidi, acqua compresa. Talvolta, come nel

*Water fasting*<sup>16</sup>, si riferisce alla sola esclusione dei cibi. Diversi studi indicano che, al fine di ottenere effetti clinicamente significativi, la durata del digiuno deve essere di almeno 48 ore<sup>17</sup>, tuttavia, la maggior parte dei pazienti rifiuta o ha difficoltà a completare un digiuno integrale, e i potenziali rischi legati alla carenza calorica e di micronutrienti ad esso associati sono difficili da giustificare. Per ovviare le difficoltà di esecuzione e ridurre gli effetti collaterali di un regime di digiuno ad acqua nascono pertanto diverse diete alternative che implicano cicli di digiuno, o di parziale digiuno, alternati a periodi di alimentazione normale, il cosiddetto *digiuno intermittente*.

La ricerca scientifica sugli effetti biomedici del digiuno è stata condotta a partire dalla fine del XIX secolo, su diversi esseri umani normopeso sottoposti ad un digiuno di 20-40 giorni<sup>18</sup>. Il primo studio clinico del digiuno medico per il trattamento dell'obesità fu eseguito invece nel 1915<sup>19</sup>. Oggi sappiamo che il digiuno promuove la chetogenesi e importanti cambiamenti nei pathway metabolici e nei processi cellulari come la resistenza allo stress, lipolisi ed autofagia e può dunque avere importanti applicazioni in campo medico<sup>20</sup>.

I principali benefici osservati in seguito ad un periodo di digiuno correlano con una riduzione dei fattori di rischio cardiovascolare, come la diminuzione della pressione sanguigna, il miglioramento del profilo lipidico e della sensibilità all'insulina e la perdita di peso nei soggetti obesi e non obesi<sup>21</sup>. La perdita di peso durante un breve periodo di digiuno è di circa 0,9 kg al giorno e diminuisce durante il digiuno prolungato fino a 0,3 kg al giorno entro la terza settimana<sup>18</sup>.

### **Il Digiuno Intermittente**

Il digiuno intermittente<sup>22</sup> implica, in maniera abbastanza intuitiva, una alternanza ciclica tra fasi di alimentazione e digiuno e comprende svariate modalità applicative. È pressoché impossibile stilare un elenco completo, anche perché ogni autore tende a denominare o interpretare una modalità differentemente.

Alcuni ad esempio per **Intermittent Fasting (IF)** intendono esclusivamente una modalità che alterna cicli di 24 ore di digiuno distanziati da uno a pochi giorni mentre con **Periodic Fasting (PF)** si riferiscono a cicli di due o più giorni intervallati da una, massimo due settimane<sup>20</sup> ma, di nuovo, queste non sono regole scritte e non c'è alcuna garanzia che i diversi autori vi si attengano scrupolosamente.

**Meal skipping:**<sup>23, 24</sup> 16 ore di digiuno si alternano ad una finestra di alimentazione di 8 ore. Per esempio dalle 8 alle 16 saltando la cena, oppure dalle 19 alle 11 saltando la colazione.

**Alternate-Day fasting:**<sup>25, 26, 27, 28</sup> ci si alimenta e digiuna a giorni alterni.

**Fat Fasting** (Dieta chetogenica): in realtà "mimare" un digiuno dovrebbe sottintendere unicamente una riduzione quantitativa del normale introito delle calorie nel tempo, mentre nella Fat Fasting Diet il focus non è sul ridotto apporto calorico quanto piuttosto sul forte squilibrio nel rapporto tra grassi e carboidrati assunti<sup>29, 30</sup>.

**5:2 Diet:**<sup>31, 32</sup> 5 giorni di alimentazione alternate a 2 di digiuno ad acqua o ridotto apporto calorico. Anche questa è tipicamente una dieta a ridotto contenuto di carboidrati, comunque chetogenica.

**Time-restricted Feeding:**<sup>33</sup> è una dieta caratterizzata da una finestra di alimentazione di durata variabile, da 2-3 a non più di 12 ore e digiuno totale per le restanti, senza restrizione calorica.

**Digiuno modificato:** di nuovo, la mancanza di un consenso standardizzato tra gli addetti ai lavori apporta qualche confusione nella terminologia. Tuttavia alcuni autori intendono con questa modalità una specifica modalità di digiuno intermittente caratterizzata da cicli ripetuti a distanza variabile della durata da 3 a 7 giorni, di un regime a base vegetale, povero in proteine e glucidi e variamente ipocalorico<sup>138, 34</sup>. Rientrano in questa categoria i kit della L-Nutra fondati dal Prof. Valter D. Longo della University of Southern California chiamati "dieta mima digiuno" (Fasting-mimicking Diet FMD).

Nei soggetti sani, un breve periodo di digiuno ottenuto tramite 3 cicli di 5 giorni di FMD, è risultata ben tollerata e ha ridotto i comuni fattori di rischio per le malattie cardiovascolari, il diabete e l'invecchiamento, come l'abbassamento della pressione sanguigna, il peso corporeo, il glucosio, i trigliceridi e il colesterolo<sup>35</sup>.

In qualunque forma si vogliano effettuare, i regimi di digiuno modificato sono dunque (o dovrebbero esserlo) diete elaborate da esperti nutrizionisti appositamente per ottenere gli effetti potenzialmente benefici del digiuno sul metabolismo, a cui abbiamo accennato e che approfondiremo nelle pagine seguenti, riducendo i rischi nutrizionali e migliorando la *compliance* dei soggetti, senza incorrere nella maggior parte di quelli negativi. Queste diete intese a "mimare" il digiuno sono dunque diete basate su diverse modalità di digiuno intermittente, da mediamente a fortemente ipocaloriche, con una riduzione tipicamente compresa tra 300 e 1.100 kcal al giorno e, tipicamente, con ridotto apporto di proteine e di zuccheri semplici. Acqua e tisane sono consentite in libera quantità.

La dieta utilizzata nel trial clinico oggetto di questa trattazione, è una FMD della ditta L-Nutra consistente nell'effettuazione di cicli di 5-7 giorni di dieta alternati a 3-4 settimane di recupero mediante dieta abituale, ed è una dieta solo moderatamente ipocalorica ma decisamente ipoproteica e con supplementazione di acidi grassi mono e polinsaturi, pertanto rientra a pieno titolo tra le diete almeno parzialmente chetogeniche, i cui effetti sulla fisiologia umana verranno trattati in dettaglio più avanti.

## Qualità dell'alimentazione

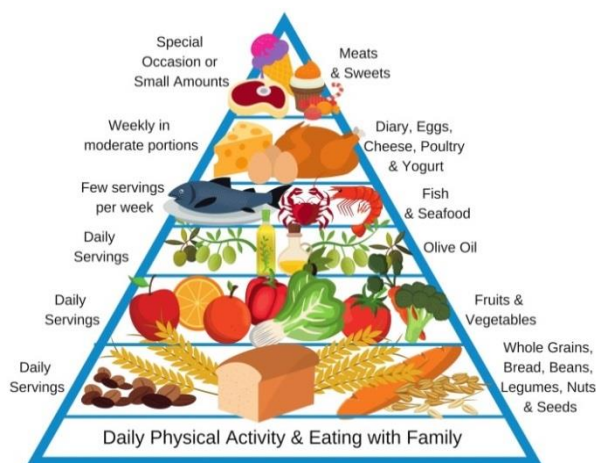
Così come per la quantità, l'alimentazione può essere altresì variata, in misura almeno altrettanto notevole, per quanto riguarda gli aspetti qualitativi della sua composizione. In questo caso gli studi si focalizzano pertanto sui diversi rapporti tra i macronutrienti assunti nonché sulle singolari proprietà di specifici micronutrienti



e l'opportunità di supplementare quindi una dieta originariamente equilibrata con nutraceutici, (integratori o alimenti fortificati) con l'intento di aumentare l'assunzione di alcuni nutrienti in una determinata popolazione.

Si tratta di un capitolo, come è facile intuire, estremamente complesso, sul quale esistono e si continuano a sviluppare innumerevoli studi, talvolta ancora contraddittori, con però alcuni punti su cui diverse ricerche di carattere epidemiologico concordano in gran parte: alcune diete promuovono longevità e benessere, al contrario di altre che favoriscono patologie metaboliche direttamente responsabili di diminuzione della longevità e della salute in generale. All'interno di questi due estremi volutamente molto generici, l'odierna scienza della nutrizione si muove cercando di stabilire quali alimenti e in quali proporzioni possano garantire le migliori aspettative di longevità e benessere per i soggetti in buona salute, e quali e in quale quantità possano essere di beneficio per la cura delle più svariate patologie quando abbinate alle terapie farmacologiche tradizionali.

Innumerevoli diete sono state sviluppate negli ultimi decenni nel tentativo di individuare la migliore dieta alimentare possibile per un soggetto in salute, ed esiste una sostanziale accordo che la Dieta Mediterranea rappresenti un punto di riferimento unanimemente riconosciuto in tal senso <sup>36</sup>.



### MEDITERRANEAN DIET

La quantità di porzioni raccomandate per i diversi cibi è convenientemente rappresentata come una piramide alimentare

### Dieta Mediterranea

Dalla sua prima definizione data da Ancel Keys negli anni '50 la Dieta Mediterranea (MedDiet) si è evoluta nel tempo in numerose varianti pur senza abbandonare i principi che la identificano e si rifanno, appunto, alla dieta mediterranea che Keys aveva avuto modo di apprezzare a Roma in occasione del primo "Convegno sull'Alimentazione, affascinato dal dato della bassa incidenza di patologie cardiovascolari e di disturbi gastrointestinali della regione Campania e dell'isola di Creta. La MedDiet è caratterizzata da un consumo elevato di olio extra-vergine di oliva, verdura, frutta, cereali integrali, noci e legumi, consumo moderato di pesce, carni bianche, prodotti caseari e vino rosso, basso consumo di carni rosse o processate e dolci. La proporzione suggerita tra i diversi macronutrienti è, all'incirca 50-55% carboidrati, 30-35% grassi, 15% proteine.

***“Fa che il Cibo sia la tua Medicina e che la Medicina sia il tuo Cibo”***

*Ippocrate*

A partire dalla comprensione degli effetti benefici di una dieta alimentare sana ed equilibrata su diverse popolazioni, la ricerca si è presto estesa allo studio dei meccanismi metabolici dei singoli nutrienti e dei potenziali benefici di diete appositamente adattate ad affiancare le terapie per la cura di diverse.

### DASH Diet

La dieta DASH (*Dietary Approach for Stopping Hypertension*) <sup>37</sup> è stata sviluppata per identificare i fattori alimentari in grado di incidere sulla pressione sanguigna. Si tratta di una dieta ricca in frutta, verdura, noci, cereali integrali, prodotti caseari a basso contenuto di grassi, pesce e pollame, tutti alimenti ricchi di nutrienti in grado di abbassare la pressione come potassio, calcio, alimenti proteici poveri di grassi e colesterolo, minerali e fibre. La dieta DASH inoltre scoraggia l'assunzione di carni rosse e processate (insaccati), prodotti caseari da latte intero, oli tropicali, dolci e bevande zuccherate <sup>38</sup>. I nutrienti cui si ispira la dieta DASH, progettata per



essere bassa in contenuto di sodio, colesterolo, grassi totali e saturi coincidono sostanzialmente con quelli della MeDi, variando solo alcune porzioni.

### **MIND Diet**

Anche la *Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay*, sviluppata di recente, nasce come dieta ibrido della Mediterranea e della DASH. È basata su 10 cibi ritenuti salutari per il cervello (verdure a foglia verde, altre verdure, olio di oliva, noci, pollame, bacche, cereali integrali, fagioli, pesce e vino) e 5 da evitare in quanto ritenuti non salutari (carni rosse, burro e margarine, formaggio, paste da forno e dolci, fritto e fast food).

Rispetto alla MeDi la dieta MIND comporta un consumo inferiore di pesce, tipicamente una porzione alla settimana e promuove il consumo di bacche, rimarcandone l'importante attività antiossidante e antiinfiammatoria<sup>39, 40</sup>.

### **Dieta chetogenica (KD)**

Nei primi anni '20 del secolo scorso il medico statunitense Russell Wilder scrisse due lavori seminali sui risultati della sperimentazione di una dieta chetogenica nel trattamento dell'epilessia evidenziandone l'efficacia, paragonabile al digiuno, insieme alla possibilità di poter essere mantenuta ben più a lungo di questo<sup>41</sup>.

Negli anni 80 la sperimentazione della dieta chetogenica venne estesa positivamente alla cura dell'obesità<sup>42</sup>.

Come precedentemente accennato la chetogenesi avviene spontaneamente in qualunque dieta che preveda una restrizione calorica che vada ad esaurire le nostre riserve di glicogeno. Può altresì essere indotta o accelerata da diete appositamente calibrate.

Le diete chetogeniche (KD) sono tipicamente regimi dietetici con normale regime calorico, ma che presentano alto contenuto di grassi e basso contenuto di carboidrati. In una KD classica, il rapporto tra il peso dei grassi e il peso combinato di carboidrati e di proteine è di 4:1.

La importante riduzione dei carboidrati assunti con l'alimentazione, costringe l'organismo a produrre autonomamente il glucosio necessario alla sopravvivenza aumentando il consumo energetico dei grassi contenuti nel tessuto adiposo. Quando la produzione di acetyl-CoA tramite lipolisi eccede la capacità di assorbimento dell'ossalacetato, avviene la formazione dei cosiddetti corpi chetonici. Da notare che un loro aumento indiscriminato abbassa il pH sanguigno portando alla chetoacidosi (tipica dei diabetici non trattati) e, in casi estremi, a coma e morte.

Diete chetogeniche come la FMD utilizzata nel presente trial sono in grado di indurre sostanziali aumenti ( $\geq 0,5$  mmol per litro) nei livelli di corpi chetonici circolanti.

Negli esseri umani una KD può ridurre i livelli di IGF-1 e di insulina fino a più del 20% rispetto ai valori basali, anche se questi effetti sono influenzati dai livelli e dai tipi di carboidrati e proteine presenti nella dieta. Le KD possono inoltre ridurre i livelli di glucosio nel sangue, anche se normalmente questi rimangono all'interno del range di normalità ( $> 4,4$  mmol per litro)<sup>43</sup>. Per sua natura una dieta chetogenica risulta particolarmente efficace nel prevenire l'aumento della glicemia<sup>44</sup>.

### **Meccanismo molecolare della chetogenesi**

La chetogenesi è un pathway metabolico che produce corpi chetonici, i quali forniscono una fonte di energia alternativa per l'organismo. Il corpo umano produce in continuazione una piccola quantità di corpi chetonici che aumenta durante gli stati di digiuno (anche durante quello notturno), regolati dalla produzione di insulina, e che tipicamente sono in grado di fornire 22 ATP ciascuno. In uno stato di chetosi tale produzione viene aumentata in caso di diminuzione di carboidrati o aumento di acidi grassi. Diversi organi e tessuti usano corpi chetonici come fonte di energia alternativa. Il cervello è in grado di utilizzarli quando il glucosio non è disponibile. Il cuore tipicamente utilizza acidi grassi come fonte di energia ma è in grado di utilizzare anche chetoni.

La chetogenesi ha luogo principalmente nei mitocondri degli epatociti. È importante sottolineare che, malgrado il fegato sia il sito primario di produzione dei chetoni, esso non è in grado di utilizzarli in quanto

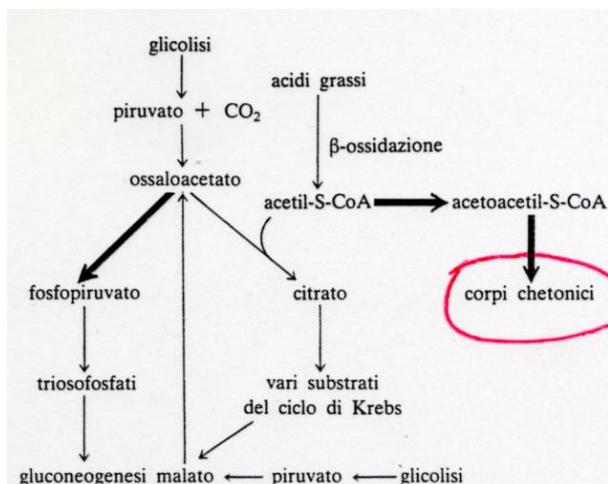


Fig 3. *Produzione di corpi chetonici negli epatociti.* La produzione e l'esportazione dei corpi chetonici consente di continuare l'ossidazione degli acidi grassi quando l'acetil-CoA non viene ossidato nel ciclo di Krebs. L'ossalacetato prende la via della gluconeogenesi e non è più disponibile per la sintesi di citrato. L'acetil-S-CoA proveniente dalla  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi prende allora la via della produzione di corpi chetonici. Le frecce grandi indicano le vie che aumentano di intensità nella chetosi.

manca del necessario enzima chetoacil-CoA transferasi. Quindi i corpi chetonici prodotti negli epatociti verranno immessi nel flusso ematico per raggiungere i loro organi bersaglio.

Gli acidi grassi mobilizzati dai depositi di grasso dell'organismo vengono trasportati all'interno dei mitocondri tramite il cosiddetto *Shuttle della carnitina* che consente l'attraversamento della membrana agli acidi grassi con 14 o più atomi di carbonio senza l'aiuto di trasportatori di membrana. Una volta all'interno del mitocondrio vengono scissi in acetil-CoA mediante  $\beta$ -ossidazione per essere infine convertiti in acetoacetato. L'acetoacetato può a sua volta essere convertito in acetone o  $\beta$ -idrossibutirrato.

Acetoacetato e  $\beta$ -idrossibutirrato sono i due corpi chetonici utilizzati dall'organismo per la produzione di energia; l'acetone viene invece escreto tramite urine o esalato tramite la respirazione.

Una volta raggiunti i tessuti extra-epatici il beta-idrossibutirrato viene riconvertito in acetoacetato, a sua volta riconvertito in

acetil-CoA per entrare nella fosforilazione ossidativa e produrre 22 ATP per molecola. Quando troppi corpi chetonici si accumulano si produce uno stato di chetoacidosi, uno stato patologico di produzione incontrollata di chetoni che porta all'acidosi metabolica e costituisce un'emergenza medica potenzialmente fatale. così come nel diabete non controllato. La chetogenesi può essere upregolata mediante ormoni quali glucagone, cortisolo, ormoni tiroidei e catecolamine, portando ad una aumentata scomposizione di acidi grassi liberi, ma il principale ormone in grado di regolarne il processo è l'insulina.

### Mild Cognitive Impairment (MCI) e Malattia di Alzheimer (AD)

Il deterioramento cognitivo che eccede il fisiologico declino associato all'invecchiamento può prendere la forma del deterioramento cognitivo lieve (Mild Cognitive Impairment - MCI) o, nella sua forma più severa, della demenza<sup>45,46</sup>. A loro volta, i pazienti diagnosticati con MCI evolvono verso una franca demenza di Alzheimer<sup>47</sup> in una percentuale stimata nel 15%/anno.

La prevalenza del MCI è stimata essere del 2,4% tra i 60 ed i 65 anni, del 4,8% tra i 65 ed i 69 anni, e dell'8,4% tra i 70 ed i 76 anni<sup>48</sup>. Si tratta quindi di una condizione estremamente frequente e la cui prevalenza è stimata in ulteriore aumento nei prossimi anni e decenni, primariamente a causa dell'invecchiamento della nostra popolazione.

L'MCI può presentarsi nella forma di MCI amnestico (amnesic MCI, aMCI; di gran lunga il più comune) o di MCI non amnestico. Entrambe le forme possono essere a singolo o a multiplo dominio. L'aMCI è la forma che più frequentemente evolve in AD. Sebbene di minore impatto sulle capacità funzionali dell'individuo e sul suo contesto familiare e sociale rispetto alla demenza, l'aMCI può incidere comunque in maniera profonda sulla qualità di vita del paziente e genera ansia per il possibile ulteriore deterioramento delle funzioni cognitive e per la possibile

evoluzione in franca demenza. Recenti metanalisi dimostrano come non esista alcun trattamento o terapia che siano efficaci per l'aMCI<sup>49, 50</sup>.

La malattia di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa a decorso cronico e progressivo. È la causa più comune di demenza nella popolazione anziana dei Paesi sviluppati: attualmente si stima ne sia colpita circa il 5% della popolazione al di sopra dei 65 anni e circa il 20% degli ultra-85enni, anche se in diversi casi può manifestarsi anche un esordio precoce intorno ai 50 anni di vita. Si caratterizza per il progressivo deterioramento delle funzioni cognitive accompagnato da alterazioni nel comportamento, nella personalità e nella affettività della persona che ne viene colpita. La malattia di Alzheimer ha un'etiologia multifattoriale, ovvero, più fattori di natura diversa, che apparentemente non sono in diretto collegamento tra loro, concorrono ad innescare il processo degenerativo del cervello<sup>51, 52</sup>.

Dal punto di vista fisiopatologico, la malattia di Alzheimer si caratterizza principalmente per la presenza nel cervello di minuscole ma numerosissime placche del peptide beta-amiloide (A $\beta$ ) e grovigli neurofibrillari di proteina tau-iperfosforilata (p-tau). La proteina tau-iperfosforilata e la beta-amiloide (nello specifico la variante A $\beta$ <sub>42</sub>) sono proteine prodotte dal cervello che quest'ultimo non riesce più ad eliminare. Entrambe queste proteine quindi si accumulano e iniziano a danneggiare i neuroni (le cellule del nostro cervello) già molti anni prima che compaiano i disturbi di memoria. La morte cellulare ha inizio nella regione dell'ippocampo, che è primariamente coinvolto nei processi di apprendimento e di memoria.

Successivamente la morte cellulare si estende coinvolgendo l'intero cervello e comportando le ulteriori difficoltà cognitive e funzionali che si osservano nelle persone affette da Alzheimer.

Il meccanismo alla base della formazione delle placche amiloidi e dei grovigli neurofibrillari non è ancora del tutto noto<sup>53</sup>. Ciò che si sa è che comportano

danneggiamento e morte delle cellule cerebrali, provocando come conseguenza, le difficoltà di memoria ed alterazioni comportamentali. Ulteriori ipotesi includono la presenza di oligomeri di beta-amiloide i quali, come le placche amiloidi, sarebbero anch'essi potenzialmente neurotossici. Inoltre, l'anomalo rilascio di neurotrasmettitori, come il glutammato, contribuirebbe anch'esso a morte neuronale e processi infiammatori all'interno del cervello. Il processo neuro-infiammatorio risulta essere allo stesso modo coinvolto nella complessa cascata di processi che causano la malattia di Alzheimer e i successivi sintomi. Questo processo risulta essere quindi implicato sia nella patogenesi della malattia di Alzheimer che nella sua progressione<sup>75, 76</sup>.

Anche se nella pratica clinica ai pazienti con aMCI si usa prescrivere alte dosi di vitamine del gruppo B (ad es. acido folico, cianocobalamina, piridossina, etc.), non esistono studi che ne dimostrino con sufficiente forza l'efficacia<sup>50</sup>. Dal momento che l'aMCI rappresenta in alcuni pazienti una sindrome prodromica verso la AD clinicamente conclamata, i trattamenti proposti per la malattia di Alzheimer potrebbero in principio rivelarsi utili per una modesta percentuale di pazienti con aMCI e, di fatto, sono al momento l'unica terapia "sintomatica". Tuttavia, si sa già che, ad esempio, gli anticolinesterasici (rivastigmina, donepezil, galantamina) non sono capaci di arrestare o rallentare la progressione dell'aMCI verso AD<sup>54</sup>, apportando solo dei benefici minori a breve termine, che però possono essere associati a significativi effetti collaterali<sup>55</sup>. Nel complesso, quindi, l'individuazione di strategie per trattare l'aMCI e/o per ridurre il rischio di una sua progressione verso AD appare un'esigenza prioritaria<sup>46, 56, 50</sup>.

Negli ultimi vent'anni il trattamento farmacologico è basato su inibitori dell'acetilcolinesterasi e sulla memantina (un antagonista del glutammato) con risultati limitati<sup>57, 58</sup>. Più recentemente, i risultati di numerosi studi di fase III su approcci anti-amiloide in pazienti con AD moderata si sono dimostrati deludenti,

sollevando preoccupazioni sul potenziale ultimo di tali strategie e sottolineando l'enorme bisogno di nuovi tipi di trattamenti dai quali i pazienti possano trarre rapidamente beneficio<sup>58</sup>.

Tra i principali fattori di rischio per l'aMCI e per l'AD vi sono la predisposizione genetica (ad es. portatori dell'allele APOE ε4, particolarmente se omozigoti), fumo, fattori vascolari collegati a ipertensione e diabete, ipercolesterolemia, infiammazione cronica, depressione, sedentarietà, mancanza di stimoli intellettivi/sociali<sup>59</sup>, ma anche fattori ambientali come l'inquinamento.

## **Meccanismi alla base di un potenziale collegamento tra dieta e salute del cervello**

### ***Disfunzioni neurovascolari***

La regolazione del flusso cerebrale sanguigno è essenziale per un normale funzionamento del cervello, ed è appurato come la malattia di Alzheimer AD sia associata dagli esordi a disfunzione neurovascolare e danno a piccole arterie, arteriole e capillari del cervello per mezzo di *pathway* direttamente o indirettamente collegati alla proteina betamiloide<sup>38</sup>.

Queste modificazioni, insieme alla perdita di integrità della barriera ematoencefalica, giocano un ruolo nella patogenesi della malattia e portano a disfunzioni neuronali e sinaptiche, neurodegenerazione e danno cognitivo<sup>60, 61</sup>. Diversi studi hanno ampiamente dimostrato la correlazione tra danno vascolare e diete ricche di sali e lipidi<sup>62</sup>.

### ***Stress ossidativo***

Anche lo squilibrio tra produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e difese antiossidanti è stato dimostrato contribuire significativamente a patogenesi e progressione dell'Alzheimer, ed è noto essere associato a danno ossidativo di DNA, proteine e componenti lipidiche dei neuroni<sup>63</sup>. Diversi composti antiossidanti possono portare alla inibizione della apoptosi neuronale indotta da prodotti tossici come i ROS<sup>64</sup>.

A partire da queste considerazioni è possibile tracciare un collegamento con il potenziale ruolo preventivo e neuroprotettivo di diete come MeDi, DASH e MIND in quanto come abbiamo visto esse sono in grado di agire a livello sistemico riducendo fattori di rischio cardiovascolare come livelli lipidici, glicemia e pressione del sangue<sup>65, 66</sup>, oltre ad agire sulle funzioni dell'endotelio migliorando la perfusione dei tessuti grazie al contenuto di flavonoidi che potenziando l'attività dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) aumentano vasodilatazione e perfusione cerebrovascolare<sup>67</sup>. Queste diete sono tutte eccezionalmente ricche in alimenti dotanti di proprietà antiossidanti: verdure, agrumi, noci, vino rosso, bacche ed olio di olive forniscono grandi quantità di vitamine, polifenoli e carotenoidi in grado di prevenire e/o riparare danni causati dai radicali liberi come superossido e monossido di azoto e da citochine proinfiammatorie come IL-1β and TNF-α prodotte da cellule della microglia attivate in risposta al danno ossidativo.

L'olio extravergine di oliva (EVO), uno dei principali componenti della dieta Mediterranea e una delle sue principali fonti di lipidi, contiene principalmente acido oleico e, in misura minore, linoleico, così come centinaia di composti bioattivi come squalene e i suoi derivati triterpeni, biofenoli, pigmenti (carotenoidi, xantofille come la luteina), e vitamina E, i cui effetti benefici sono stati dimostrati in diversi studi<sup>68, 69</sup>.

I bassi livelli di polifenoli ossidati nell'EVO in plasma e tessuti possono attivare Nrf2, un fattore di trascrizione attivato in risposta a stress ossidativo in grado di indurre la trascrizione di regolare una serie di geni coinvolti nella risposta antiossidante e detossificante nel fegato legandosi agli ARE (Antioxidant Response Element)<sup>70</sup> oltre ad altre risposte adattative allo stress, portando alla upregolazione di enzimi detossificanti e antiossidanti endogeni rendendo in definitiva le cellule maggiormente protette nei confronti di stimoli ossidativi potenzialmente dannosi (ormesi)<sup>71</sup>.

## **Neuroinfiammazione**

Le cellule della microglia sono le prime e principali difese immunitarie del cervello. Se una corretta funzionalità della microglia è necessaria per ripulirlo da placche, molecole danneggiate e agenti infettivi, la iperattivazione della microglia è un segno caratteristico di neuroinfiammazione e uno dei principali attori nella patogenesi della AD <sup>72</sup> laddove l'eccessiva produzione e deposizione di proteina beta amiloide scatena una risposta immunitaria con conseguente produzione abnorme di ROS, citochine proinfiammatorie, secrezione di chemochine e degradazione di fattori neuroprotettivi come i retinoidi, coinvolti nella promozione della neurogenesi adulta nell'ippocampo <sup>73, 74</sup>. Questa risposta infiammatoria cronica contribuisce alla progressione della malattia sostenendo ulteriormente produzione e deposizione di A $\beta$  portando in definitiva a morte neuronale <sup>75, 76</sup>.

La dieta alimentare è notoriamente in grado di regolare il sistema immunitario, e una dieta salutare ricca in nutrienti e composti bioattivi dotati di proprietà antinfiammatorie ed antiossidanti può contribuire a contrastare il processo neuroinfiammatorio. Frutta, verdura, cereal integrali e altri vegetali forniscono un ampio spettro di fitocomposti, vitamine, minerali e fibre con ben appurate proprietà antiossidanti e antinfiammatorie.

Tra i fitocomposti troviamo l'acido ferulico, un antiossidante dotato di attività di scavenging di radicali liberi ma anche di proprietà anti-amiloidi documentate in diversi studi in vitro e vivo <sup>77, 78, 79, 80</sup>.

In modelli murini transgenici di AD un altro composto fenolico, il resveratrolo presente nel rivestimento di diverse specie vegetali edibili, come le more del gelso, uva, arachidi e melograni <sup>81</sup>.

Al resveratrolo sono state attribuite svariate proprietà: inibizione della sintesi di proteina Tau e placche di A $\beta$  <sup>82, 83</sup>, aumento dei livelli di SIRT-1 e inibizione della neuroinfiammazione <sup>84, 85</sup>.

Anche le lunghe catene di acidi grassi polinsaturi omega-3 sono importanti. L'acido Docoesanoico (DHA) e

Eicosapentanoico (EPA) sono presenti in abbondanza nei frutti di mare e nell'olio di pesce. Esperimenti in vitro hanno dimostrato come la somministrazione di EPA e/o DHA riduca l'espressione di fattori pro-infiammatori e promuova l'espressione di citochine antinfiammatorie <sup>38</sup>. Inoltre una dieta ricca di omega-3 ed omega-6 (PUFA) e acidi grassi monoinsaturi (MUFA) può influenzare fluidità di membrana e attività enzimatica nei neuroni, portando ad una potenziale modulazione delle strutture e funzioni cerebrali <sup>86</sup>.

## **Disbiosi del microbiota intestinale**

La disbiosi del microbiota intestinale gioca un importante ruolo nella salute umana. È stato appurato avere un ruolo di primo piano nella regolazione del sistema immunitario e degli stati infiammatori, ed è responsabile della produzione di numerose piccole molecole come vitamine e folati, amminoacidi ed acidi grassi a catena corta (SCFAs). Alcune delle sostanze bioattive prodotte sono trasportate nel sangue e possono attraversare la barriera emato-encefalica (BEE) influenzando il sistema nervoso centrale (CNS). In aggiunta il CNS comunica con l'intestino attraverso vie autonome efferenti modulando svariate funzioni dell'intestino come la permeabilità, la secrezione di muco, la motilità e l'immunità <sup>38</sup>. La comunicazione bidirezionale tra CNS e sistema gastrointestinale è denominata "asse intestino-cervello" <sup>87</sup>. La salute del microbiota è di fondamentale importanza per la metabolizzazione di nutrienti, come i polifenoli, che necessitano di essere trasformati per diventare composti attivi con effetti benefici sul cervello <sup>38</sup>. I metaboliti della curcumina prodotti dal microbiota possono esercitare effetti antinfiammatori e neuroprotettivi <sup>88</sup>, inclusi interessanti effetti positivi sull'aggregazione della proteina Tau <sup>89</sup>.

La composizione del microbiota dell'intestino umano è dinamica e può essere modificata da diversi fattori: parto naturale o cesareo, allattamento al seno o artificiale, dieta, farmaci, prebiotici e probiotici. Varia inoltre in base a fattori

come età, sesso ed area geografica. La dieta Mediterranea, ricca in vegetali, fibre ed grassi monoinsaturi, è considerata il gold-standard per la salute dell'intestino e promuove la diversità del microbiota<sup>38</sup>. Al contrario la tipica Dieta Occidentale (WD) scarsa in fibre e ricca di proteine animali e grassi saturi, è associata con modifiche in negativo della composizione del microbiota (disbiosi), documentata da un aumento di Firmicuti e batteri Gram-negativi<sup>90</sup>.

Come accennato precedentemente l'età è un altro fattore importante nella regolazione del microbiota umano. Durante l'invecchiamento l'intestino attraversa un continuo rimodellamento dovuto a cambiamenti nella sua fisiologia. Cambiamenti nello stile di vita, dell'alimentazione, immunosenescenza. Alterazioni associate all'invecchiamento della fisiologia dell'intestino come *inflammaging*<sup>91</sup> (termine derivante dall'unione di "inflammation" e "aging" che definisce lo stato di infiammazione cronica tipica degli anziani). Inoltre alterazioni dell'intestino associate all'invecchiamento come disordini della motilità gastrica, ipocloridria e alterazioni degenerative nel sistema nervoso enterico, hanno effetti significativi sulla composizione, e quindi sulle ricadute funzionali, del microbioma intestinale<sup>92</sup>. Diversi autori riportano una riduzione della diversità nella composizione del microbiota nella popolazione over 65<sup>93, 94, 95</sup>.

Il processo infiammatorio può alterare l'ambiente intestinale aumentando il livello di aerobiosi e la produzione di ROS che inattivano i Firmicuti (strettamente anaerobici) consentendo la crescita di aerobi facoltativi (Enterobacteriacee, Enterococchi e Stafilococchi) cosiddetti patobionti che prosperano in un intestino infiammato e promuovono a loro volta un profilo proinfiammatorio compromettendo l'omeostasi immunitaria in un loop che si auto alimenta<sup>96</sup>.

La disbiosi intestinale è stata collegata allo sviluppo di diversi problemi di salute, comprese patologie psichiatriche o neurodegenerative, suggerendo che alterazioni nel microbiota intestinale

possano avere un ruolo nella patogenesi della AD. Se la disbiosi può amplificare la neuroinfiammazione ed accelerare la neurodegenerazione, l'asse intestino-cervello può essere convenientemente modulato da fattori dietetici.

In modelli murini è stato dimostrato come un peggioramento in termini di diminuzione della diversità ed aumento di taxa con attività proinfiammatoria può essere ottenuto con una dieta ad alto contenuto di grassi<sup>97</sup>. Inoltre la disbiosi intestinale nei modelli murini di demenza può essere coinvolta nella neuroinfiammazione, espressione ridotta di fattori neurotrofici di derivazione ippocampale ed altre molecole di segnalazione, oltre a deposizione amiloide. Al contrario la somministrazione di probiotici a modelli con AD artificialmente indotta mostra un miglioramento delle funzioni cognitive, minore degenerazione neuronale e livelli inferiori di citochine proinfiammatorie<sup>98, 99, 100</sup> oltre ad diminuzione dell'attivazione della microglia e dello stress ossidativo e ripristino della plasticità ippocampale<sup>101</sup>.

La modulazione del microbiota intestinale mediante l'adozione di una dieta salutare eventualmente addizionata da specifici nutraceutici rappresenta dunque una strategia potenzialmente efficace nella prevenzione del decadimento cognitivo e della sua possibile evoluzione in AD. Al contempo la trasposizione dei risultati nell'uomo data l'assenza di precisi studi clinici, specialmente per quanto riguarda pazienti di mezza età o anziani a rischio di sviluppare AD o con MCI<sup>38</sup>.

### **Neurogenesi ippocampale adulta**

L'ippocampo è la regione chiave del cervello per l'apprendimento e la memoria. L'incorporazione di nuovi neuroni nello strato di cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo è significativa durante l'intera esistenza, e la neurogenesi adulta ha importanti implicazioni nel mantenimento delle funzioni cognitive<sup>102</sup>. Questa area del cervello è pesantemente coinvolta nel processo di neurodegenerazione tipico della AD. Numerosi studi hanno documentato un

deterioramento della neurogenesi e la relativa perdita di memoria e disfunzione cognitiva in modelli murini di AD, anche negli stadi precoci della malattia <sup>103</sup>.

Fattori ambientali come l'esercizio e la restrizione calorica hanno mostrato di incrementare la neurogenesi ippocampale, laddove uno stato cronico di leggera infiammazione e stress ossidativo sembrano diminuirla <sup>104</sup>. Una dieta povera può avere effetti dannosi sulla neurogenesi ippocampale. Diete ricche in acidi grassi saturi o trans e zuccheri raffinati, come nella diete occidentali contribuiscono ad una aumentata produzione di ROS e citochine proinfiammatorie portando a neurodegenerazione e deterioramento di memoria e apprendimento <sup>105</sup>.

Al contrario diete basate su cibi ricchi di omega-3, flavonoidi e altri antiossidanti stimolano la neurogenesi, riducono l'attività ossidativa e downregolano i processi proinfiammatori <sup>106, 107</sup>.

## **Strategie dietetiche per la prevenzione ed il trattamento del decadimento cognitivo**

In modelli animali di laboratorio, diete basate sulla restrizione calorica hanno dimostrato effetti protettivi sul processo di invecchiamento, sullo stress ossidativo e sul processo di neurodegenerazione <sup>138</sup>, fattori implicati nella patogenesi della malattia di Alzheimer. Cicli di dieta con bassi livelli di zuccheri e proteine seguiti da diete con normali livelli di queste portano a temporanee riduzioni dei livelli di ormone della crescita e di IGF-1. Entrambi sono potenziali mediatori degli effetti neuroprotettivi e rigenerativi di queste diete non solo nei topi, ma anche nelle scimmie e negli uomini <sup>138, 108</sup>. Tuttavia, diete fortemente ristrette sotto il profilo calorico sono spesso difficili da mantenere nel tempo e sono frequentemente associate ad effetti collaterali anche rilevanti e con progressiva perdita di peso, in particolare di massa magra. In un modello murino di AD, è stato dimostrato come cicli periodici di una dieta FMD ristretta in contenuto proteico (protein-restricted - PR-FMD) ma

non sotto il profilo calorico siano in grado di ridurre i livelli plasmatici circolanti di IGF-1 con significativi effetti di contrasto al processo di neurodegenerazione <sup>109</sup>.

In particolare, una siffatta FMD ha dimostrato di ridurre di circa il 30-70%, i livelli di proteina tau iperfosforilata (uno dei marcatori tipici della AD) a livello ippocampale, riducendo il deficit età correlato di performance cognitiva <sup>109</sup>. Più recentemente, è stato dimostrato un rilevante effetto neurogenerativo (associato ad un miglioramento clinico della coordinazione motoria e della memoria) in topi sottoposti ad un regime dietetico basato su una simile FMD durante la loro "vita media" (mesi 16-30) <sup>138</sup>.

Studi clinici recenti hanno dimostrato come regimi di digiuno modificato effettuati tramite una FMD siano complessivamente sicuri e generalmente ben tollerati in soggetti sani ed in soggetti affetti da sclerosi multipla, anche con cicli mensili multipli e in individui ultra-65enni <sup>110, 111</sup>.

Inoltre, è importante sottolineare come, in soggetti sani, cicli di una FMD abbiano ridotto diversi fattori di rischio per malattie dell'invecchiamento (compresa la AD), tra cui l'ipertensione arteriosa, il pre-diabete, l'accumulo di tessuto adiposo viscerale e alti livelli circolanti di IGF-1 e di proteina C reattiva <sup>111</sup>.

Studi recenti hanno riportato significative correlazioni tra aderenza alla MeDi e conservazione delle strutture cerebrali <sup>112</sup>

Recentemente è stata riportata una associazione positiva tra aderenza alla MeDi e una migliore conservazione di microstruttura della materia bianca <sup>113, 114, 115</sup> nonché migliorata capacità di apprendimento e memorizzazione <sup>116</sup>.

Al contrario diversi studi longitudinali concordano sugli effetti negativi sulle strutture cerebrali a seguito di una bassa aderenza alla MeDi <sup>117</sup> o dell'aderenza ad un pattern dietetico di dieta occidentale poco sana <sup>118</sup>.

In conclusione l'atrofia della materia grigia e la riduzione dello spessore della corticale nel lobo temporale mediale tipiche manifestazioni precoci di AD, e l'associazione dell'aderenza alla MeDi con



maggiori volumi di materia grigia in regioni AD sembra suggerire un qualche diretto coinvolgimento di tale dieta nella prevenzione e nel rallentamento della neurodegenerazione e successiva perdita neuronale tipica della malattia <sup>38</sup>.

Anche per quanto riguarda la DASH, che peraltro non differisce significativamente dalla MeDi, sono stati osservate evidenze nella protezione delle funzionalità cognitive <sup>119, 120</sup>.

Un trial clinico randomizzato del 2010 ha dimostrato un significativo miglioramento nelle funzionalità psicomotorie in un gruppo di pazienti sottoposti alla DASH ma solo in correlazione a contestuale regime di restrizione calorica ed esercizio fisico aerobico <sup>121</sup>.

In merito alla MIND, che è una dieta mirata specificamente ideata a ritardare il decadimento neurocognitivo, si è già detto che anche essa differisce solo parzialmente dalla MeDi, in particolare per il ridotto consumo di pesce, in seguito al risultato di studi prospettici epidemiologici che hanno valutato il ruolo dell'assunzione di pesce nella prevenzione dell'AD <sup>122, 123</sup>, e per l'integrazione delle bacche, il cui consumo ha dimostrato una significativa associazione con la salute del cervello.

Diversi studi hanno infatti dimostrato gli effetti benefici, in particolare come antiossidanti e antinfiammatori, di vari tipi di bacche in modelli cellulari di neurotossicità <sup>124, 125</sup>. Inoltre studi in vivo su animali supplementati con una dieta arricchita di bacche hanno dimostrato miglioramenti nella coordinazione motoria, prestazioni cognitive, plasticità ippocampale e perdita neuronale correlata all'età <sup>126, 127, 128</sup>.

Una caratteristica unica delle bacche è il loro contenuto in polifenoli come i flavonoidi (antocianine e flavonoli), che sono i maggiori responsabili delle loro attività antiossidante e antinfiammatoria <sup>129, 130</sup>. La associazione tra consumo elevato di bacche e flavonoidi e un tasso ridotto di declino cognitivo è stato rilevato anche nell'uomo <sup>131</sup>, confermando i risultati osservati negli studi sperimentali sugli animali.

Due studi pubblicati da Morris e altri ricercatori della Rush University di Chicago hanno chiaramente dimostrato la superiorità della dieta MIND rispetto alla MeDi e alla DASH nel rallentare il tasso di declino cognitivo <sup>132</sup> e nella riduzione del rischio di AD o demenza <sup>133, 134</sup>.

È attualmente in corso un trial clinico randomizzato su MIND e declino cognitivo <sup>135</sup>.

Ad oggi gli esatti meccanismi che sottostanno agli effetti neuroprotettori associati a queste diete non sono pienamente compresi, anche se è ampiamente accettato che giochino un ruolo nel contrastare diversi processi biologici implicati nella patogenesi come stress ossidativo, neuroinfiammazione, disfunzioni e ipoperfusione neurovascolare oltre a squilibrio dell'asse intestino-cervello e deterioramento della neurogenesi ippocampale <sup>38</sup>.

È altresì possibile che queste diete siano in grado di influenzare il metabolismo delle proteine betamiloide e tau, anche se le evidenze al riguardo sono state ottenute in larga parte da studi su animali e necessitano pertanto ulteriori verifiche e conferme <sup>136, 137</sup>.

### ***Risposte cellulari e sistemiche al digiuno***

Gli effetti rigenerativi del digiuno a cui si è fin qui solo accennato sembrano essere dovuti al passaggio ad una modalità conservativa in risposta alla privazione calorica. Studi recenti hanno consentito di chiarire alcuni dei meccanismi che promuovono resistenza allo stress oltre ad un aumento della durata della vita in diversi organismi modello <sup>138</sup>.

Il digiuno attiva una serie di complesse risposte adattative alla carenza di cibo che coincidono con le risposte endogene allo stress. Questo non deve stupire dato che la carenza di cibo rappresenta a tutti gli effetti uno stress importante di fronte al quale il corpo umano ha sviluppato nel corso dell'evoluzione una risposta altrettanto potente in grado di aumentare considerevolmente le possibilità di sopravvivenza <sup>152</sup>.

Il digiuno porta a cambiamenti nell'attività di molte vie metaboliche associate allo "switch" in una modalità conservativa in grado di generare energia e metaboliti utilizzando fonti di energia derivate principalmente dal tessuto adiposo e in parte dal muscolo. I cambiamenti nei livelli di ormoni e di metaboliti in circolo si traducono in una riduzione della divisione cellulare e dell'attività metabolica delle cellule sane e questo conferisce loro protezione dagli insulti. Questo si rivela peraltro di particolare interesse negli studi che ipotizzano un utilizzo del digiuno in abbinamento ai farmaci chemioterapici, laddove questa "resistenza differenziale allo stress" (DSR) consente alle cellule sane di migliorare la propria resistenza nei confronti della chemioterapia al contrario delle cellule tumorali che, insensibili allo stimolo anti-crescita dettato da questa condizione di privazione di nutrienti, possono mostrare una maggiore sensibilizzazione alla chemioterapia e ad altre terapie oncologiche rispetto alle cellule normali, definita appunto "sensibilizzazione differenziale allo stress" (DSS)<sup>139, 140</sup>.

L'esatto meccanismo del DSR e del DSS indotto dal digiuno è tutt'ora oggetto di studio. Sono state proposte diverse vie metaboliche come mediatori chiave di questi meccanismi, dei quali il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1) è il più esaminato<sup>141, 142</sup>.

La risposta al digiuno è in parte regolata dai livelli circolanti di glucosio, insulina, glucagone, ormone della crescita (GH), IGF-1, glucocorticoidi e adrenalina.

Durante una fase iniziale post-assorbimento, che dura tipicamente 6-24 ore, i livelli di insulina iniziano a diminuire ed i livelli di glucagone aumentano, attivando il conseguente rilascio in circolo di glucosio tramite il consumo delle riserve epatiche di glicogeno (che si esauriscono dopo circa 18-24 ore).

Il rilascio di glucagone ed i bassi livelli di insulina stimolano anche la degradazione dei trigliceridi (per lo più immagazzinati nel tessuto adiposo) in glicerolo e acidi grassi liberi, utilizzati dalla maggior parte dei

tessuti come fonte di energia durante un regime di digiuno.

Il cervello invece, si affida al glucosio residuo ed ai corpi chetonici prodotti dagli epatociti (i corpi chetonici possono essere prodotti dall'acetil-CoA generato dall' $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi o dagli amminoacidi chetogenici).

Nella fase chetogenica del digiuno, i corpi chetonici raggiungono concentrazioni nell'ordine delle millimoli, tipicamente a partire da 2-3 giorni dall'inizio del digiuno.

Glicerolo derivato dal tessuto adiposo, amminoacidi gluconeogenetici (previa conversione in ossalacetato) e piruvato che deriva da lattato e alanina alimentano la gluconeogenesi, che mantiene i livelli di glucosio serico ad una concentrazione di circa 4 mM (70 mg per dl).

Anche glucocorticoidi ed adrenalina contribuiscono a dirigere gli adattamenti metabolici al digiuno, aiutando a mantenere i livelli di zucchero nel sangue e a stimolare la lipolisi.

La modifica metabolica indotta dal digiuno, che ha suscitato maggior interesse per un possibile impiego terapeutico di questo regime alimentare riguarda l'IGF-1. Il digiuno aumenta i livelli serici di GH<sup>143</sup> che a sua volta inibisce la produzione di IGF-1. Questa riduzione è rafforzata dall'aumento dei livelli di IGFBP1, che si lega all'IGF-1 circolante e impedisce la sua interazione con il corrispondente recettore di superficie cellulare<sup>138</sup>.

Infine, il digiuno diminuisce i livelli di leptina, un ormone prodotto prevalentemente dagli adipociti che inibisce il senso di fame, mentre aumenta i livelli di adiponectina, che incrementa la ripartizione degli acidi grassi<sup>144</sup>.

In conclusione, le caratteristiche della risposta sistemica dei mammiferi al digiuno sono bassi livelli di glucosio ed insulina, alti livelli di glucagone e chetoni, bassi livelli di IGF-1 e leptina e alti livelli di adiponectina.

La risposta delle cellule sane al digiuno è evolutivamente conservata e conferisce dunque protezione cellulare. È stato dimostrato, almeno negli organismi modello oggetto di studio, essere responsabile di un

aumento della longevità e dello stato di buona salute<sup>140, 138, 145, 146</sup>.

Le cascate del segnale attivate da IGF-1 e dall'insulina sono due percorsi di segnalazione fondamentali per mediare gli effetti del digiuno anche a livello cellulare. Entrambi i fattori stimolano la proliferazione e la crescita e inibiscono l'apoptosi in risposta alla disponibilità di calorie e proteine tramite la segnalazione attraverso il recettore dell'IGF-1 (IGF-1R) e l'isoforma A del recettore dell'insulina (IR-A), rispettivamente<sup>147, 148</sup>.

In condizioni di normale alimentazione, il consumo di proteine e l'aumento dei livelli di aminoacidi incrementano i livelli di IGF-1 e stimolano l'attività di AKT e mTOR, aumentando così la sintesi proteica.

Viceversa, durante il digiuno, i livelli di IGF-1 e la sua cascata di segnali a valle diminuiscono, portando all'inibizione di AKT ed inducendo la trascrizione di enzimi come l'emeossigenasi 1 (HO1), la superossidodismutasi (SOD) e le catalasi, che hanno attività antiossidanti ed effetti protettivi<sup>149</sup>.

Sia l'insulina sia l'IGF-1 innescano la proteina Ras che porta all'attivazione della MAP-chinasi (MAPK) e della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) che attiva AKT. Nelle cellule sane, l'inibizione della proliferazione o l'investimento nella manutenzione può contribuire ad aumentare la resistenza allo stress.

Elevati livelli di glucosio stimolano inoltre la segnalazione della protein-chinasi A (PKA), che regola negativamente il principale sensore di energia della cellula, AMP-activated protein Kinase (AMPK)<sup>150</sup>, che a sua volta impedisce l'espressione del fattore di trascrizione implicato nella resistenza allo stress cellulare Early Growth Response protein 1 (EGR1, Msn2 e/o Msn4 nel lievito)<sup>151, 152</sup>.

AMPK può avere un ruolo importante nel DSR. Questa proteina controlla i livelli di energia cellulare e si attiva quando i rapporti ADP/ATP o AMP/ATP aumentano<sup>153</sup>, inibendo quindi pathway anabolici, come la proliferazione cellulare e la sintesi proteica, e attivando i processi catabolici, come la glicolisi, l'ossidazione

degli acidi grassi e l'autofagia, processo catabolico altamente conservato tra gli eucarioti che aumenta la sopravvivenza nei periodi di privazione di nutrienti degradando proteine e organuli danneggiati per recuperare aminoacidi come fonte di energia alternativa<sup>154</sup>.

Infine, il digiuno induce l'attività delle sirtuine, che funzionano come deacetilasi NAD<sup>+</sup> dipendenti ed a cui sono stati attribuiti effetti protettivi e di estensione della durata della vita in organismi modello<sup>155</sup>.

Durante la privazione di nutrienti aumentano inoltre i livelli di NAMPT, enzima produttore di NAD<sup>+</sup>, promuovendo ulteriormente l'attività delle sirtuine mitocondriali, in particolare la SIRT3 e la SIRT4, e proteggendo infine le cellule dagli agenti genotossici, compresa la chemioterapia<sup>156</sup>.

In conclusione il digiuno, tramite la restrizione proteica e la limitazione del glucosio circolante, porta ad una diminuzione dei livelli di IGF-1 e insulina le cui cascate di segnalazione inibiscono l'attività della PKA, aumentando l'attività dell'AMPK, dell'EGR1, del NAMPT nonché dei meccanismi di autofagia. Inoltre induce l'attività sirtuinica portando così importanti effetti di protezione delle cellule sane e pro-aging<sup>138, 151, 157, 158</sup>

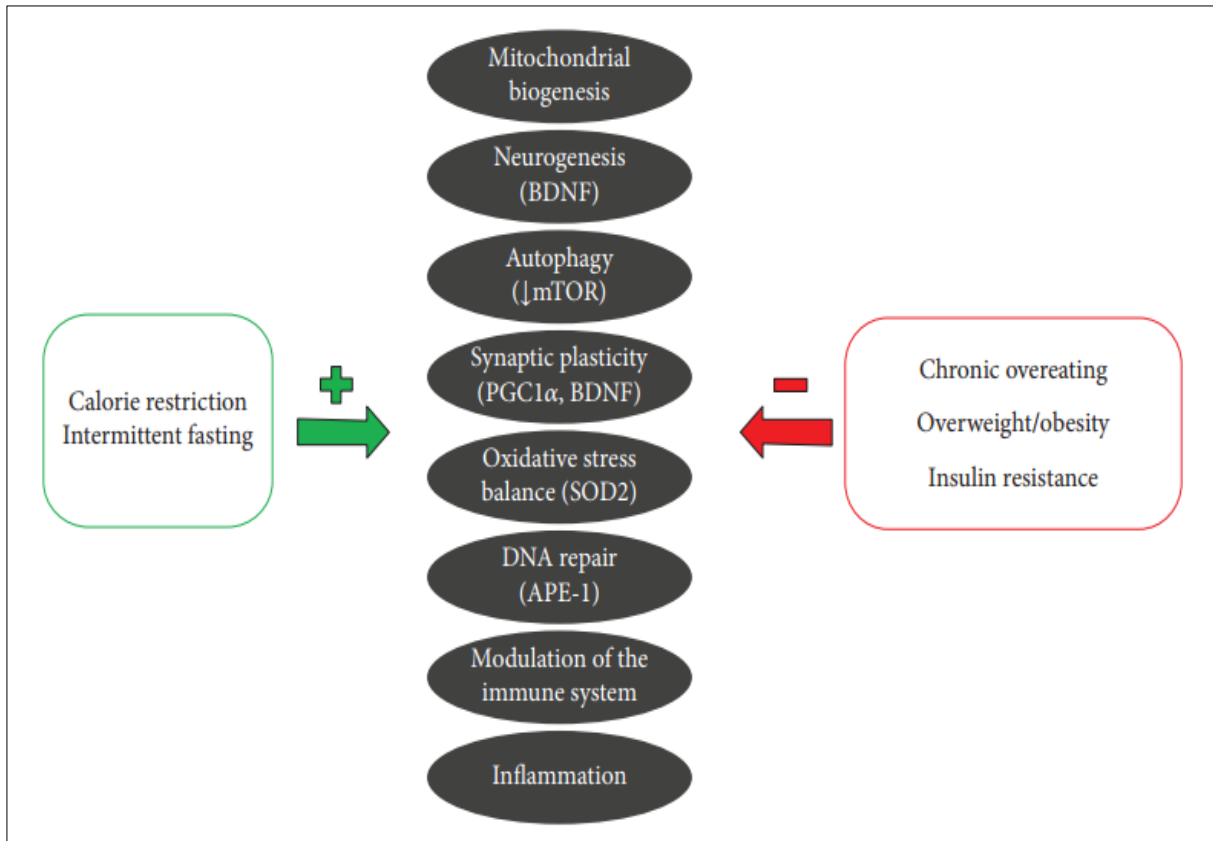
### ***Potenzialità del digiuno intermittente nel decadimento cognitivo***

L'invecchiamento è uno dei principali fattori di rischio per il decadimento cognitivo. Molti dei segni caratteristici dell'invecchiamento (stress ossidativo e accumulo di molecole danneggiate dall'ossidazione, disfunzione mitocondriale, compromissione della autofagia e della omeostasi del calcio, anomalie nella eccitabilità della rete neuronale e neuroinfiammazione) sono stati altresì documentati nella malattia di Alzheimer, e queste modificazioni possono promuovere il processamento della proteina precursore di amiloide (APP) e la patologia della proteina Tau, e viceversa<sup>159, 160</sup>.

Nei procarioti, negli animali da laboratorio e nell'uomo una restrizione calorica (CR) del 20-40% può fornire una protezione contro invecchiamento, stress ossidativo e disordini neurodegenerativi <sup>15, 161</sup>, ma la tollerabilità a lungo termine di una tale dieta la rende concretamente infattibile. Altri studi hanno ottenuto gli stessi risultati positivi alternando una dieta normale a

digiuno, in particolare a seguito dell'abbassamento dei livelli di glucosio e amminoacidi disponibili <sup>163</sup>.

L'aumentata attività sinaptica eccitatoria, i fattori neurotrofici (BDNF) e il fattore di crescita dei fibroblasti portano all'attivazione di diverse chinasi, come PI-3K, AKT, MAPKs e CaMK oltre a NOS e calcineurina, che convergono tutti su



Pathway di segnalazione coinvolti nella risposta adattativa di circuiti neuronali che contribuiscono a mantenere il cervello in salute, Restrizione calorica e digiuno intermittente modulano positivamente questi pathway mentre sovralimentazione cronica e insulino resistenza aumentano neuroinfiammazione, danno neuronale ed apoptosi. Figura adattata da *Nutrients in the Prevention of Alzheimer's Disease*. Cremonini AL, Caffa I, Cea M, Nencioni A, Odetti P, Monacelli F. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Sep 4

regimi più facilmente sostenibili di digiuno intermittente <sup>162</sup> come Intermittent Fasting (IF), Periodic Fasting (PF) o Alternate-day Fasting (ADF), o le più recenti FMD, modalità precedentemente approfondite <sup>0</sup>. Il digiuno modifica la biochimica dell'attività della rete neuronale, in special modo in regioni del cervello come l'ippocampo, lo striato, l'ipotalamo e il tronco encefalico. A livello molecolare sono state individuati diversi pathway di segnalazione che mediano le risposte adattative a breve e lungo termine dei circuiti neuronali al

diversi fattori di trascrizione come cAMP-Responsive Element-Binding protein (CREB), nuclear regulatory factor 2 (Nrf2), and NF- $\kappa$ B.

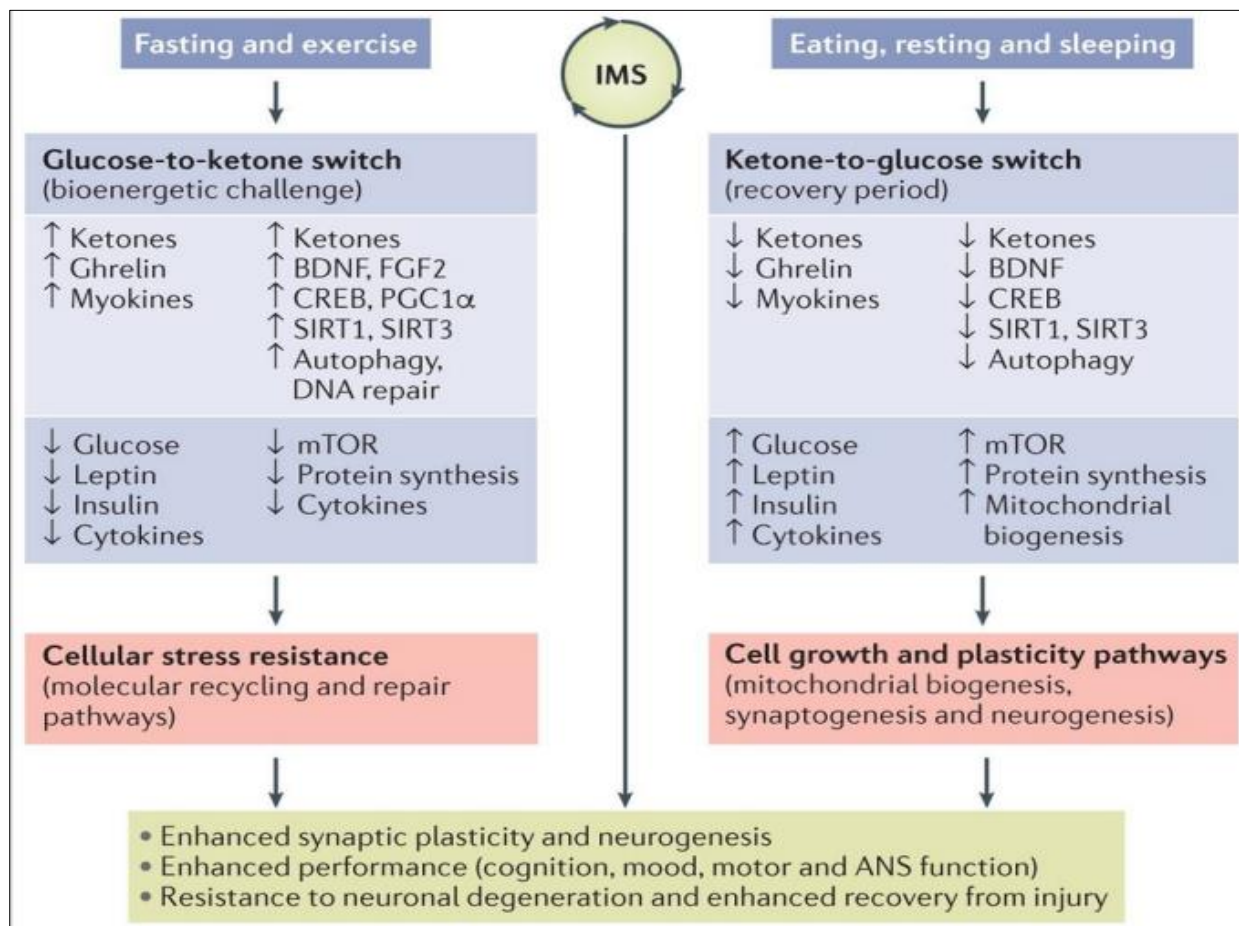
Questi fattori di trascrizione inducono l'espressione di geni e proteine coinvolte nell'aumento della neuroplasticità e nella resistenza allo stress<sup>38</sup>. Parte dei benefici di CR e digiuno sembrano essere correlati alla restrizione proteica e ridotto signaling di IGF-1/insulina. Durante la restrizione proteica mTOR, e in particolare il complesso 1 (mTORC1), è represso,

consentendo alla cellula di entrare in una modalità di “conservazione de,ill’energia” per impedire sintesi di proteine e lipidi e aumentare l’autofagia <sup>164, 165</sup>.

Gran parte delle attuali evidenze scientifiche riguardo a regimi dietetici di digiuno intermittente nel trattamento dell’AD derivano da studi su animali da laboratorio. Nei roditori diversi studi hanno dimostrato la capacità di migliorare funzioni cognitive e motorie, in particolare compiti

IF e diete chetogeniche possono inoltre modificare l’attività della rete neuronale e la plasticità sinaptica. I neuroni dei roditori che seguivano un regime ADF sono maggiormente resistenti alla degenerazione dei neuroni dell’ippocampo indotta da eccitotossine e performano meglio in compiti di apprendimento e memorizzazione <sup>169</sup>.

IF e/o una regolare attività fisica può anche prevenire deficit correlati all’invecchiamento



Modello di come uno Switching Metabolico Intermittente (IMS) potrebbe ottimizzare le performance del cervello ed aumentarne la resistenza a lesioni e malattie. Adattata da *Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health*. Mattson MP, Moehl K, Ghena N, Schmaedick M, Cheng A. Nat Rev Neurosci. 2018 Feb;19(2):63-80. doi: 10.1038/nrn.2017.156. Epub 2018 Jan11.

correlati all’ippocampo come apprendimento e memorizzazione <sup>138, 166, 167</sup>. Inoltre il digiuno intermittente è stato associato alla riduzione di stress ossidativo e a miglioramenti strutturali del cervello come l’aumento dello spessore dello strato delle cellule piramidali CA e una potenziata espressione della proteina dendritica drebrina, nell’ippocampo <sup>168</sup>.

nel Potenziamento a Lungo Termine (LTP), una manifestazione cellulare comune in risposta a ripetuta stimolazione delle sinapsi <sup>170, 171</sup>.

Altri gruppi di ricerca hanno documentato un ruolo di regimi di CR/IF nella riduzione di deposizione di Aβ e di fosforilazione di Tau nell’ippocampo e nella corteccia cerebrale di un modello murino transgenico di AD <sup>172, 173, 174, 175, 176</sup>.

Recentemente è stato evidenziato il ruolo di IF (e in particolare del beta-idrossibutirrato) nel ripristinare la polarità di AQP4, una proteina canale coinvolta nella clearance di  $A\beta$  spesso compromessa in AD, fornendo una possibile spiegazione alternativa al ruolo positivo di ADF nel migliorare le funzioni cognitive e nel proteggere da patologie della  $A\beta$ <sup>177</sup>.

Infine IF, con o senza esercizi, stimola crescita e differenziazione di nuovi neuroni in cellule granulari nel giro dentato dell'ippocampo, ovvero neurogenesi adulta ippocampale, e la creazione di connessioni sinaptiche (crescita delle spine dendritiche e sinaptogenesi) tra se stesse o altri neuroni da altre regioni<sup>178, 179</sup>.

### **CR e IF nell'uomo**

Diversi studi hanno mostrato che la restrizione calorica può ridurre il grasso viscerale preservando al contempo la massa magra, migliorando il metabolismo del glucosio e dei lipidi e riducendo la pressione del sangue e i biomarcatori dell'infiammazione (proteina C-reattiva e citochine proinfiammatorie)<sup>180, 181</sup>.

Tutti questi effetti positivi si traducono in un rischio diminuito di malattia cardiovascolare, diabete e patologie neurodegenerative.

Attualmente non sono stati effettuati studi su restrizione proteica e/o calorica sull'uomo con AD conclamato, ma alcuni autori hanno sottolineato il ruolo della restrizione proteica nel processo di invecchiamento e nelle malattie croniche ad esso correlate<sup>182</sup>.

Tale ruolo sembra variare con l'età in quanto l'effetto benefico della restrizione proteica sembra perdersi negli individui sopra ai 65 anni<sup>183</sup>.

Brevi periodi di CR sono in grado di migliorare le funzioni cognitive in soggetti anziani<sup>184</sup>, e 30 giorni di una dieta a basso indice glicemico in pazienti con MCI hanno riportato miglioramenti in test di memoria visiva a breve termine, biomarcatori di metabolismo di  $A\beta$  nel fluido cerebrospinale, e bioenergetica del cervello<sup>185</sup>, ma è da escludersi che pazienti anziani afflitti da patologie neurodegenerative

possano affrontare restrizioni alimentari severe per lunghi periodi.

Regimi di IF o cicli di FMD ogni 1-2 mesi sembrano maggiormente fattibili e tollerabili nella pratica clinica.

Recenti trial clinici pilota hanno valutato l'applicazione di tali regimi alimentari in soggetti sani e in malati di cancro, diabete e sclerosi multipla, mostrando risultati promettenti<sup>186, 138, 34</sup> mentre altri sono tuttora in corso<sup>187, 188, 189</sup>.

Il presente trial clinico, tuttora in corso, intende appunto verificare se i diversi tipi di digiuno, inclusi ADF e FMD, hanno effetti neuroprotettivi e/o rigenerativi in pazienti con MCI o uno stadio iniziale di AD.

### **Protocollo e obiettivi della ricerca**

Lo studio è consistito nella somministrazione di dodici cicli mensili della ProlonAD™ (di L-Nutra, una FMD di 5 giorni, ipoproteica e moderatamente ipocalorica) oppure di una dieta placebo di controllo a pazienti affetti da aMCI o da AD lieve (MMSE 18-23) diagnosticati secondo i criteri definiti da Peterson e da McKahn, rispettivamente<sup>47, 190</sup>.

Il disegno dello studio ha previsto la randomizzazione di 40 pazienti, affetti da AD lieve (MMSE 18-23) o da aMCI, a ricevere dodici cicli mensili di ProlonAD™, vs. una dieta placebo. I soli pazienti del gruppo di trattamento hanno ricevuto inoltre una supplementazione di integratori contenenti acidi grassi omega-3, caffeina, frutta a guscio, olio di cocco, olio di oliva e cacao, forniti insieme al kit di dieta ProlonAD™. I pazienti assegnati ad entrambi i bracci hanno ricevuto inoltre raccomandazioni dietetiche personalizzate abbinata ad istruzioni per un'attività fisica leggera-moderata da svolgersi anche al domicilio e miranti, soprattutto nel caso dei pazienti assegnati a ricevere ProlonAD™, a prevenire la perdita di massa magra.

### **Endpoint primario dello studio**

Fattibilità e sicurezza dei dodici cicli di ProlonAD™. Gli sperimentatori ipotizzano che la FMD ProlonAD™ sarebbe risultata

fattibile sia in pazienti affetti da aMCI che in pazienti affetti da AD lieve. La fattibilità è stata arbitrariamente definita come l'assunzione di almeno un ciclo di FMD ogni due mesi con la possibilità di ammettere il consumo di solo il 50% della dieta prevista e/o un consumo massimo di 10 Kcal/kg di cibo non previsto in uno solo tra i giorni 1-5 di ogni ciclo. Per quanto riguarda la sicurezza gli sperimentatori ipotizzavano inoltre che ProlonAD™ non avrebbe causato effetti collaterali severi e che esso non avrebbe avuto effetto di detrimento sulla composizione corporea del paziente, specificamente in termini di impatto sulla massa magra misurata tramite bioimpedenziometria e dinamometria.

### **Endpoint secondari**

- percentuale di conversione a AD (per i pazienti con aMCI);
- memoria episodica valutata con Free and Cued Selective Reminding Test (FCRST)<sup>191</sup>;
- stato cognitivo valutato tramite MMSE, CDR-Sum of the boxes;
- stato funzionale valutato con Barthel Index (ADL) e Lawton-Brody Instrumental ADL (IADL);
- stato emotivo valutato tramite scala CESD-R;
- stato nutrizionale (MNA e composizione corporea – bioimpedenziometria, handgrip);
- stress del caregiver valutato tramite Caregiver Burden Inventory e NPI;
- qualità di vita dei pazienti (QLQ-AD);
- marcatori infiammatori, marcatori di stress ossidativo, marcatori di danno neuronale (Neurofilament Light, NfL), quantificazione delle cellule staminali circolanti, marcatori di invecchiamento cellulare (es. valutazione dell'attività telomerasica dei linfociti).
- valutazione della fragilità (frailty index di Rockwood, che include anche la velocità del cammino, handgrip, capacità respiratoria)

## **Materiali e Metodi**

### **Arruolamento**

Sono stati arruolati in totale 40 pazienti affetti da AD lieve o aMCI presso la Geriatria dell'Ospedale Policlinico San Martino (Resp. Prof. Alessio Nencioni) e presso la Geriatria dell'Azienda Ospedaliera di Perugia (Resp. Prof.ssa Patrizia Mecocci).

### **Criteri di inclusione**

- Età 55-80;
- Presenza di aMCI<sup>1</sup> o di AD<sup>47</sup> iniziale;
- Normale funzionalità d'organo (epatica e renale);
- BMI non inferiore a 20 kg/m<sup>2</sup>;
- Adesione al consenso informato

### **Criteri di esclusione**

- Età >80 anni
- Diabete mellito;
- Compromissione d'organo (fegato, rene);
- Allergie alimentari ai componenti di ProlonAD™;
- Pazienti in terapia con anticoagulati antagonisti della vitamina K;
- Pazienti che vivono soli o non sono adeguatamente supportati dal contesto familiare;
- Altre terapie sperimentali in atto.

### **Disegno sperimentale e modalità di somministrazione**

Una volta accertate l'eleggibilità e ottenuta la firma del consenso informato i pazienti sono stati randomizzati centralmente presso la Clinica Geriatrica dell'Ospedale Policlinico San Martino, IRCCS per l'Oncologia a ricevere ProlonAD™ o la dieta placebo.

Tra un ciclo di ProlonAD™ o di dieta placebo ed il successivo sono state fornite ai pazienti di entrambi i bracci raccomandazioni dietetiche insieme ad un programma di moderata attività fisica giornaliera, a seconda delle capacità motorie e della condizione clinica del paziente.



La dieta assegnata ai pazienti del braccio sperimentale include due Kit (kit "A" e "S") che vengono consegnati ai pazienti con cadenza mensile. Il paziente provvede ad assumere la dieta contenuta nel kit in autonomia in base alle indicazioni ricevute al momento della consegna. Il kit "A" contiene la dieta Prolon™ dei cinque giorni, il kit "S" contiene i supplementi che integrano la precedente e vanno assunti quotidianamente, sia in concomitanza del kit "A" sia durante le successive tre settimane di dieta normale, fino alla consegna del successivo set.

La dieta placebo consiste in un kit "B" consegnato mensilmente ai pazienti del braccio di controllo.

Riassumendo, nell'arco dei 12 mesi della sperimentazione, con cadenza mensile, sono stati consegnati:

- ai pazienti del braccio sperimentale dodici cicli di dieta composti da 12 kit dieta "A" (5 giorni) e 12 kit "S" supplementi (31 giorni)
- ai pazienti del braccio di controllo 12 kit dieta "B" placebo (5 giorni).

La dieta ProlonAD™, che è stata assunta dal paziente una volta al mese per 5 giorni consecutivi, è una dieta ipocalorica e ipoproteica, e fornisce tutti i micronutrienti necessari ad evitare la malnutrizione. ProlonAD™ è attualmente in fase di finalizzazione da parte della ditta L-Nutra. La sua composizione è analoga a quella della dieta Prolon™, già commercializzata (<https://www.prolon.it>), con l'aggiunta di supplementi da assumere nell'arco della giornata a base di olio di oliva, olio di cocco, olio di alga, frutta secca e cacao variamente combinati tra loro che apporteranno un sostanziale aumento delle calorie giornaliere (300-360 kcal) rispetto a Prolon™. Il livello di calorie può essere modificato in base al peso iniziale ed alla perdita di peso del paziente durante lo studio, con un range che va da 300 kcal/giorno per quelli che mantengono un peso normale o sono sovrappeso a 500 kcal/giorno per coloro che perdono peso a causa della dieta e non sono in grado di

riacquistarlo. L'inserimento di questi supplementi deriva dalla necessità di fornire un apporto energetico sufficiente a evitare perdite di peso nei pazienti sottoposti a dieta ProlonAD™ ma allo stesso tempo volendo fornire nutrienti con documentato ruolo neuro-protettivo di ingredienti chetogenici inclusi l'olio di oliva e olio di cocco<sup>192, 193, 194</sup>, olio di alga ricco di acidi grassi omega-3 a lunga catena (DHA, e EPA)<sup>195, 196</sup>, caffeina<sup>197, 198</sup> e cioccolato extra-fondente<sup>199</sup>.

ProlonAD™ è costituita interamente da ingredienti certificati come GRAS ("Generally Regarded As Safe") e selezionati per le loro proprietà mimodigiuno. Essi comprendono: zuppe vegetali (pomodoro, spinaci, funghi, zucca, etc.) barrette energetiche, snacks (chips di cavolo nero, chips alle verdure essiccate/cotte al forno, olive, etc.), bevanda energetica, tè, softgels all'olio di alghe (acidi grassi essenziali Omega-3), pillole di integratori alimentari (Vitamina A (come beta carotene), vitamina C (acido ascorbico), vitamina D (come colecalciferolo), vitamina E (come DL-alfa-tocoferolo acetato), vitamina K (come fitonadione), tiamina (come tiamina mononitrato), riboflavina, niacina (come niacinamide), vitamina B6 (come piridossina HCl), acido folico, vitamina B12 (come cianocobalamina), biotina, acido pantotenico (come calcio-D-pantotenato), calcio (come carbonato di calcio e calcio fosfato tribasico), ferro (come fumarato ferroso), fosforo (come calcio fosfato tribasico), ioduro di potassio, magnesio (come ossido di magnesio), zinco (ossido di zinco), selenio (come selenato di sodio), rame (come solfato rameico), solfato di manganese, cromo (come picolinato di cromo), molibdeno (come molibdato di sodio). Comprende inoltre una miscela brevettata [polvere di barbabietola rossa, polvere di foglia di spinaci, polvere di pomodoro, polvere di radice di carota, polvere di cavolo (*Brassica oleracea*), polvere di foglie di cavolo nero] e una serie di supplementi in diverse formulazioni contenenti olio di oliva, caffeina, cioccolato crudo fondente biologico 85%, crema di

mandorle e cacao. Altri ingredienti: acido stearico, cellulosa microcristallina, fosfato bicalcico, sodio croscaramelloso, stearato di magnesio, diossido di silicio, glassa farmaceutica.

La somministrazione avviene secondo il seguente schema dietetico:

**Giorno 1** (circa 1100 kcal): tè (n°2), barretta alle noci (n°2), olio d'alga (integratore DHA), zuppa al pomodoro, olive, crackers, minestrone, barretta al cioccolato, NR-3 (supplemento di vitamine e sali minerali) (n°2) + supplementi (300-360 kcal), per un totale di 1400-1460 kcal.

• **Giorno 2** (circa 800 kcal): tè (n°4), barretta alle noci, zuppa ai funghi, olive (n°2), zuppa con quinoa, barretta al cioccolato, NR-3 (n°2), L-drink + supplementi (300-360 kcal), per un totale di 1100-1160 kcal.

• **Giorno 3** (circa 800 kcal): tè (n°4), barretta alle noci, zuppa al pomodoro, crackers, minestrone, NR-3 (n°2), L-drink + supplementi (300-360 kcal), per un totale di 1100-1160 kcal.

• **Giorno 4** (circa 800 kcal): tè (n°4), barretta alle noci, zuppa vegetale, olive (n°2), zuppa con quinoa, barretta al cioccolato, NR-3 (n°2), L-drink + supplementi (300-360 kcal), per un totale di 1100-1160 kcal.

• **Giorno 5** (circa 800 kcal): tè (n°4), barretta alle noci, olio d'alga (integratore DHA), zuppa al pomodoro, crackers, minestrone, NR-3 (n°2), L-drink + supplementi (300-360 kcal), per un totale di 1100-1160 kcal.

Dal Giorno 6 il paziente nel gruppo di trattamento riprende la dieta normale, sulla scorta delle raccomandazioni dietetiche personalizzate fornite dai nutrizionisti clinici coinvolti nella sperimentazione ma, in attesa della consegna del kit successivo (in pratica per l'intera durata della sperimentazione di 12

mesi), dovrà continuare ad assumere quotidianamente la supplementazione prevista dal kit "S" nelle quantità previste dall'allegata tabella di assunzione. Tale tabella è riferita ad un ciclo di 7 giorni che si ripete identico per tutta la sperimentazione. I supplementi di caffeina e cacao (cioccolata fondente) vengono assunti entro le ore 14.00 di ogni giorno per evitare turbe del sonno, e sono stati inclusi per le note proprietà anti-infiammatorie, antiossidanti e neuroprotettive. Nelle visite di controllo è stata prestata particolare attenzione ai potenziali effetti collaterali dovuti all'assunzione di caffeina e cacao, quali:

- ansia
- insonnia
- problemi digestivi
- problemi muscolari
- ipertensione
- aumento della frequenza cardiaca, fibrillazione atriale
- minzione frequente

Ai pazienti è stato consigliato di non assumere più di un caffè al giorno per l'intera durata della sperimentazione in modo da non sommare gli effetti alla caffeina contenuta nel kit supplementi. Gli ingredienti che causano o potenzialmente causano effetti collaterali sono stati eliminati e ove possibile sostituiti da altri ingredienti tra quelli elencati in modo da fornire lo stesso numero di kcal.

## Dettaglio della dieta ProLonAD™



### Programma alimentare ProLon®

	Day 1**	Day 2	Day 3
<b>COLAZIONE</b>	Tè Limone e Menta Verde Barretta alle Noci Olio di Alga	Tè Limone e Menta Verde Barretta alle Noci	Tè Limone e Menta Verde Barretta alle Noci
<b>PRANZO</b>	Zuppa al Pomodoro Olive Salate Crackers al Cavolo 1 Capsula NR-3	Tè all'Ibisco Zuppa ai Funghi Olive Salate 1 Capsula NR-3	Tè all'Ibisco Zuppa al Pomodoro Crackers al Cavolo 1 Capsula NR-3
<b>SPUNTINO</b>	Tè Menta Verde Barretta alle Noci	Tè Menta Verde Olive all'Aglio	Tè Menta Verde
<b>CENA</b>	Minestrone di Verdure Barretta al Cioccolato 1 Capsula NR-3	Tè all'Ibisco Minestrone con Quinoa Barretta al Cioccolato 1 Capsula NR-3	Tè all'Ibisco Minestrone di Verdure 1 Capsula NR-3
		L-Drink	L-Drink
	Day 4	Day 5	Day 6
<b>COLAZIONE</b>	Tè Limone e Menta Verde Barretta alle Noci	Tè Limone e Menta Verde Barretta alle Noci Olio di Alga	Iniziare con cibi soffici: zuppe/vellutate, estratti/frullati di verdure e frutta.
<b>PRANZO</b>	Tè all'Ibisco Zuppa alle Verdure Olive Salate 1 Capsula NR-3	Tè all'Ibisco Zuppa al Pomodoro Crackers al Cavolo 1 Capsula NR-3	Pasti leggeri: riso, pasta corta e piccole porzioni di legumi interi o frullati, pesce leggero.
<b>SPUNTINO</b>	Tè Menta Verde Olive all'Aglio	Tè Menta Verde	Riprendere un'alimenta- zione sana dal giorno 7.
<b>CENA</b>	Tè all'Ibisco Minestrone con Quinoa Barretta al Cioccolato 1 Capsula NR-3	Tè all'Ibisco Minestrone di Verdure 1 Capsula NR-3	Per maggiori dettagli consulta le istruzioni complete. Chiedi aiuto al tuo Medico/Nutrizionista di fiducia.
	L-Drink	L-Drink	

\* Ogni giorno assumere 2 capsule di integratore NR-3, preferibilmente dopo i pasti principali

\*\* Bevanda L-DRINK non presente nel Giorno 1

si prega di prendere questa tabella come riferimento per il consumo degli alimenti previsti in dieta.





## NR-3

INTEGRATORE ALIMENTARE  
MULTIVITAMINICO E MINERALI

INFORMAZIONI NUTRIZIONALI		
PORZIONE: 2 CAPSULE		
	per 2 capsule	% VNR*
L-Cistina	159,6 mg	**
L-Metionina	38,6 mg	**
Vitamina C	38 mg	48 %
Niacina	12 mg	75 %
MSM (metilsulfonilmetano)	12 mg	**
Zinco	11 mg	110 %
Vitamina E	6,6 mg	55 %
Acido pantotenico	4 mg	67 %
Vitamina B6	1,4 mg	100 %
Vitamina B2	1 mg	71 %
Rame	1 mg	100 %
Vitamina B1	0,92 mg	84 %
Vitamina A	400 µg RE	50 %
Biotina	100 µg	200 %
Acido folico	67 µg	34 %
Selenio	56 µg	102 %
Vitamina B12	1,2 µg	48 %

\*VALORI NUTRITIVI DI RIFERIMENTO  
\*\* VNR NON DETERMINATI

INGREDIENTI: ANTIAGGLOMERANTI: AMIDO PREGELATINIZZATO, CALCIO CARBONATO, SILICE PRECIPITATA IDRATA, MAGNESIO STEARATO. INVOLUCRO: IDROSSIPROPIL METILCELLULOSA, GOMMA GELLANO. L-CISTINA, L-METIONINA, ACIDO ASCORBICO, NIACINA, MSM (METILSULFONILMETANO), ZINCO GLUCONATO, DL-ALFA-TOCOPEROLO, ACIDO PANTOTENICO, PIRIDOSSINA CLORIDRATO, RIBOFLAVINA, RAME GLUCONATO, TIAMINA CLORIDRATO, BETA-CAROTENE, BIOTINA, ACIDO FOLICO, SELENIO-METIONINA, CIANOCOBALAMINA.

ISTRUZIONI: assumere due capsule al giorno durante i pasti.

CONSERVAZIONE: Conservare in luogo fresco e asciutto a temperatura inferiore di 25°C, al riparo dalla luce diretta del sole

PRODOTTO IN ITALIA  
2 CAPSULE da 500 mg

AVVERTENZE: Non superare le dosi quotidiane raccomandate. Gli integratori non vanno intesi come sostituti di una dieta variata. Tenere fuori dalla portata dei bambini.

## OLIO DI ALGAE

INTEGRATORE ALIMENTARE DHA 200mg

INFORMAZIONI NUTRIZIONALI	
PORZIONE: 1 CAPSULA GEL	
	per capsula gel
Olio di Algae	500 mg
fonte di DHA (acido Docosaesaenoico)	200 mg

INGREDIENTI: OLIO DI SCHIZOCHITRIUM ALGAE, GELATINA BOVINA, OLIO DI SEMI DI GIRASOLE, GLICERINA, ACQUA PURIFICATA, MENO DEL 2% DI: TOCOPEROLO (ANTIOSSIDANTE), ESTRATTO DI ROSMARINO (ANTIOSSIDANTE), LECITINA DI SOIA (EMULSIONANTE), PALMITATO DI ASCORBILE (ANTIOSSIDANTE).

CONSIGLI SULL'ALLERGIA: Per gli allergeni, vedi gli ingredienti in **grassetto**.

ISTRUZIONI PER L'USO: Assumere una capsula gel per porzione, insieme al cibo.

CONSERVAZIONE: Conservare in luogo fresco e asciutto a temperatura inferiore di 25°C, al riparo dalla luce diretta del sole

PRODOTTO NEGLI USA  
1 CAPSULA GEL da 949 mg

AVVERTENZE: Non superare le dosi quotidiane raccomandate. Gli integratori non vanno intesi come sostituti di una dieta variata. Tenere fuori dalla portata dei bambini.

## TISANA ALLA MENTA


INGREDIENTI: FOGLIE DI MENTA BIOLOGICA (non EU).

PREPARAZIONE: Mettere 1 bustina di tè in una tazza. Aggiungere acqua bollente e lasciare in infusione per 5-7 minuti.

COME GUSTARE L-DRINK: Seguire le istruzioni per preparare L-DRINK. Aggiungere la bustina di tè al mix nella bottiglia. Lasciare il tè in infusione per tutto il tempo che si desidera.

CONSERVAZIONE: Conservare in luogo fresco e asciutto.

PRODOTTO IN USA CON INGREDIENTI  
PROVENIENTI DALL'EGITTO.

Peso Netto 1,4g 

## TISANA ALL'IBISCO


INGREDIENTI: FIORI DI IBISCO BIOLOGICO (non EU).

PREPARAZIONE: Mettere 1 bustina di tè in una tazza. Aggiungere acqua bollente e lasciare in infusione per 5-7 minuti.

COME GUSTARE L-DRINK: Seguire le istruzioni per preparare L-DRINK. Aggiungere la bustina di tè al mix nella bottiglia. Lasciare il tè in infusione per tutto il tempo che si desidera.

CONSERVAZIONE: Conservare in luogo fresco e asciutto.

PRODOTTO IN USA CON INGREDIENTI  
PROVENIENTI DALL'EGITTO.

Peso Netto 1,4g 

## TISANA MENTA LIMONE


INGREDIENTI: FOGLIE DI MENTA BIOLOGICA (non EU), SCORZA DI LIMONE BIOLOGICO, CITRONELLA BIOLOGICA.

PREPARAZIONE: Mettere 1 bustina di tè in una tazza. Aggiungere acqua bollente e lasciare in infusione per 5-7 minuti.

COME GUSTARE L-DRINK: Seguire le istruzioni per preparare L-DRINK. Aggiungere la bustina di tè al mix nella bottiglia. Lasciare il tè in infusione per tutto il tempo che si desidera.

CONSERVAZIONE: Conservare in luogo fresco e asciutto.

PRODOTTO IN USA CON INGREDIENTI  
PROVENIENTI DALL'EGITTO E DALL'AUSTRALIA.

Peso Netto 1,4g 

## **Supplementi forniti nel kit “S” (braccio sperimentale)**

### **CAFFEINE FOOD SUPPLEMENT**

INGREDIENTS: Caffeine (25 mg); OTHER INGREDIENTS: Excipient for capsules Nolat.  
Directions: Three after breakfast and two after lunch, preferably within 2 pm. 110 X 0,26 g  
CAPSULES NET WT 29 g

Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy  
Manufactured in: Viale Indro Montanelli, 131/133, 00168 Roma, Italy

### **RAW DARK CHOCOLATE 85%**

INGREDIENTS: raw cacao mass\*, coconut sugar\* (15%), raw cacao butter\*. \*Organic May contain traces of tree nuts, peanuts and sesame seeds. NET WT 30 g

Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy  
Manufactured in: Via del commercio 16, 37066 Sommacampagna (VR), Italy

Nutrition Information:

TYPICAL VALUES	100 g	Serving size:30g	%RI° serving size
ENERGY	687 kcal	206 kcal	
TOTAL FAT	54,9 g	16,5 g	25%
of which: saturates	35 g	10,5 g	53%
CARBOHYDRATE	32,6 g	9,8 g	3%
of which: sugars	12,5g	3,7 g	
FIBER	15,1 g	4,5 g	18%
PROTEIN	8,1 g	2,4 g	5%
SODIUM	36,9 mg	11,1 mg	0,5%

°Reference Intake of an average adult (8400 kJ/2000 kcal)

### **ALMOND AND CACAO SPREAD**

INGREDIENTS: coconut oil\*, almond flour\*, coconut sugar\*, cacao powder\*, puffed quinoa\*, psyllium husk\*. Organic\*

Allergy advice: for allergens, see ingredients in bold. NET WT 40 g

Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy  
Manufactured in: Via del commercio 16, 37066 Sommacampagna (VR), Italy

Nutrition Information:

TYPICAL VALUES	100 g	Serving size:40 g	%RI° serving size
ENERGY	651 kcal	260 kcal	
TOTAL FAT	55 g	22 g	34%
of which: saturates	45,7 g	18,3 g	91%
CARBOHYDRATE	23,8 g	9,5 g	3%
of which: sugars	11,9 g	4,8 g	
FIBER	11,4 g	4,6 g	18%
PROTEIN	9,4 g	3,7 g	7%
SODIUM	21,5 mg	8,6 mg	0,4%

°Reference Intake of an average adult (8400 kJ/2000 kcal)

### **EXTRA-VIRGIN OLIVE OIL**

100% italian product, 12 ml

Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy  
Manufactured in: Zona Artigianale Casale-64026 Roseto Degli Abruzzi (TE), Italy

Nutrition Information:

TYPICAL VALUES	100 ml	Serving size:12 ml
ENERGY	824 kcal	99 kcal
TOTAL FAT	91,6 g	11 g

of which: saturates	14 g	1,7 g
CARBOHYDRATE	0 g	0 g
of which: sugars	0 g	0 g
PROTEIN	0 g	0 g
SALT	0 g	0 g

### **NUT CLUSTERS**

INGREDIENTS: almond flour, macadamia nuts, coconut flower nectar, pecan nuts, desiccated coconut, flaxseed protein, coconut oil, vanilla extract, salt.

Allergy advice: for allergens, see ingredients in bold. NET WT 45 g

Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy

Manufactured in: Via del commercio 16, 37066 Sommacampagna (VR), Italy

### Nutrition Information:

TYPICAL VALUES	100 g	Serving size: 45 g	%RI° serving size
ENERGY	664 kcal	299 kcal	
TOTAL FAT	52 g	23,4 g	36%
of which: saturates	12,3 g	5,5 g	28%
CARBOHYDRATE	31,7 g	14,2 g	5%
of which: sugars	11,9 g	5,3 g	
FIBER	10,9 g	4,9 g	20%
PROTEIN	12,1 g	5,5 g	11%
SODIUM	7,8 mg	3,5 mg	0,2%

<sup>°</sup>Reference Intake of an average adult (8400 kJ/2000 kcal)

## ProlonAD Patient supply

(x 1 patient x 1 month)

### Per paziente AD FMD:

1. Kit Prolon: 1 unita';
2. Una scatola per la dieta integrativa e supplementare contenente:

Nome Prodotto	Unita'	# porzioni totali
EVOO	12ml packets	27
Almond and cacao spread	Jar 40g	9
Nut-based Bar	46g	9
Raw dark chocolate 85%	30g	9
Nut Clusters	45g	5
Caffeine Food Supplements 25mg	Bottiglia da 110 capsule	2
Olio d'alga	1 capsula o gelatina per bustina	31



## ProlonAD kit instructions «S» box

### Istruzioni - S

Istruzioni	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
<b>Dieta</b>	normale/DMD	normale/DMD	normale/DMD	normale/DMD	normale/DMD	normale/DMD	normale/DMD
<b>Dopo colazione</b>	<b>Quantità</b> 3 Capsule di caffeina	<b>Quantità</b> 3 Capsule di caffeina	<b>Quantità</b> 3 Capsule di caffeina	<b>Quantità</b> 3 Capsule di caffeina	<b>Quantità</b> 3 Capsule di caffeina	<b>Quantità</b> 3 Capsule di caffeina	<b>Quantità</b> 3 Capsule di caffeina
<b>Dopo pranzo entro le 14.00</b>	2 Capsule di caffeina	2 Capsule di caffeina	2 Capsule di caffeina 1 Cioccolato crudo fondente 85%	2 Capsule di caffeina	2 Capsule di caffeina	2 Capsule di caffeina	2 Capsule di caffeina 1 Cioccolato crudo fondente 85%
<b>A piacere nell'arco della giornata</b>	1 Olio extra-vergine di oliva 1 Crema mandorle e cacao	1 Olio extra-vergine di oliva 1 L-Bar Barretta alle noci	1 Olio extra-vergine di oliva	1 Nut cluster	1 Olio extra-vergine di oliva 1 Crema mandorle e cacao	1 Olio extra-vergine di oliva 1 L-Bar Barretta alle noci	1 Olio extra-vergine di oliva
<b>Entro 1h da pranzo/cena</b>	1 Algal oil	1 Algal oil	1 Algal oil	1 Algal oil	1 Algal oil	1 Algal oil	1 Algal oil
Consumare i pasti entro 3 ore prima di andare a dormire							

### **Dettaglio dieta placebo**

La dieta “placebo” assegnata ai pazienti nel braccio di controllo consiste semplicemente nell’assunzione di un pasto sostitutivo a base di pasta, riso e vegetali (es. asparagi o pomodoro), pesce, olio d’oliva, frutta, da circa 600-800

Kcal in sostituzione del pranzo o della cena per cinque giorni al mese. Per esempio includerà risotto al pomodoro, olio d’oliva e barretta. Non sono previsti supplementi per il gruppo placebo. I pasti sostitutivi sono i seguenti:

### **RISOTTO WITH ASPARAGUS (PLACEBO)**

INGREDIENTS: parboiled rice, rice flour, dried and freeze dried asparagus, salt, tapioca starch, potato maltodextrin, yeast extract, flavors, sugar, dried onion, dried parsley. NET WT 75 g. Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy Manufactured in: Antaar&s S.p.A., Via A. Moro 3, Cava Manara, 27051 (PV), Italy

Nutrition Information:

TYPICAL VALUES	100 g	Serving size:75 g	%RI° serving size
ENERGY	372 kcal	279 kcal	14%
TOTAL FAT	3,1 g	2,3 g	3%
of which: saturates	1,4 g	1,1 g	5%
CARBOHYDRATE	74,6 g	65 g	22%
of which: sugars	5,1 g	3,8 g	4%
FIBER	6,5 g	4,9 g	20%
PROTEIN	8,2 g	6,2 g	12%
SALT	3,3 g	1,7 g	29%

*°Reference Intake of an average adult (8400 kJ/2000 kcal)*

### **RISOTTO WITH TOMATO (PLACEBO)**

INGREDIENTS: parboiled rice, dried tomato, sugar, corn starch, rice flour, salt, potato maltodextrin, yeast extract, onion, flavourings, dried basil, tumeric. NET WT 75 g Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy Manufactured in: Antaar&s S.p.A., Via A. Moro 3, Cava Manara, 27051 (PV), Italy

Nutrition Information:

TYPICAL VALUES	100 g	Serving size:75 g	%RI° serving size
ENERGY	359 kcal	269 kcal	14%
TOTAL FAT	1,2 g	0,9 g	1%
of which: saturates	0,3 g	0,2 g	1%
CARBOHYDRATE	76,7 g	57,5 g	22%
FIBER	5,2 g	3,9 g	16%
PROTEIN	7,6 g	5,7 g	11%
SALT	3,5 g	3,5 g	44%

*°Reference Intake of an average adult (8400 kJ/2000 kcal)*

### **PASTA PARMIGIANA (PLACEBO)**

INGREDIENTS: Durum wheat pasta 79%, cheese powder 7.5% (cheese, whey, flavourings salt), skimmed milk powder, rice flour, salt, lactose, corn starch, dried onion, yeast extract, flavourings, dried parsley. Allergy advice: for allergens, see ingredients in bold. NET WT 87,5 g Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy Manufactured in: Antaar&s S.p.A., Via A. Moro 3, Cava Manara, 27051 (PV), Italy

Nutrition Information:

TYPICAL VALUES	100 g
ENERGY	359 kcal
TOTAL FAT	2,8 g
of which: saturates	1,5 g

CARBOHYDRATE	67,1 g
of which: sugars	9,8 g
FIBER	4,5 g
PROTEIN	11,8 g
SALT	5,76 g

### **PASTA CARBONARA (PLACEBO)**

INGREDIENTS: durum wheat pasta 81.1%, skimmed milk powder, cheese powder 2.6% (cheese, whey, flavourings, salt), lactose, rice flour, salt, corn starch, flavourings, dehydrated onion, yeast extract, whole egg powder 0.5%, paprika, dehydrated parsley, turmeric. Allergy advice: for allergens, see ingredients in bold. NET WT 87,5 g

Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy  
 Manufactured in: Antaar&s S.p.A., Via A. Moro 3, Cava Manara, 27051 (PV), Italy

Nutrition Information:

<b>TYPICAL VALUES</b>	<b>100 g</b>
ENERGY	337 kcal
TOTAL FAT	1,8 g
of which: saturates	0,9 g
CARBOHYDRATE	66 g
of which: sugars	9,2 g
FIBER	6 g
PROTEIN	11,2 g
SALT	2,07 g

### **PASTA WITH SEAFOOD (PLACEBO)**

INGREDIENTS: Durum wheat pasta 80.2% dried and freeze-dried molluscs and crustaceans 3% (shrimps, clams), dried tomato, rice flour, salt, corn starch, skimmed milk powder, dried carrot, flavourings, yeast extract, fish stock (salt, fish and dried crustaceans, lactose, vegetable extract, sunflower oil, dried vegetables (celery), white wine, natural flavors, spices), dried white wine, dried garlic, dried parsley. Allergy advice: for allergens, see ingredients in bold. NET WT 87,5 g

Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy  
 Manufactured in: Antaar&s S.p.A., Via A. Moro 3, Cava Manara, 27051 (PV), Italy

Nutrition Information:

<b>TYPICAL VALUES</b>	<b>100 g</b>
ENERGY	343 kcal
TOTAL FAT	1,6 g
of which: saturates	0,6 g
CARBOHYDRATE	64,7 g
of which: sugars	8 g
FIBER	6,1 g
PROTEIN	14,5 g
SALT	3,6 g

### **PLACEBO BAR**

INGREDIENTS: dates, coconut flakes, cashews, cacao powder. NET WT 50 g

Manufactured for: L-Nutra Italia S.r.l. Via XX Settembre 12/2E, 16121 Genova, Italy  
 Manufactured in: Via del commercio 16, 37066 Sommacampagna (VR), Italy

Nutrition Information:

<b>TYPICAL VALUES</b>	<b>100 g</b>
ENERGY	367,9 kcal

TOTAL FAT	19,92 g
of which: saturates	11,86 g
CARBOHYDRATE	43,5 g
of which: sugars	39,14 g
FIBER	8,26 g
PROTEIN	6,28 g
SODIUM	10,2 mg

## Placebo Patient supply

(x 1 patient x 1 month)

Per paziente AD PLACEBO:

1. Una scatola per la dieta placebo integrativa contenente:

Nome Prodotto	Unita'	# porzioni totali
EVOO	12ml packets	5
Risotto with Asparagus	75g	1
Risotto with Tomatoes	75g	1
Pasta Parmigiana	95g	1
Pasta Carbonara	95g	1
Pasta with Sea food	95g	1
Barretta snack	35g	10

## Placebo kit instructions «B» box

### Istruzioni - B

Istruzioni	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
	Quantità	Quantità	Quantità	Quantità	Quantità
In sostituzione di pranzo o cena a scelta	2 Barretta	2 Barretta	2 Barretta	2 Barretta	2 Barretta
	1 Risotto asparagi (asparagus)	1 Risotto pomodoro (tomato)	1 Pasta carbonara	1 Pasta parmigiana	1 Pasta frutti di mare
	1 Olio extra-vergine di oliva	1 Olio extra-vergine di oliva	1 Olio extra-vergine di oliva	1 Olio extra-vergine di oliva	1 Olio extra-vergine di oliva

### **Valutazione dello stato nutrizionale**

È stato previsto il coinvolgimento di un esperto nutrizionista, il quale ha preso parte alla selezione dei pazienti e al loro attento monitoraggio nel corso della sperimentazione anche al fine di evitare effetti collaterali della dieta ipoproteica. Il nutrizionista coinvolto nello studio ha effettuato la valutazione dello stato nutrizionale dei pazienti all'arruolamento (tramite valutazione clinica e del peso, bioimpedenziometria, dinamometria) e nel corso della sperimentazione (prima di ogni ciclo di ProlonAD™ o di dieta placebo), e ha fornito al paziente le raccomandazioni dietetiche e di stile di vita (ad es. attività fisica/training muscolare) utili particolarmente a garantire ai pazienti assegnati a ricevere ProlonAD™ un pronto recupero del peso e della massa magra eventualmente persi a seguito della FMD stessa. Prima di ogni ciclo di FMD/dieta placebo i pazienti sono stati sottoposti ad una visita medica che ha incluso la valutazione di peso corporeo, parametri vitali e composizione corporea mediante utilizzo di bioimpedenziometro.

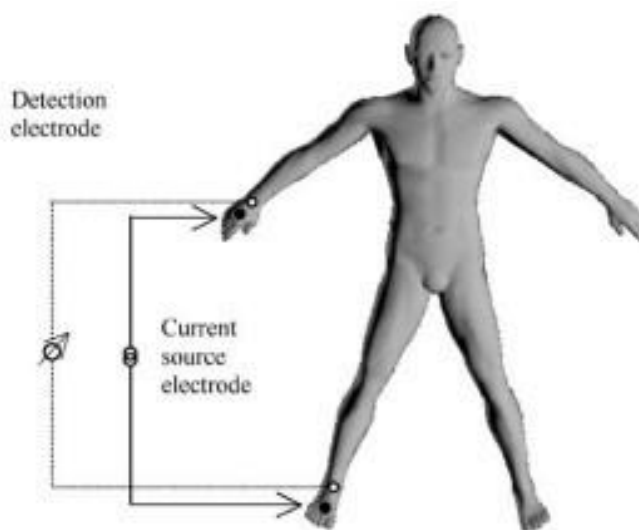
Lo stato nutrizionale è stato valutato all'arruolamento e prima dell'inizio di ogni ciclo di FMD, raccolto secondo le linee guida internazionali<sup>200, 201, 202</sup>.

Il nutrizionista è intervenuto con integrazione nutrizionale di aminoacidi in rare occasioni e per un tempo limitato per due pazienti del braccio di controllo reclutati a Genova che avevano manifestato deterioramento dello stato nutrizionale.

Sono stati raccolti i seguenti dati antropometrici: peso, BMI (peso/altezza<sup>2</sup>, kg/m<sup>2</sup>). La composizione corporea è stata valutata dopo almeno tre ore di digiuno con l'uso di un analizzatore di bioimpedenza a singola frequenza (Single Frequency Bioimpedance Analyzer, SF-BIA, BIA 101®, Akern, Firenze, Italy) applicando gli elettrodi sul lato destro del paziente, due a livello di mano e polso e due a livello di piede e caviglia. Le misure di impedenza

bioelettrica sono state successivamente elaborate con il software Bodygram Plus® (Akern, Firenze, Italia).

È stata effettuata un'analisi qualitativa diretta dei tessuti con la tecnica vettoriale Biavector® e un'analisi quantitativa tricompartmentale con formule predittive e valori di riferimento specifici per la popolazione adulta. La calibrazione esterna dell'analizzatore viene controllata periodicamente utilizzando un circuito di calibrazione dell'impedenza ( $R = 470 \Omega$  e  $X_c = 90 \Omega$ ).



Posizione standard degli elettrodi alla mano, al polso, al piede e alla caviglia nella BIA singola e multifrequenza

La BIA si basa sul principio che le diverse tipologie di tessuto esprimono una conduttività elettrica specifica, tale da renderle riconoscibili. Tutte le strutture biologiche oppongono una forza al flusso di correnti continue o alternate che le attraversano, generando una impedenza. L'impedenza ( $Z$ ), misurata dal bioimpedenziometro, dipende da resistenza ( $R_z$ ) e reattanza ( $X_c$ ).

In particolare l'acqua è un ottimo conduttore di corrente elettrica (bassa resistenza), le cellule funzionano come dei condensatori che accumulano e sfasano la corrente (reattanza), mentre il grasso e le ossa sono cattivi conduttori (alta resistenza). La resistenza è inversamente proporzionale alla quantità di fluidi corporei (più ce ne sono e minore è  $R_z$ ), mentre la



Reattanza dipende essenzialmente dalla Massa Cellulare Attiva (ATM) o Body Cellular Mass (BCM).

Nel corpo umano sano la Resistenza contribuisce per ben il 98% all'Impedenza, mentre la Reattanza incide su di essa per il 2%<sup>203</sup>.

Le misurazioni effettuate sui pazienti ad ogni nuovo ciclo grazie alla BIA sono dunque fondamentali per seguire l'andamento nel tempo di parametri fondamentali come il loro stato di idratazione ed i rapporti tra massa grassa e magra. In particolare nel presente studio sono stati valutati i seguenti parametri:

### **Angolo di Fase (PhA)**

L' Angolo di fase rappresenta il rapporto tra la Resistenza e la Reattanza (Fluidi e Membrane cellulari).

Può essere considerato un ottimo indicatore dello stato fisico e dell'integrità cellulare in quanto un basso valore di angolo di fase è correlato con una incapacità delle cellule ad immagazzinare energia offrendo un'informazione sulla scarsa permeabilità delle membrane cellulari. Un elevato angolo di fase invece può essere correlato a grandi quantità di membrane cellulari intatte e BCM massa cellulare oppure a disidratazione. E' un marker ampiamente utilizzato per valutare lo stato nutrizionale.

### **Valori indicativi dell'angolo di fase**

Donne	Uomini	Valutazione
> 7,5	> 7,9	"Eccellente" I valori estremamente alti generalmente si rilevano negli atleti. Alternativamente è indice di forte disidratazione.
6,5 – 7,5	7,0 – 7,9	"Molto buono": Questi valori possono indicare condizioni nutrizionali e fisiche eccellenti (o disidratazione).
6,0 – 6,4	6,5 – 6,9	"Buono". I valori in questo intervallo sono solitamente indicativi di allenamento regolare e buon apporto nutrizionale
5,5 – 5,9	6,0 – 6,4	"Soddisfacente". Valori comuni nella maggioranza della popolazione. Indicano una moderata attività fisica e un apporto nutrizionale sufficiente..
5,0 – 5,4	5,5 – 5,9	"Sufficiente". I valori indicano un livello nutrizionale e una

		condizione fisica appena sufficiente. Spesso tali valori vengono riscontrati in caso di alimentazione squilibrata e attività fisica insufficiente. Raccomandato un monitoraggio e relativa consultazione medico / dietetica.
4,0 – 4,9	3,5 – 4,4	"Insoddisfacente" Valori presenti nei soggetti con uno stato nutrizionale carente, alimentazione inadeguata e con una mobilità limitata. Raccomandata consultazione medico/dietetica

Valori sotto a 5° sono generalmente indice di rottura delle membrane cellulari / accumulo di fluidi extracellulari (ritenzione idrica).

### **Massa grassa (FM)**

Rappresenta la quantità totale di lipidi estraibili dal corpo umano (grasso primario o essenziale + grasso di deposito). Una massa grassa inferiore al 3% nell'uomo ed al 12% nella donna non è compatibile con una buona salute.

### **Massa magra alipidica (FFM)**

Rappresenta tutto ciò che resta dell'organismo dopo averlo privato di tutta la sua componente lipidica, compreso il grasso primario o essenziale (che protegge gli organi interni, costituisce il midollo osseo, le ghiandole mammarie ed è presente in vari tessuti).

### **Handgrip Strength Test**

Il test è utile per valutare l'andamento della forza muscolare nei soggetti tra un ciclo e l'altro. È stata valutata la forza bilaterale di presa della mano con il test dell'impugnatura (*handgrip strenght*)\* utilizzando un dinamometro a presa (T.K.K.5001 GRIP A Hand Grip Analogue Dynamometer, Takei, Japan). Con il paziente seduto su una sedia dallo schienale dritto con i piedi appoggiati sul pavimento, il gomito flesso a 90° gradi e con il braccio del paziente non supportato dall'esaminatore o da un bracciolo.



\* Questa misurazione è disponibile unicamente per i pazienti arruolati a Genova, pertanto è stata esclusa dalle statistiche finali.

### **Analisi biochimiche**

All'arruolamento i pazienti sono stati sottoposti ad un primo prelievo di sangue che è stato successivamente ripetuto, a volte prima di ogni ciclo di FMD/dieta placebo, più frequentemente ogni due cicli, con provette aggiuntive a 6 e 12 mesi dall'inizio dello studio. Tali prelievi sono intesi a valutare l'impatto della FMD su parametri metabolici, fattori di crescita e citochine, su marcatori di stress ossidativo e di danno assonale (tramite il dosaggio della proteina del neurofilamento, Neurofilament Light Chain), e inoltre l'attività telomerasica su linfociti.

Verrà inoltre determinato per ogni paziente il genotipo dell'APOE (isoforme  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ), previa raccolta della firma del consenso informato specifico per l'analisi genetica, oltre a un elettrocardiogramma basale.

Tutti i prelievi sono conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  in vista delle analisi previste dopo il completamento della sperimentazione da parte di tutti i partecipanti.

### **Valutazione dello stato emotivo, cognitivo e funzionale**

In vista delle valutazioni riguardo agli obiettivi secondari e a salvaguardia dei pazienti nel corso della sperimentazione, sono stati eseguiti test sullo stato emotivo, cognitivo e funzionale all'arruolamento e ai cicli 6 e 12 della dieta (T0, T6, T12). La qualità di vita dei pazienti è stata valutata tramite compilazione di questionario QLQ-AD prima di ogni ciclo di dieta (ProlonAD™ o placebo).

La memoria episodica (FCRST), lo stato emotivo (CESD-R), lo stato cognitivo e funzionale (MMSE, CDR-Sum of the boxes, Barthel Index, IADL), lo stress del caregiver (Caregiver Burden Inventory e NPI) e l'indice di fragilità (FI di Rockwood)<sup>204</sup> sono stati valutati all'arruolamento e poi al 6° ed al 12° mese in tutti i pazienti arruolati in questo protocollo.

### **Analisi statistiche**

Le analisi statistiche sono state effettuate con il software open source RStudio (<https://www.rstudio.com/>).

È stato considerato significativo un p value  $< 0,05$ . Dato che la sperimentazione è tuttora in corso non è stato possibile fare alcuna statistica sulle analisi biochimiche, dato che queste verranno effettuate solo al termine della sperimentazione.

Statistiche sulle caratteristiche generali dei pazienti arruolati sono state effettuate allo scopo di verificare la corretta assegnazione randomica degli stessi ai due bracci, sperimentale e controllo. Tutti i dati nella tabella "Caratteristiche generali dei pazienti arruolati" si riferiscono dunque ai dati rilevati in fase di arruolamento (T0).

Per i dati nutrizionali sono stati presi in considerazione Peso, PhA, FM e FMM al T0 e all'ultima visita per i due gruppi alla ricerca di una possibile correlazione tra questi ed il procedere delle diete. I risultati verranno discussi più avanti.

### **Risultati e discussione**

I pazienti oggetto di uno studio su aMCI e AD fanno parte di una categoria di soggetti particolarmente fragili. In quanto anziani questi pazienti necessitano più di altri di una attenta e costante valutazione del quadro nutrizionale. Il paziente anziano difatti è a rischio malnutrizione a causa di tutta una serie di possibili concause correlate con l'invecchiamento:

- alterato senso di fame o sazietà
- condizioni sociali/economiche che aumentano il rischio di malnutrizione
- compromissione della corretta idratazione
- aumento dello stato di ossidazione e infiammazione sistemica
- difficoltà nella masticazione e/o nella deglutizione
- diminuzione dell'attività fisica
- diminuzione della massa magra
- aumento della massa grassa
- aumentata necessità di proteine
- comorbilità e ospedalizzazioni

Per minimizzare il rischio implicito di cicli periodici di FMD i pazienti sono stati seguiti da un medico geriatra e da un nutrizionista durante l'intero corso della sperimentazione mediante visite di controllo ogni 1-2 cicli oltre a regolari verifiche telefoniche durante i 5 giorni della dieta FMD.

Un altro aspetto importante che ha garantito la conduzione sicura dello studio è stato lo stretto follow-up nutrizionale medico effettuato prima e durante la somministrazione di ogni ciclo di FMD. Questo ha permesso di identificare precocemente cambiamenti di peso e/o di composizione corporea e di intervenire precocemente per mantenere o ripristinare la FFM.

### Caratteristiche dei pazienti

Da gennaio 2020 a luglio 2022 sono stati arruolati 40 pazienti. Da segnalare che arruolamento e tabella di marcia del trial

placebo (58.8%) e 23 femmine (57.5%) di cui 13 (56.5%) ProlonAD™ e 10 (43.5%) placebo.

All'arruolamento 7 pazienti erano affetti da AD (17.5%), 33 da aMCI (82.5%).

15 pazienti sono stati arruolati a Genova, 25 a Perugia.

Come da protocollo lo studio si è rivolto a 40 pazienti compresi nella fascia di età 55-80 anni. Da notare che l'età media dei 40 pazienti arruolati si è effettivamente posizionata nella fascia alta di tale intervallo, essendo di 72.3 anni.

Il dato relativo all'età media elevata dei pazienti amplifica tutte le problematiche correlate ad un trial sull'alimentazione e rende in parte conto della percentuale di pazienti che, a vario titolo, non hanno completato la sperimentazione, sia per le caratteristiche fisiologiche del paziente anziano sia perché pazienti meno in grado di apprezzare un beneficio / miglioramento della propria condizione sono

	<b>ProlonAD (N=20)</b>	<b>Dieta placebo (N=20)</b>	<b>p-value</b>
Età (anni)	72.3 (DS 7.0)	72.3 (DS 5.6)	0.94
Uomo, n (%)	7 (35%)	10 (50%)	0.34
Donna, n (%)	13 (65%)	10 (50%)	0.34
aMCI, n (%)	15 (75%)	17 (85%)	0.43
AD, n (%)	5 (25%)	3 (15%)	0.43
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	24.8 (DS 4.0)	26.6 (DS 4.6)	0.17
Angolo di fase (PhA °)	4.6 (DS 1.1)	4.5 (DS 0.7)	0.81

*Caratteristiche generali dei pazienti arruolati*

hanno subito rallentamenti a causa della pandemia di Covid-19. I pazienti che sono stati arruolati a luglio 2022 dovrebbero

comprensibilmente poco incentivati a proseguire in un trial di 12 mesi basato sulla auto-somministrazione di una dieta

	<b>ProlonAD (N=20)</b>	<b>Dieta placebo (N=20)</b>
12 cicli completati	8	9
Abbandoni (dropout/eventi avversi)	7	8
Ongoing	5	3

*Stato della sperimentazione*

pertanto completare i 12 cicli mensili previsti non prima di luglio 2023.

Dei 40 pazienti, 20 sono stati assegnati al braccio sperimentale e 20 a quello di controllo. 17 pazienti erano maschi (42.5%), di cui 7 ProlonAD™ (41.2%) e 10

non particolarmente appetibile.

### Endpoint primario: fattibilità

L'endpoint primario includeva la valutazione di fattibilità e sicurezza dei dodici cicli di ProlonAD™ sia in pazienti

affetti da aMCI che in pazienti affetti da AD lieve.

La fattibilità era definita come l'assunzione di almeno un ciclo di FMD ogni due mesi con la possibilità di ammettere il consumo di solo il 50% della dieta prevista e/o un consumo massimo di 10 Kcal/kg di cibo non previsto in uno solo tra i giorni 1-5 di ogni ciclo.

Nessuno dei partecipanti che hanno concluso positivamente i 12 cicli del trial ha assunto alimenti, in più o in meno, nella misura indicata dai parametri suesposti. Qualche paziente si è limitato ad assumere saltuariamente qualche alimento extra e qualcuno ha saltuariamente ommesso di assumere parte dei supplementi, in tutti i casi rimanendo ampiamente all'interno dei parametri richiesti dalla sperimentazione.

Ciò premesso, dei 20 pazienti iniziali assegnati al braccio sperimentale, 8 (40%), hanno concluso la sperimentazione completando i cicli previsti, 7 (35%) hanno abbandonato a vario titolo la sperimentazione, 5 (25%) sono ancora attivi. Da una prima valutazione su questi dati ancora necessariamente parziali sembra di poter affermare che la fattibilità sia stata dimostrata in quanto non sussiste alcuna significativa differenza con il braccio di controllo.

Una valutazione più estesa, comprensiva dei pazienti che hanno assunto il placebo, porta ad alcune considerazioni di contorno ma degne di nota.

I pazienti lamentano la scarsa appetibilità della dieta che, combinata con la scarsa motivazione, rende conto di parte della percentuale di pazienti di entrambi i bracci che ad oggi hanno portato a termine il programma.

In particolare diversi pazienti hanno riportato una certa difficoltà, nel tempo, ad assumere tutti i supplementi indicati (rammentiamo che ai partecipanti al braccio sperimentale è stato richiesto di consumare quotidianamente i supplementi indicati per 12 mesi). Stiamo parlando di pazienti anziani che dunque difficilmente sono propensi a fare sacrifici alimentari per un periodo di 12 mesi.

Tra i supplementi che hanno presentato minore appetibilità troviamo le barrette alle noci in quanto "secche, asciutte, difficili da masticare e ingoiare" (di nuovo, una dieta indirizzata a pazienti anziani non può non prendere in considerazione più che probabili difficoltà di masticazione e deglutizione) e, a seguire il cacao 85% e la crema mandorle e cacao.

Come nota a margine si segnala infine un problema di comprensione delle istruzioni da parte di alcuni pazienti che lamentano essere scritte con caratteri troppo piccoli o poco marcati. Anche se i pazienti anziani sono spesso aiutati in casa (e questo era tra i requisiti della sperimentazione), la documentazione fornita con i kit alimentari potrebbe essere resa più facilmente leggibile tenendo presente che le persone anziane hanno con tutta probabilità difficoltà a leggere istruzioni scritte con caratteri piccoli o non particolarmente marcati.

Ad ogni modo i pazienti sono stati costantemente seguiti telefonicamente durante l'intero arco della loro partecipazione da personale qualificato in grado di supportarli nella corretta assunzione delle diete prescritte.

### **Endpoint primario: sicurezza**

Per quanto riguarda la sicurezza l'ipotesi sperimentale era che ProLonAD™ non causasse effetti collaterali severi e che non avesse effetto di detrimento sulla composizione corporea del paziente.

### **Analisi degli eventi avversi**

Gli eventi avversi sono stati registrati ad ogni visita e monitorati per l'intera durata dello studio. Dei 20 pazienti iniziali assegnati al braccio sperimentale, 12 (60%), hanno manifestato eventi avversi di grado 1 o 2 (lieve o moderato). Alcuni di questi pazienti hanno manifestato più eventi avversi. Tra i 20 pazienti assegnati al braccio di controllo si sono verificati eventi avversi G1 in 2 soli casi, pertanto il dato relativo al braccio sperimentale sembra significativo.

La mancanza di severità negli eventi avversi nel braccio sperimentale porta però a concludere che l'ipotesi sperimentale sia stata positivamente verificata.

relativo al peso, peraltro comune ad entrambi i gruppi, il che porta a ritenere che sia scollegato dai cicli di dieta effettuati. Tipicamente i pazienti del braccio

AGE	SEX	P	SIDE EFFECTS
80	M	MCI	Autoimmune disease exacerbation (ocular Pemphigoid – G2)
81	M	MCI	Depression (G1)
71	F	MCI	Headache and Fatigue (G1)
65	F	AD	Vomiting, stomach pain, fatigue (G1)
71	F	MCI	Headache (G2)
77	M	MCI	Aggressiveness and Headache (G2)
76	F	MCI	Insomnia (G1), Haemorrhoids, aerophagy, headache, fatigue, intestinal paine (G1)
59	F	MCI	Hypotension (G2)
55	F	MCI	Tingling (G1)
72	F	AD	Fatigue (G1)
72	F	AD	Fatigue, depression, headache (G1)
76	M	MCI	Fatigue, depression, headache (G1)

12 pazienti del braccio sperimentale hanno manifestato eventi avversi lievi/moderati (G1/G2)

### **Analisi dello stato nutrizionale**

L'endpoint primario relativo alla sicurezza ipotizzava che l'assunzione della dieta sperimentale non provocasse detrimento

sperimentale riportano un senso di sazietà e/o gonfiore durante i cinque giorni di dieta, presumibilmente a causa della maggiore assunzione di liquidi (spesso carente negli anziani) durante il giorno. Alla mattina tale

	ProlonAD			Dieta placebo		
	V0 (Media + DS)	V ultima (media + DS)	p-value	V0 (Media + DS)	V ultima (media + DS)	p-value
<b>PhA</b>	4.6 ± 1.1	4.3 ± 1.0	0.784	4.5 ± 0.7	4.3 ± 0.7	0.459
<b>FM</b>	16.8 ± 10.2	16.2 ± 8.0	0.332	20.4 ± 10.2	20.5 ± 11.1	0.826
<b>FFM</b>	47.8 ± 8.2	47.6 ± 6.6	1	51.3 ± 10.0	50.5 ± 9.7	0.946
<b>Weight</b>	64.7 ± 10.3	63 ± 9.5	0.03	71.7 ± 15.5	70.8 ± 16.0	0.0251

sulla composizione corporea del paziente. L'andamento dello stato nutrizionale è stato pertanto valutato durante l'intera sperimentazione mediante esame medico obiettivo e per mezzo della misurazione del peso e dei parametri forniti dalla BIA ad ogni visita di controllo (ogni 1-2 cicli di dieta FMD).

L'analisi statistica dei dati nutrizionali ha riguardato i valori di PhA, Peso, FM e FFM misurati rispettivamente all'arruolamento e all'ultima visita, indipendentemente dal numero di cicli effettuati. Su tali valori è stato effettuato un test Wilcoxon Signed-Rank e, come evidenziato dalla tabella relativa l'unico dato statisticamente significativo è risultato essere quello

sensazione è scomparsa. Al termine di ogni ciclo di cinque giorni di dieta ProlonAD™ i pazienti riportano una perdita di peso pari a 2-3 kg. Ritornando alla alimentazione normale tale perdita viene solitamente completamente recuperata rapidamente.

### **Endpoint secondari**

Lo studio si proponeva di valutare come obiettivo secondario l'efficacia della dieta a base di ProlonAD™ rispetto alla dieta di controllo mediante la valutazione di una serie di test neuropsicologici.

I risultati, riassunti in tabella, mostrano una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi per quanto riguarda gli indici

Totale e Visuo-spaziale del test cognitivo ACE-R (Addenbrooke's Cognitive Examination Revised), una batteria di primo livello sviluppata per distinguere l'MCI dai cambiamenti cognitivi dell'invecchiamento normale e dai diversi tipi di demenza <sup>205</sup>. Sulla base di tali dati, che rammentiamo al momento essere parziali, e in mancanza di qualunque riscontro da parte degli esami biochimici sui prelievi ematici, al momento non ancora effettuati, sembra dunque che i pazienti facenti parte del braccio sperimentale mostrino un effetto di beneficio sulla loro performance cognitiva statisticamente significativo rispetto al braccio di controllo.

## Conclusioni e prospettive

Dai dati raccolti fino ad oggi l'FMD è risultata fattibile, sicura ed efficace in diversi modelli animali. Inoltre diete basate su forme di digiuno intermittente sono state

tuttora in corso, con 8 pazienti ancora attivi sui 40 arruolati e i risultati definitivi non saranno disponibili prima di luglio 2023. Risultati più chiari, soprattutto per quanto riguarda gli obiettivi secondari della sperimentazione, saranno possibili dopo le relative analisi.

Una nota importante riguarda la *compliance*, che riveste una particolare importanza per la valutazione di una dieta che viene consegnata al paziente che si incarica di assumerla in totale autonomia: sarebbe opportuno prevedere una qualche valutazione della *compliance* che integri le interviste telefoniche durante i cinque giorni e quella alla consegna del kit successivo, con un metodo meno empirico, ad esempio mediante valutazione dei corpi chetonici all'ultimo giorno del kit.

Ciò premesso lo studio sui dati parziali al momento disponibili sembra confermare la

### Dati neuropsicologici

	ProLonAD™ ΔT6-T0	p-value	Dieta placebo ΔT6-T0	p-value
MMSE	0.6 ± 1.2	0.20	0.3 ± 1.6	0.48
ACE-R (Totale)	1.0 ± 4.4	0.57	-2.4 ± 3.7	<0.05
ACE-R (Attenzione ed Orientamento)	0.3 ± 0.9	0.59	0.2 ± 0.7	0.59
ACE-R (Memoria)	1.0 ± 3.1	0.47	-0.8 ± 3.8	0.55
ACE-R (Fluenza)	0.1 ± 1.6	1	0.3 ± 2.1	0.60
ACE-R (Linguaggio)	-0.4 ± 0.7	0.37	0.6 ± 2.4	0.85
ACE-R (Visuo-spaziale)	0.1 ± 1.2	0.89	-1.2 ± 1.4	<0.05
CES-D	-4.8 ± 9.9	0.40	1.1 ± 7.7	0.66
QoL AD (Paziente)	-0.1 ± 2.7	0.94	0.9 ± 10.2	0.97

Confrontando i ΔT6-T0 di ACE-R (Totale) tra i due gruppi risulta una differenza statisticamente significativa (p<0.05).

testate con risultati promettenti anche su soggetti umani, sia sani che affetti da diverse patologie <sup>35, 206, 207, 208, 209, 210</sup>. Il presente studio è il primo a valutare la fattibilità e la sicurezza di una FMD nel trattamento di aMCI e AD. Lo studio è

fattibilità della dieta ProLonAD™ in pazienti affetti da aMCI e AD lieve sotto attenta e costante valutazione nutrizionale, presentando un profilo di sicurezza buono con eventi avversi di bassa gravità e un numero di pazienti che peggiorano dal

punto di vista nutrizionale e abbandonano lo studio sostanzialmente comparabile al gruppo di controllo. Ulteriori studi clinici sono necessari per confermare la potenziale utilità di questo tipo di regime alimentare per contrastare il decadimento cognitivo in pazienti con aMCI o AD.



# Bibliografia

<sup>1</sup> [Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome.](#)

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Arch Neurol. 1999 Mar;56(3):303-8. doi: 10.1001/archneur.56.3.303. PMID: 10190820

<sup>2</sup> [Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials.](#)

Grundman M, Petersen RC, Ferris SH, Thomas RG, Aisen PS, Bennett DA, Foster NL, Jack CR Jr, Galasko DR, Doody R, Kaye J, Sano M, Mohs R, Gauthier S, Kim HT, Jin S, Schultz AN, Schafer K, Mulnard R, van Dyck CH, Mintzer J, Zamrini EY, Cahn-Weiner D, Thal LJ; Alzheimer's Disease Cooperative Study. Arch Neurol. 2004 Jan;61(1):59-66. doi: 10.1001/archneur.61.1.59. PMID: 14732621

<sup>3</sup> [Nutrition in medical education: a systematic review.](#)

Crowley J, Ball L, Hiddink GJ. Lancet Planet Health. 2019 Sep;3(9):e379-e389. doi: 10.1016/S2542-5196(19)30171-8. PMID: 31538623

<sup>4</sup> [Successful aging.](#)

Rowe JW, Kahn RL. Gerontologist. 1997 Aug;37(4):433-40. doi: 10.1093/geront/37.4.433. PMID: 9279031

<sup>5</sup> [Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies.](#)

Dinu M, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Sofi F. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017 Nov 22;57(17):3640-3649. doi: 10.1080/10408398.2016.1138447. PMID: 26853923

<sup>6</sup> [Influence of Diet in Multiple Sclerosis: A Systematic Review.](#)

Bagur MJ, Murcia MA, Jiménez-Monreal AM, Tur JA, Bibiloni MM, Alonso GL, Martínez-Tomé M. Adv Nutr. 2017 May 15;8(3):463-472. doi: 10.3945/an.116.014191. Print 2017 May. PMID: 28507011

<sup>7</sup> [Relationships of Dietary Patterns, Foods, and Micro- and Macronutrients with Alzheimer's Disease and Late-Life Cognitive Disorders: A Systematic Review.](#)

Solfrizzi V, Custodero C, Lozupone M, Imbimbo BP, Valiani V, Agosti P, Schilardi A, D'Introno A, La Montagna M, Calvani M, Guerra V, Sardone R, Abbrescia DI, Bellomo A, Greco A, Daniele A, Seripa D, Logroscino G, Sabbà C, Panza F. J Alzheimers Dis. 2017;59(3):815-849. doi: 10.3233/JAD-170248. PMID: 28697569

<sup>8</sup> [An updated systematic review and meta-analysis on adherence to mediterranean diet and risk of cancer.](#)

Morze J, Danielewicz A, Przybyłowicz K, Zeng H, Hoffmann G, Schwingshackl L. Eur J Nutr. 2021 Apr;60(3):1561-1586. doi: 10.1007/s00394-020-02346-6. Epub 2020 Aug 8. PMID: 32770356

<sup>9</sup> [The Effect of the Mediterranean Diet on Metabolic Health: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Trials in Adults.](#)

Papadaki A, Nolen-Doerr E, Mantzoros CS. Nutrients. 2020 Oct 30;12(11):3342. doi: 10.3390/nu12113342. PMID: 33143083

<sup>10</sup> [What determines the basal rate of metabolism?](#)

McNab BK. J Exp Biol. 2019 Aug 6;222(Pt 15):jeb205591. doi: 10.1242/jeb.205591. PMID: 31262787

<sup>11</sup> [Comparison of different methods to estimate BMR in adolescent student population.](#)

Patil SR, Bharadwaj J. Indian J Physiol Pharmacol. 2011 Jan-Mar;55(1):77-83. PMID: 22315814

<sup>12</sup> [Evolution of the diet from the paleolithic to today: progress or regress?.](#)

Chauveau P, Fouque D, Combe C, Aparicio M. Nephrol Ther. 2013 Jul;9(4):202-8. doi: 10.1016/j.nephro.2013.03.011. Epub 2013 May 16. PMID: 23685112

<sup>13</sup> [Intermittent fasting versus continuous energy-restricted diet for patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome for glycemic control: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.](#)

Wang X, Li Q, Liu Y, Jiang H, Chen W. Diabetes Res Clin Pract. 2021 Sep;179:109003. doi: 10.1016/j.diabres.2021.109003. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34391831

<sup>14</sup> [Caloric restriction in humans.](#)

Holloszy JO, Fontana L. Exp Gerontol. 2007 Aug;42(8):709-12. doi: 10.1016/j.exger.2007.03.009. Epub 2007 Mar 31. PMID: 17482403.

<sup>15</sup> [Extending healthy life span--from yeast to humans.](#)

Fontana L, Partridge L, Longo VD. Science. 2010 Apr 16;328(5976):321-6. doi: 10.1126/science.1172539. PMID: 20395504

# Bibliografia

- <sup>16</sup> [Five-day water-only fasting decreased metabolic-syndrome risk factors and increased anti-aging biomarkers without toxicity in a clinical trial of normal-weight individuals.](#)  
Jiang Y, Yang X, Dong C, Lu Y, Yin H, Xiao B, Yang X, Chen W, Cheng W, Tian H, Guo L, Hu X, Fang H, Chen W, Li Z, Zhou W, Sun W, Guo X, Li S, Lin Y, He R, Chen X, Liu D, Zhang M, Zhang Y, Zhao H, Zheng P, Seyfried TN, Hoffman RM, Jia W, Ji G, Jia L. *Clin Transl Med.* 2021 Aug;11(8):e502. doi: 10.1002/ctm2.502. PMID: 34459130
- <sup>17</sup> [Fasting therapy for treating and preventing disease - current state of evidence.](#)  
Michalsen A, Li C. *Forsch Komplementmed.* 2013;20(6):444-53. doi: 10.1159/000357765. Epub 2013 Dec 16. PMID: 24434759
- <sup>18</sup> [Fasting: the history, pathophysiology and complications](#)  
P R Kerndt, J L Naughton, C E Driscoll, D A Loxterkamp, PMID: 6758355, PMCID: [PMC1274154](#)
- <sup>19</sup> D. W. Folin O, "On starvation and obesity, with special reference to acidosis.," *J Biol Chem*, vol. 21, pp. 183–192, 1915.
- <sup>20</sup> [Fasting: molecular mechanisms and clinical applications.](#)  
Longo VD, Mattson MP. *Cell Metab.* 2014 Feb 4;19(2):181-92. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.008. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24440038
- <sup>21</sup> [Safety, health improvement and well-being during a 4 to 21-day fasting period in an observational study including 1422 subjects.](#)  
Wilhelmi de Toledo F, Grundler F, Bergouignan A, Drinda S, Michalsen A. *PLoS One.* 2019 Jan 2;14(1):e0209353. doi: 10.1371/journal.pone.0209353. eCollection 2019. PMID: 30601864
- <sup>22</sup> [Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota.](#)  
Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Salter A, Dorsett Y, Chen L, Phillips D, Weinstock GM, Fontana L, Cross AH, Zhou Y, Piccio L. *Cell Metab.* 2018 Jun 5;27(6):1222-1235.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.006. PMID: 29874567
- <sup>23</sup> [Meal skipping and cognition along a spectrum of restrictive eating.](#)  
Datta N, Bidopia T, Datta S, Mittal G, Alphin F, Marsh EJ, Fitzsimons GJ, Strauman TJ, Zucker NL. *Eat Behav.* 2020 Dec;39:101431. doi: 10.1016/j.eatbeh.2020.101431. Epub 2020 Sep 7. PMID: 32957009
- <sup>24</sup> [Effect of skipping breakfast for 6 days on energy metabolism and diurnal rhythm of blood glucose in young healthy Japanese males.](#)  
Ogata H, Kayaba M, Tanaka Y, Yajima K, Iwayama K, Ando A, Park I, Kiyono K, Omi N, Satoh M, Tokuyama K. *Am J Clin Nutr.* 2019 Jul 1;110(1):41-52. doi: 10.1093/ajcn/nqy346. PMID: 31095288
- <sup>25</sup> [Effect of Alternate-Day Fasting on Weight Loss, Weight Maintenance, and Cardioprotection Among Metabolically Healthy Obese Adults: A Randomized Clinical Trial.](#)  
Trepanowski JF, Kroeger CM, Barnosky A, Klempel MC, Bhutani S, Hoddy KK, Gabel K, Freels S, Rigdon J, Rood J, Ravussin E, Varady KA. *JAMA Intern Med.* 2017 Jul 1;177(7):930-938. doi: 10.1001/jamainternmed.2017.0936. PMID: 28459931
- <sup>26</sup> [Alternate Day Fasting Improves Physiological and Molecular Markers of Aging in Healthy, Non-obese Humans.](#)  
Stekovic S, Hofer SJ, Tripolt N, Aon MA, Royer P, Pein L, Stadler JT, Pendl T, Prietl B, Url J, Schroeder S, Tadic J, Eisenberg T, Magnes C, Stumpe M, Zuegner E, Bordag N, Riedl R, Schmidt A, Kolesnik E, Verheyen N, Springer A, Madl T, Sinner F, de Cabo R, Kroemer G, Obermayer-Pietsch B, Dengjel J, Sourij H, Pieber TR, Madeo F. *Cell Metab.* 2019 Sep 3;30(3):462-476.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2019.07.016. Epub 2019 Aug 27. PMID: 31471173
- <sup>27</sup> [Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma.](#)  
Johnson JB, Summer W, Cutler RG, Martin B, Hyun DH, Dixit VD, Pearson M, Nassar M, Telljohann R, Maudsley S, Carlson O, John S, Laub DR, Mattson MP. *Free Radic Biol Med.* 2007 Mar 1;42(5):665-74. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.005. Epub 2006 Dec 14. PMID: 17291990
- <sup>28</sup> [Corrigendum: Effects of weight loss via high fat vs. low fat alternate day fasting diets on free fatty acid profiles.](#)  
Varady KA, Dam VT, Klempel MC, Horne M, Cruz R, Kroeger CM, Santosa S. *Sci Rep.* 2015 Aug 5;5:8806. doi: 10.1038/srep08806. PMID: 26244425
- <sup>29</sup> [Randomized crossover trial of a modified ketogenic diet in Alzheimer's disease.](#)  
Phillips MCL, Deprez LM, Mortimer GMN, Murtagh DKJ, McCoy S, Mylchreest R, Gilbertson LJ, Clark KM, Simpson PV, McManus EJ, Oh JE, Yadavaraj S, King VM, Pillai A, Romero-Ferrando B, Brinkhuis M, Copeland BM, Samad S, Liao S, Schepel JAC. *Alzheimers Res Ther.* 2021 Feb 23;13(1):51. doi: 10.1186/s13195-021-00783-x. PMID: 33622392

# Bibliografia

- <sup>30</sup> [Effect of a plant-based, low-fat diet versus an animal-based, ketogenic diet on ad libitum energy intake.](#)  
Hall KD, Guo J, Courville AB, Boring J, Brychta R, Chen KY, Darcey V, Forde CG, Gharib AM, Gallagher I, Howard R, Joseph PV, Milley L, Ouwerkerk R, Raising K, Rozga I, Schick A, Stagliano M, Torres S, Walter M, Walter P, Yang S, Chung ST. *Nat Med.* 2021 Feb;27(2):344-353. doi: 10.1038/s41591-020-01209-1. Epub 2021 Jan 21. PMID: 33479499
- <sup>31</sup> [Intermittent fasting 5:2 diet: What is the macronutrient and micronutrient intake and composition?](#)  
Scholtens EL, Krebs JD, Corley BT, Hall RM. *Clin Nutr.* 2020 Nov;39(11):3354-3360. doi: 10.1016/j.clnu.2020.02.022. Epub 2020 Feb 22. PMID: 32199696
- <sup>32</sup> Intermittent energy restriction induces changes in breast gene expression and systemic metabolism  
[Breast Cancer Research](#) volume 18, Article number: 57 (2016)
- <sup>33</sup> [Effects of time-restricted feeding on body weight and metabolism. A systematic review and meta-analysis.](#)  
Pellegrini M, Cioffi I, Evangelista A, Ponzio V, Goitre I, Ciccone G, Ghigo E, Bo S. *Rev Endocr Metab Disord.* 2020 Mar;21(1):17-33. doi: 10.1007/s11154-019-09524-w. PMID: 31808043
- <sup>34</sup> [A Diet Mimicking Fasting Promotes Regeneration and Reduces Autoimmunity and Multiple Sclerosis Symptoms.](#)  
Choi IY, Piccio L, Childress P, Bollman B, Ghosh A, Brandhorst S, Suarez J, Michalsen A, Cross AH, Morgan TE, Wei M, Paul F, Bock M, Longo VD. *Cell Rep.* 2016 Jun 7;15(10):2136-2146. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.009. Epub 2016 May 26. PMID: 27239035
- <sup>35</sup> [Fasting-mimicking diet and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease.](#)  
Wei M, Brandhorst S, Shelehchi M, Mirzaei H, Cheng CW, Budniak J, Groshen S, Mack WJ, Guen E, Di Biase S, Cohen P, Morgan TE, Dorff T, Hong K, Michalsen A, Laviano A, Longo VD. *Sci Transl Med.* 2017 Feb 15;9(377):eaai8700. doi: 10.1126/scitranslmed.aai8700. PMID: 28202779
- <sup>36</sup> [Definition of the Mediterranean Diet: a Literature Review.](#)  
Davis C, Bryan J, Hodgson J, Murphy K. *Nutrients.* 2015 Nov 5;7(11):9139-53. doi: 10.3390/nu7115459. PMID: 26556369
- <sup>37</sup> [Rationale and design of the Dietary Approaches to Stop Hypertension trial \(DASH\). A multicenter controlled-feeding study of dietary patterns to lower blood pressure.](#)  
Sacks FM, Obarzanek E, Windhauser MM, Svetkey LP, Vollmer WM, McCullough M, Karanja N, Lin PH, Steele P, Proschan MA, et al. *Ann Epidemiol.* 1995 Mar;5(2):108-18. doi: 10.1016/1047-2797(94)00055-x. PMID: 7795829
- <sup>38</sup> [Nutrients in the Prevention of Alzheimer's Disease.](#)  
Cremonini AL, Caffa I, Cea M, Nencioni A, Odetti P, Monacelli F. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Sep 4;2019:9874159. doi: 10.1155/2019/9874159. eCollection 2019. PMID: 31565158
- <sup>39</sup> [Anthocyanin profile, antioxidant activity and enzyme inhibiting properties of blueberry and cranberry juices: a comparative study.](#)  
Cásedas G, Les F, Gómez-Serranillos MP, Smith C, López V. *Food Funct.* 2017 Nov 15;8(11):4187-4193. doi: 10.1039/c7fo01205e. PMID: 29038797
- <sup>40</sup> [Neuroprotective effects of digested polyphenols from wild blackberry species.](#)  
Tavares L, Figueira I, McDougall GJ, Vieira HL, Stewart D, Alves PM, Ferreira RB, Santos CN. *Eur J Nutr.* 2013 Feb;52(1):225-36. doi: 10.1007/s00394-012-0307-7. PMID: 22314351
- <sup>41</sup> [History of the ketogenic diet.](#)  
Wheless JW. *Epilepsia.* 2008 Nov;49 Suppl 8:3-5. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01821.x. PMID: 19049574
- <sup>42</sup> [The human metabolic response to chronic ketosis without caloric restriction: preservation of submaximal exercise capability with reduced carbohydrate oxidation.](#)  
Phinney SD, Bistrian BR, Evans WJ, Gervino E, Blackburn GL. *Metabolism.* 1983 Aug;32(8):769-76. doi: 10.1016/0026-0495(83)90106-3. PMID: 6865776
- <sup>43</sup> [Impact of a 6-week non-energy-restricted ketogenic diet on physical fitness, body composition and biochemical parameters in healthy adults.](#) Urbain P, Strom L, Morawski L, Wehrle A, Deibert P, Bertz H. *Nutr Metab (Lond).* 2017 Feb 20;14:17. doi: 10.1186/s12986-017-0175-5. eCollection 2017. PMID: 28239404
- <sup>44</sup> [An Online Intervention Comparing a Very Low-Carbohydrate Ketogenic Diet and Lifestyle Recommendations Versus a Plate Method Diet in Overweight Individuals With Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial.](#)  
Saslow LR, Mason AE, Kim S, Goldman V, Ploutz-Snyder R, Bayandorian H, Daubenmier J, Hecht FM, Moskowitz JT. *J Med Internet Res.* 2017 Feb 13;19(2):e36. doi: 10.2196/jmir.5806. PMID: 28193599

# Bibliografia

---

- <sup>45</sup> [Mild cognitive impairment as a diagnostic entity.](#)  
Petersen RC. J Intern Med. 2004 Sep;256(3):183-94. doi: 10.1111/j.1365-2796.2004.01388.x. PMID: 15324362
- <sup>46</sup> [Mild cognitive impairment: a systematic review.](#)  
Mariani E, Monastero R, Mecocci P. J Alzheimers Dis. 2007 Aug;12(1):23-35. doi: 10.3233/jad-2007-12104. PMID: 17851192
- <sup>47</sup> [The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease.](#)  
McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. Alzheimers Dement. 2011 May;7(3):263-9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21514250
- <sup>48</sup> [The Prevalence of Mild Cognitive Impairment in Diverse Geographical and Ethnocultural Regions: The COSMIC Collaboration.](#)  
Sachdev PS, Lipnicki DM, Kochan NA, Crawford JD, Thalamuthu A, Andrews G, Brayne C, Matthews FE, Stephan BC, Lipton RB, Katz MJ, Ritchie K, Carrière I, Ancelin ML, Lam LC, Wong CH, Fung AW, Guaita A, Vaccaro R, Davin A, Ganguli M, Dodge H, Hughes T, Anstey KJ, Cherbuin N, Butterworth P, Ng TP, Gao Q, Reppermund S, Brodaty H, Schupf N, Manly J, Stern Y, Lobo A, Lopez-Anton R, Santabábara J; Cohort Studies of Memory in an International Consortium (COSMIC). PLoS One. 2015 Nov 5;10(11):e0142388. doi: 10.1371/journal.pone.0142388. eCollection 2015. PMID: 26539987
- <sup>49</sup> [New Frontiers in the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Alzheimer's Disease.](#)  
Guzman-Martinez L, Caffío C, Farias GA, Vilches C, Prieto R, Maccioni RB. J Alzheimers Dis. 2021;82(s1):S51-S63. doi: 10.3233/JAD-201059. PMID: 33523002
- <sup>50</sup> [Interventions to Prevent Age-Related Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, and Clinical Alzheimer's-Type Dementia \[Internet\].](#)  
Kane RL, Butler M, Fink HA, Brasure M, Davila H, Desai P, Jutkowitz E, McCreedy E, Nelson VA, McCarten JR, Calvert C, Ratner E, Hemmy LS, Barclay T. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2017 Mar. Report No.: 17-EHC008-EF. PMID: 28759193
- <sup>51</sup> [Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis.](#)  
Eratne D, Loi SM, Farrand S, Kelso W, Velakoulis D, Looi JC. Australas Psychiatry. 2018 Aug;26(4):347-357. doi: 10.1177/1039856218762308. Epub 2018 Apr 3. PMID: 29614878
- <sup>52</sup> [Alzheimer's disease.](#)  
Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. Lancet. 2021 Apr 24;397(10284):1577-1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33667416
- <sup>53</sup> [The complexity of Alzheimer's disease: an evolving puzzle.](#)  
Ferrari C, Sorbi S. Physiol Rev. 2021 Jul 1;101(3):1047-1081. doi: 10.1152/physrev.00015.2020. Epub 2021 Jan 21. PMID: 33475022
- <sup>54</sup> [Effect of rivastigmine on delay to diagnosis of Alzheimer's disease from mild cognitive impairment: the InDDEX study.](#)  
Feldman HH, Ferris S, Winblad B, Sfikas N, Mancione L, He Y, Tekin S, Burns A, Cummings J, del Ser T, Inzitari D, Orgogozo JM, Sauer H, Scheltens P, Scarpini E, Herrmann N, Farlow M, Potkin S, Charles HC, Fox NC, Lane R. Lancet Neurol. 2007 Jun;6(6):501-12. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70109-6. PMID: 17509485
- <sup>55</sup> [Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease.](#)  
Birks JS, Harvey RJ. Cochrane Database Syst Rev. 2018 Jun 18;6(6):CD001190. doi: 10.1002/14651858.CD001190.pub3. PMID: 29923184
- <sup>56</sup> [Prevention of Age-Related Cognitive Decline: Which Strategies, When, and for Whom?](#)  
Shatenstein B, Barberger-Gateau P, Mecocci P. J Alzheimers Dis. 2015;48(1):35-53. doi: 10.3233/JAD-150256. PMID: 26401926
- <sup>57</sup> [Alzheimer's disease.](#)  
Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. Lancet. 2021 Apr 24;397(10284):1577-1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33667416
- <sup>58</sup> [Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society.](#)

# Bibliografia

Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, Cedazo-Minguez A, Dubois B, Edvardsson D, Feldman H, Fratiglioni L, Frisoni GB, Gauthier S, Georges J, Graff C, Iqbal K, Jessen F, Johansson G, Jönsson L, Kivipelto M, Knapp M, Mangialasche F, Melis R, Nordberg A, Rikkert MO, Qiu C, Sakmar TP, Scheltens P, Schneider LS, Sperling R, Tjernberg LO, Waldemar G, Wimo A, Zetterberg H. *Lancet Neurol.* 2016 Apr;15(5):455-532. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00062-4. PMID: 26987701

<sup>59</sup> [Amnestic mild cognitive impairment and conversion to Alzheimer's disease: insulin resistance and glycooxidation as early biomarker clusters.](#)

Monacelli F, Borghi R, Cammarata S, Nencioni A, Piccini A, Tabaton M, Odetti P. *J Alzheimers Dis.* 2015;45(1):89-95. doi: 10.3233/JAD-142511. PMID: 25471189

<sup>60</sup> [Relation of cerebral vessel disease to Alzheimer's disease dementia and cognitive function in elderly people: a cross-sectional study.](#)

Arvanitakis Z, Capuano AW, Leurgans SE, Bennett DA, Schneider JA. *Lancet Neurol.* 2016 Aug;15(9):934-943. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30029-1. Epub 2016 Jun 14. PMID: 27312738

<sup>61</sup> [Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease.](#)

Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV. *Nat Rev Neurosci.* 2017 Jul;18(7):419-434. doi: 10.1038/nrn.2017.48. Epub 2017 May 18. PMID: 28515434

<sup>62</sup> [Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response.](#)

Faraco G, Brea D, Garcia-Bonilla L, Wang G, Racchumi G, Chang H, Buendia I, Santisteban MM, Segarra SG, Koizumi K, Sugiyama Y, Murphy M, Voss H, Anrather J, Iadecola C. *Nat Neurosci.* 2018 Feb;21(2):240-249. doi: 10.1038/s41593-017-0059-z. Epub 2018 Jan 15. PMID: 29335605

<sup>63</sup> [Oxidative signature of cerebrospinal fluid from mild cognitive impairment and Alzheimer disease patients.](#)

Di Domenico F, Pupo G, Giraldo E, Badia MC, Monllor P, Lloret A, Schininà ME, Giorgi A, Cini C, Tramutola A, Butterfield DA, Viña J, Perluigi M. *Free Radic Biol Med.* 2016 Feb;91:1-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.004. Epub 2015 Dec 8. PMID: 26675344

<sup>64</sup> [The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance.](#)

Nehlig A. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Mar;75(3):716-27. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04378.x. PMID: 22775434

<sup>65</sup> [Plasma Lipidomic Profiling and Risk of Type 2 Diabetes in the PREDIMED Trial.](#)

Razquin C, Toledo E, Clish CB, Ruiz-Canela M, Dennis C, Corella D, Papandreou C, Ros E, Estruch R, Guasch-Ferré M, Gómez-Gracia E, Fitó M, Yu E, Lapetra J, Wang D, Romaguera D, Liang L, Alonso-Gómez A, Deik A, Bullo M, Serra-Majem L, Salas-Salvadó J, Hu FB, Martínez-González MA. *Diabetes Care.* 2018 Dec;41(12):2617-2624. doi: 10.2337/dc18-0840. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30327364

<sup>66</sup> [Influence of Dietary Approaches to Stop Hypertension \(DASH\) diet on blood pressure: a systematic review and meta-analysis on randomized controlled trials.](#)

Saneei P, Salehi-Abarqouei A, Esmailzadeh A, Azadbakht L. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014 Dec;24(12):1253-61. doi: 10.1016/j.numecd.2014.06.008. Epub 2014 Jun 27. PMID: 25149893

<sup>67</sup> [Acute cocoa flavanol improves cerebral oxygenation without enhancing executive function at rest or after exercise.](#)

Decroix L, Tonoli C, Soares DD, Tagougui S, Heyman E, Meeusen R. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016 Dec;41(12):1225-1232. doi: 10.1139/apnm-2016-0245. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27849355

<sup>68</sup> [Protection by extra virgin olive oil against oxidative stress in vitro and in vivo. Chemical and biological studies on the health benefits due to a major component of the Mediterranean diet.](#)

Rossi M, Caruso F, Kwok L, Lee G, Caruso A, Gionfra F, Candelotti E, Belli SL, Molasky N, Raley-Susman KM, Leone S, Filipický T, Tofani D, Pedersen J, Incerpi S. *PLoS One.* 2017 Dec 28;12(12):e0189341. doi: 10.1371/journal.pone.0189341. eCollection 2017. PMID: 29283995

<sup>69</sup> [Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans.](#)

Rigacci S, Stefani M. *Int J Mol Sci.* 2016 May 31;17(6):843. doi: 10.3390/ijms17060843. PMID: 27258251

<sup>70</sup> [Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress.](#)

Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018 May;1865(5):721-733. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29499228

<sup>71</sup> [Mediterranean diet and inflammaging within the hormesis paradigm.](#)

Martucci M, Ostan R, Biondi F, Bellavista E, Fabbri C, Bertarelli C, Salvioli S, Capri M, Franceschi C, Santoro A. *Nutr Rev.* 2017 Jun 1;75(6):442-455. doi: 10.1093/nutrit/nux013. PMID: 28595318



# Bibliografia

---

- <sup>72</sup> [Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches.](#)  
Ahmad MH, Fatima M, Mondal AC. J Clin Neurosci. 2019 Jan;59:6-11. doi: 10.1016/j.jocn.2018.10.034. Epub 2018 Oct 29. PMID: 30385170
- <sup>73</sup> [All-trans retinoic acid improved impaired proliferation of neural stem cells and suppressed microglial activation in the hippocampus in an Alzheimer's mouse model.](#)  
Takamura R, Watamura N, Nikkuni M, Ohshima T. J Neurosci Res. 2017 Mar;95(3):897-906. doi: 10.1002/jnr.23843. Epub 2016 Jul 22. PMID: 27448243
- <sup>74</sup> [Retinoic Acid Is Required for Neural Stem and Progenitor Cell Proliferation in the Adult Hippocampus.](#)  
Mishra S, Kelly KK, Rumian NL, Siegenthaler JA. Stem Cell Reports. 2018 Jun 5;10(6):1705-1720. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.04.024. Epub 2018 May 24. PMID: 29805108
- <sup>75</sup> [Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation.](#)  
Regen F, Hellmann-Regen J, Costantini E, Reale M. Curr Alzheimer Res. 2017;14(11):1140-1148. doi: 10.2174/1567205014666170203141717. PMID: 28164764
- <sup>76</sup> [Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?](#)  
Leng F, Edison P. Nat Rev Neurol. 2021 Mar;17(3):157-172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y. Epub 2020 Dec 14. PMID: 33318676
- <sup>77</sup> [Ferulic acid destabilizes preformed beta-amyloid fibrils in vitro.](#)  
Ono K, Hirohata M, Yamada M. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Oct 21;336(2):444-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.148. PMID: 16153607
- <sup>78</sup> [Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway.](#)  
Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Am J Pathol. 2009 Dec;175(6):2557-65. doi: 10.2353/ajpath.2009.090417. Epub 2009 Nov 5. PMID: 19893028
- <sup>79</sup> [Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid.](#)  
Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, Suh HW, Kim YH, Song DK. Br J Pharmacol. 2001 May;133(1):89-96. doi: 10.1038/sj.bjp.0704047. PMID: 11325798
- <sup>80</sup> [Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide\(1-42\)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity.](#)  
Sultana R, Ravagna A, Mohammad-Abdul H, Calabrese V, Butterfield DA. J Neurochem. 2005 Feb;92(4):749-58. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02899.x. PMID: 15686476
- <sup>81</sup> [Natural stilbenes: an overview.](#)  
Shen T, Wang XN, Lou HX. Nat Prod Rep. 2009 Jul;26(7):916-35. doi: 10.1039/b905960a. Epub 2009 Jun 1. PMID: 19554241
- <sup>82</sup> [Curcumin-induced upregulation of the anti-tau cochaperone BAG2 in primary rat cortical neurons.](#)  
Patil SP, Tran N, Geekiyanage H, Liu L, Chan C. Neurosci Lett. 2013 Oct 25;554:121-5. doi: 10.1016/j.neulet.2013.09.008. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24035895
- <sup>83</sup> [Stability of the transthyretin molecule as a key factor in the interaction with a-beta peptide--relevance in Alzheimer's disease.](#)  
Ribeiro CA, Saraiva MJ, Cardoso I. PLoS One. 2012;7(9):e45368. doi: 10.1371/journal.pone.0045368. Epub 2012 Sep 17. PMID: 23028965
- <sup>84</sup> [\[Effects of resveratrol on hippocampal astrocytes and expression of TNF-α in Alzheimer's disease model rat\].](#)  
Cheng X, Wang Q, Li N, Zhao H, Wei Sheng Yan Jiu. 2015 Jul;44(4):610-4. PMID: 26454959
- <sup>85</sup> [Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells.](#)  
Kim YA, Lim SY, Rhee SH, Park KY, Kim CH, Choi BT, Lee SJ, Park YM, Choi YH. Int J Mol Med. 2006 Jun;17(6):1069-75. PMID: 16685418
- <sup>86</sup> [The profile of fatty acids in frontal cortex of rats depends on the type of fat used in the diet and correlates with neuropeptidase activities.](#)



# Bibliografia

Segarra AB, Ruiz-Sanz JI, Ruiz-Larrea MB, Ramírez-Sánchez M, de Gasparo M, Banegas I, Martínez-Cañamero M, Vives F, Prieto I. *Horm Metab Res.* 2011 Feb;43(2):86-91. doi: 10.1055/s-0030-1269855. Epub 2010 Nov 30. PMID: 21120792

<sup>87</sup> [Human Gut Microbiota in Health and Alzheimer's Disease.](#)  
Szablewski L. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(2):549-560. doi: 10.3233/JAD-170908. PMID: 29480188

<sup>88</sup> [Bidirectional interactions between dietary curcumin and gut microbiota.](#)  
Shen L, Ji HF. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(18):2896-2902. doi: 10.1080/10408398.2018.1478388. Epub 2018 Dec 30. PMID: 29781709

<sup>89</sup> [Curcumin Inhibits Tau Aggregation and Disintegrates Preformed Tau Filaments in vitro.](#)  
Rane JS, Bhaumik P, Panda D. *J Alzheimers Dis.* 2017;60(3):999-1014. doi: 10.3233/JAD-170351. PMID: 28984591

<sup>90</sup> [The Western Diet-Microbiome-Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease.](#)  
Zinöcker MK, Lindseth IA. *Nutrients.* 2018 Mar 17;10(3):365. doi: 10.3390/nu10030365. PMID: 29562591

<sup>91</sup> [Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases.](#)  
Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 Oct;14(10):576-590. doi: 10.1038/s41574-018-0059-4. PMID: 30046148

<sup>92</sup> [Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases.](#)  
Konturek PC, Haziri D, Brzozowski T, Hess T, Heyman S, Kwiecien S, Konturek SJ, Koziel J. *J Physiol Pharmacol.* 2015 Aug;66(4):483-91. PMID: 26348073

<sup>93</sup> [Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians.](#)  
Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. *PLoS One.* 2010 May 17;5(5):e10667. doi: 10.1371/journal.pone.0010667. PMID: 20498852

<sup>94</sup> [Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly.](#)  
Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. *Nature.* 2012 Aug 9;488(7410):178-84. doi: 10.1038/nature11319. PMID: 22797518

<sup>95</sup> [Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study.](#)  
Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJ, Doré J, Blaut M. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Feb;72(2):1027-33. doi: 10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006. PMID: 16461645

<sup>96</sup> [Gut microbiota changes in the extreme decades of human life: a focus on centenarians.](#)  
Santoro A, Ostan R, Candela M, Biagi E, Brigidi P, Capri M, Franceschi C. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Jan;75(1):129-148. doi: 10.1007/s00018-017-2674-y. Epub 2017 Oct 14. PMID: 29032502

<sup>97</sup> [Microbiome-metabolome signatures in mice genetically prone to develop dementia, fed a normal or fatty diet.](#)  
Sanguinetti E, Collado MC, Marrachelli VG, Monleon D, Selma-Royo M, Pardo-Tendero MM, Burchielli S, Iozzo P. *Sci Rep.* 2018 Mar 20;8(1):4907. doi: 10.1038/s41598-018-23261-1. PMID: 29559675

<sup>98</sup> [Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication.](#)  
Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, Reichmann F, Jačan A, Wagner B, Zinser E, Bordag N, Magnes C, Fröhlich E, Kashofer K, Gorkiewicz G, Holzer P. *Brain Behav Immun.* 2016 Aug;56:140-55. doi: 10.1016/j.bbi.2016.02.020. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26923630

<sup>99</sup> [Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels.](#)  
Bonfili L, Cecarini V, Berardi S, Scarpona S, Suchodolski JS, Nasuti C, Fiorini D, Boarelli MC, Rossi G, Eleuteri AM. *Sci Rep.* 2017 May 25;7(1):2426. doi: 10.1038/s41598-017-02587-2. PMID: 28546539

<sup>100</sup> [Therapeutic potential of Bifidobacterium breve strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease.](#)  
Kobayashi Y, Sugahara H, Shimada K, Mitsuyama E, Kuhara T, Yasuoka A, Kondo T, Abe K, Xiao JZ. *Sci Rep.* 2017 Oct 18;7(1):13510. doi: 10.1038/s41598-017-13368-2. PMID: 29044140

<sup>101</sup> [Decreased microglial activation through gut-brain axis by prebiotics, probiotics, or synbiotics effectively restored cognitive function in obese-insulin resistant rats.](#)

## Bibliografia

Chunchai T, Thunapong W, Yasom S, Wanchai K, Eaimworawuthikul S, Metzler G, Lungkaphin A, Pongchaidecha A, Sirilun S, Chaiyasut C, Pratchayasakul W, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. *J Neuroinflammation*. 2018 Jan 9;15(1):11. doi: 10.1186/s12974-018-1055-2. PMID: 29316965

<sup>102</sup> [Alzheimer's Disease and Hippocampal Adult Neurogenesis: Exploring Shared Mechanisms.](#)  
Hollands C, Bartolotti N, Lazarov O. *Front Neurosci*. 2016 May 3;10:178. doi: 10.3389/fnins.2016.00178. eCollection 2016. PMID: 27199641

<sup>103</sup> [Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads.](#)  
Lazarov O, Marr RA. *Exp Neurol*. 2010 Jun;223(2):267-81. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.009. Epub 2009 Aug 19. PMID: 19699201

<sup>104</sup> [Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis.](#)  
Das S, Basu A. *J Neurosci Res*. 2008 May 1;86(6):1199-208. doi: 10.1002/jnr.21585. PMID: 18058947

<sup>105</sup> [A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning.](#)  
Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gómez-Pinilla F. *Neuroscience*. 2002;112(4):803-14. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00123-9. PMID: 12088740

<sup>106</sup> [Fish consumption, long-chain omega-3 fatty acids and risk of cognitive decline or Alzheimer disease: a complex association.](#)  
Fotuhi M, Mohassel P, Yaffe K. *Nat Clin Pract Neurol*. 2009 Mar;5(3):140-52. doi: 10.1038/ncpneuro1044. PMID: 19262590

<sup>107</sup> [Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition.](#)  
Granzotto A, Zatta P. *Front Aging Neurosci*. 2014 May 14;6:95. doi: 10.3389/fnagi.2014.00095. eCollection 2014. PMID: 24860502

<sup>108</sup> [Brain Structure and Function Associated with Younger Adults in Growth Hormone Receptor-Deficient Humans.](#)  
Nashiro K, Guevara-Aguirre J, Braskie MN, Hafzalla GW, Velasco R, Balasubramanian P, Wei M, Thompson PM, Mather M, Nelson MD, Guevara A, Teran E, Longo VD. *J Neurosci*. 2017 Feb 15;37(7):1696-1707. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1929-16.2016. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28073935

<sup>109</sup> [Protein restriction cycles reduce IGF-1 and phosphorylated Tau, and improve behavioral performance in an Alzheimer's disease mouse model.](#)  
Parrella E, Maxim T, Maialetti F, Zhang L, Wan J, Wei M, Cohen P, Fontana L, Longo VD. *Aging Cell*. 2013 Apr;12(2):257-68. doi: 10.1111/accel.12049. Epub 2013 Mar 11. PMID: 23362919

<sup>110</sup> [A Diet Mimicking Fasting Promotes Regeneration and Reduces Autoimmunity and Multiple Sclerosis Symptoms.](#)  
Choi IY, Piccio L, Childress P, Bollman B, Ghosh A, Brandhorst S, Suarez J, Michalsen A, Cross AH, Morgan TE, Wei M, Paul F, Bock M, Longo VD. *Cell Rep*. 2016 Jun 7;15(10):2136-2146. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.009. Epub 2016 May 26. PMID: 27239035

<sup>111</sup> [Fasting-mimicking diet and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease.](#)  
Wei M, Brandhorst S, Shelehchi M, Mirzaei H, Cheng CW, Budniak J, Groshen S, Mack WJ, Guen E, Di Biase S, Cohen P, Morgan TE, Dorff T, Hong K, Michalsen A, Laviano A, Longo VD. *Sci Transl Med*. 2017 Feb 15;9(377):eaai8700. doi: 10.1126/scitranslmed.aai8700. PMID: 28202779

<sup>112</sup> [Mediterranean Diet and Magnetic Resonance Imaging-Assessed Brain Atrophy in Cognitively Normal Individuals at Risk for Alzheimer's Disease.](#)  
Mosconi L, Murray J, Tsui WH, Li Y, Davies M, Williams S, Pirraglia E, Spector N, Osorio RS, Glodzik L, McHugh P, de Leon MJ. *J Prev Alzheimers Dis*. 2014 Jun;1(1):23-32. PMID: 25237654

<sup>113</sup> [Mediterranean diet and preserved brain structural connectivity in older subjects.](#)  
Pelletier A, Barul C, Féart C, Helmer C, Bernard C, Periot O, Dilharreguy B, Dartigues JF, Allard M, Barberger-Gateau P, Catheline G, Samieri C. *Alzheimers Dement*. 2015 Sep;11(9):1023-31. doi: 10.1016/j.jalz.2015.06.1888. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26190494

<sup>114</sup> [Mediterranean diet and brain structure in a multiethnic elderly cohort.](#)  
Gu Y, Brickman AM, Stern Y, Habeck CG, Razlighi QR, Luchsinger JA, Manly JJ, Schupf N, Mayeux R, Scarmeas N. *Neurology*. 2015 Nov 17;85(20):1744-51. doi: 10.1212/WNL.0000000000002121. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26491085

<sup>115</sup> [Mediterranean diet, micronutrients and macronutrients, and MRI measures of cortical thickness.](#)

# Bibliografia

- Staubo SC, Aakre JA, Vemuri P, Syrjanen JA, Mielke MM, Geda YE, Kremers WK, Machulda MM, Knopman DS, Petersen RC, Jack CR Jr, Roberts RO. *Alzheimers Dement.* 2017 Feb;13(2):168-177. doi: 10.1016/j.jalz.2016.06.2359. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27461490
- <sup>116</sup> [Associations of the Mediterranean diet with cognitive and neuroimaging phenotypes of dementia in healthy older adults.](#)  
Karstens AJ, Tussing-Humphreys L, Zhan L, Rajendran N, Cohen J, Dion C, Zhou XJ, Lamar M. *Am J Clin Nutr.* 2019 Feb 1;109(2):361-368. doi: 10.1093/ajcn/nqy275. PMID: 30698630
- <sup>117</sup> [Mediterranean-type diet and brain structural change from 73 to 76 years in a Scottish cohort.](#)  
Luciano M, Corley J, Cox SR, Valdés Hernández MC, Craig LC, Dickie DA, Karama S, McNeill GM, Bastin ME, Wardlaw JM, Deary IJ. *Neurology.* 2017 Jan 31;88(5):449-455. doi: 10.1212/WNL.0000000000003559. Epub 2017 Jan 4. PMID: 28053008
- <sup>118</sup> [Western diet is associated with a smaller hippocampus: a longitudinal investigation.](#)  
Jacka FN, Cherbuin N, Anstey KJ, Sachdev P, Butterworth P. *BMC Med.* 2015 Sep 8;13:215. doi: 10.1186/s12916-015-0461-x. PMID: 26349802
- <sup>119</sup> [Relation of DASH- and Mediterranean-like dietary patterns to cognitive decline in older persons.](#)  
Tangney CC, Li H, Wang Y, Barnes L, Schneider JA, Bennett DA, Morris MC. *Neurology.* 2014 Oct 14;83(16):1410-6. doi: 10.1212/WNL.0000000000000884. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25230996
- <sup>120</sup> [The Dietary Approaches to Stop Hypertension Diet, Cognitive Function, and Cognitive Decline in American Older Women.](#)  
Berendsen AAM, Kang JH, van de Rest O, Feskens EJM, de Groot LCPGM, Grodstein F. *J Am Med Dir Assoc.* 2017 May 1;18(5):427-432. doi: 10.1016/j.jamda.2016.11.026. Epub 2017 Jan 17. PMID: 28108204
- <sup>121</sup> [Effects of the dietary approaches to stop hypertension diet, exercise, and caloric restriction on neurocognition in overweight adults with high blood pressure.](#)  
Smith PJ, Blumenthal JA, Babyak MA, Craighead L, Welsh-Bohmer KA, Browndyke JN, Strauman TA, Sherwood A. *Hypertension.* 2010 Jun;55(6):1331-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.146795. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20305128
- <sup>122</sup> [Nutritional factors and risk of incident dementia in the PAQUID longitudinal cohort.](#)  
Larrieu S, Letenneur L, Helmer C, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. *J Nutr Health Aging.* 2004;8(3):150-4. PMID: 15129300
- <sup>123</sup> [Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study.](#)  
Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. *Ann Neurol.* 1997 Nov;42(5):776-82. doi: 10.1002/ana.410420514. PMID: 9392577
- <sup>124</sup> [Anthocyanin profile, antioxidant activity and enzyme inhibiting properties of blueberry and cranberry juices: a comparative study.](#)  
Cásedas G, Les F, Gómez-Serranillos MP, Smith C, López V. *Food Funct.* 2017 Nov 15;8(11):4187-4193. doi: 10.1039/c7fo01205e. PMID: 29038797
- <sup>125</sup> [Neuroprotective effects of digested polyphenols from wild blackberry species.](#)  
Tavares L, Figueira I, McDougall GJ, Vieira HL, Stewart D, Alves PM, Ferreira RB, Santos CN. *Eur J Nutr.* 2013 Feb;52(1):225-36. doi: 10.1007/s00394-012-0307-7. PMID: 22314351
- <sup>126</sup> [Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats.](#)  
Shukitt-Hale B, Cheng V, Joseph JA. *Nutr Neurosci.* 2009 Jun;12(3):135-40. doi: 10.1179/147683009X423292. PMID: 19356316
- <sup>127</sup> [Short-term blueberry-enriched diet prevents and reverses object recognition memory loss in aging rats.](#)  
Malin DH, Lee DR, Goyarzu P, Chang YH, Ennis LJ, Beckett E, Shukitt-Hale B, Joseph JA. *Nutrition.* 2011 Mar;27(3):338-42. doi: 10.1016/j.nut.2010.05.001. Epub 2010 Dec 18. PMID: 21168307
- <sup>128</sup> [Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats.](#)  
Casadesus G, Shukitt-Hale B, Stellwagen HM, Zhu X, Lee HG, Smith MA, Joseph JA. *Nutr Neurosci.* 2004 Oct-Dec;7(5-6):309-16. doi: 10.1080/10284150400020482. PMID: 15682927
- <sup>129</sup> [Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases.](#)  
Pandareesh MD, Mythri RB, Srinivas Bharath MM. *Neurochem Int.* 2015 Oct;89:198-208. doi: 10.1016/j.neuint.2015.07.003. Epub 2015 Jul 7. PMID: 26163045

# Bibliografia

- <sup>130</sup> [Biochemical Properties and Neuroprotective Effects of Compounds in Various Species of Berries.](#)  
Kelly E, Vyas P, Weber JT. *Molecules*. 2017 Dec 22;23(1):26. doi: 10.3390/molecules23010026. PMID: 29271934
- <sup>131</sup> [Dietary intakes of berries and flavonoids in relation to cognitive decline.](#)  
Devore EE, Kang JH, Breteler MM, Grodstein F. *Ann Neurol*. 2012 Jul;72(1):135-43. doi: 10.1002/ana.23594. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22535616
- <sup>132</sup> [MIND diet slows cognitive decline with aging.](#)  
Morris MC, Tangney CC, Wang Y, Sacks FM, Barnes LL, Bennett DA, Aggarwal NT. *Alzheimers Dement*. 2015 Sep;11(9):1015-22. doi: 10.1016/j.jalz.2015.04.011. Epub 2015 Jun 15. PMID: 26086182
- <sup>133</sup> [MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease.](#)  
Morris MC, Tangney CC, Wang Y, Sacks FM, Bennett DA, Aggarwal NT. *Alzheimers Dement*. 2015 Sep;11(9):1007-14. doi: 10.1016/j.jalz.2014.11.009. Epub 2015 Feb 11. PMID: 25681666
- <sup>134</sup> [MIND not Mediterranean diet related to 12-year incidence of cognitive impairment in an Australian longitudinal cohort study.](#)  
Hosking DE, Eramudugolla R, Cherbuin N, Anstey KJ. *Alzheimers Dement*. 2019 Apr;15(4):581-589. doi: 10.1016/j.jalz.2018.12.011. Epub 2019 Feb 28. PMID: 30826160
- <sup>135</sup> [Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay \(MIND\) study: Rationale, design and baseline characteristics of a randomized control trial of the MIND diet on cognitive decline.](#)  
Liu X, Morris MC, Dhana K, Ventrelle J, Johnson K, Bishop L, Hollings CS, Boulin A, Laranjo N, Stubbs BJ, Reilly X, Carey VJ, Wang Y, Furtado JD, Marcovina SM, Tangney C, Aggarwal NT, Arfanakis K, Sacks FM, Barnes LL. *Contemp Clin Trials*. 2021 Mar;102:106270. doi: 10.1016/j.cct.2021.106270. Epub 2021 Jan 9. PMID: 33434704
- <sup>136</sup> [The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A \$\beta\$  plaque pathology.](#)  
Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C, Failli P, Berti A, Casamenti F, Stefani M. *PLoS One*. 2013 Aug 8;8(8):e71702. doi: 10.1371/journal.pone.0071702. eCollection 2013. PMID: 23951225
- <sup>137</sup> [LMN diet, rich in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, improves mouse cognitive decline associated with aging and Alzheimer's disease.](#)  
Fernández-Fernández L, Comes G, Bolea I, Valente T, Ruiz J, Murtra P, Ramirez B, Anglés N, Reguant J, Morelló JR, Boada M, Hidalgo J, Escorihuela RM, Unzeta M. *Behav Brain Res*. 2012 Mar 17;228(2):261-71. doi: 10.1016/j.bbr.2011.11.014. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22119712
- <sup>138</sup> [A Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Healthspan.](#)  
Brandhorst S, Choi IY, Wei M, Cheng CW, Sedrakyan S, Navarrete G, Dubeau L, Yap LP, Park R, Vinciguerra M, Di Biase S, Mirzaei H, Mirisola MG, Childress P, Ji L, Groshen S, Penna F, Odetti P, Perin L, Conti PS, Ikeno Y, Kennedy BK, Cohen P, Morgan TE, Dorff TB, Longo VD. *Cell Metab*. 2015 Jul 7;22(1):86-99. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.012. Epub 2015 Jun 18. PMID: 26094889
- <sup>139</sup> [Fasting and differential chemotherapy protection in patients.](#)  
Raffaghello L, Safdie F, Bianchi G, Dorff T, Fontana L, Longo VD. *Cell Cycle*. 2010 Nov 15;9(22):4474-6. doi: 10.4161/cc.9.22.13954. Epub 2010 Nov 15. PMID: 21088487
- <sup>140</sup> [Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy.](#)  
Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, Longo VD. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17;105(24):8215-20. doi: 10.1073/pnas.0708100105. Epub 2008 Mar 31. PMID: 18378900
- <sup>141</sup> [Reduced IGF-I differentially protects normal and cancer cells and improves chemotherapeutic index in mice](#)  
Changhan Lee, Fernando M. Safdie, Lizzia Raffaghello, Min Wei, Federica Madia, Edoardo Parrella, David Hwang, Pinchas Cohen, Giovanna Bianchi, Valter D. Longo  
*Cancer Res*. Author manuscript; available in PMC 2011 Feb 15.  
Published in final edited form as: *Cancer Res*. 2010 Feb 15; 70(4): 1564–1572. Published online 2010 Feb 9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3228
- <sup>142</sup> [Starvation, Stress Resistance, and Cancer](#)  
Roberta Buono, Valter D. Longo  
*Trends Endocrinol Metab*. Author manuscript; available in PMC 2020 Sep 8.  
Published in final edited form as: *Trends Endocrinol Metab*. 2018 Apr; 29(4): 271–280. Published online 2018 Feb 17. doi: 10.1016/j.tem.2018.01.008
- <sup>143</sup> [The effect of prolonged fasting on levels of growth hormone-binding protein and free growth hormone.](#)

# Bibliografia

- Salgin B, Marcovecchio ML, Hill N, Dunger DB, Frystyk J. Growth Horm IGF Res. 2012 Apr;22(2):76-81. doi: 10.1016/j.ghir.2012.02.003. Epub 2012 Mar 3. PMID: 22386777
- <sup>144</sup> [Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake.](#)  
Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Cell Metab. 2007 Jul;6(1):55-68. doi: 10.1016/j.cmet.2007.06.003. PMID: 17618856
- <sup>145</sup> [Prolonged fasting reduces IGF-1/PKA to promote hematopoietic-stem-cell-based regeneration and reverse immunosuppression.](#)  
Cheng CW, Adams GB, Perin L, Wei M, Zhou X, Lam BS, Da Sacco S, Mirisola M, Quinn DI, Dorff TB, Kopchick JJ, Longo VD. Cell Stem Cell. 2014 Jun 5;14(6):810-23. doi: 10.1016/j.stem.2014.04.014. PMID: 24905167
- <sup>146</sup> [Reduced levels of IGF-I mediate differential protection of normal and cancer cells in response to fasting and improve chemotherapeutic index.](#)  
Lee C, Safdie FM, Raffaghello L, Wei M, Madia F, Parrella E, Hwang D, Cohen P, Bianchi G, Longo VD. Cancer Res. 2010 Feb 15;70(4):1564-72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3228. Epub 2010 Feb 9. PMID: 20145127
- <sup>147</sup> [Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans.](#)  
Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, Klein S, Holloszy JO. Aging Cell. 2008 Oct;7(5):681-7. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00417.x. PMID: 18843793
- <sup>148</sup> [Nutritional predictors of insulin-like growth factor I and their relationships to cancer in men.](#)  
Giovannucci E, Pollak M, Liu Y, Platz EA, Majeed N, Rimm EB, Willett WC. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003 Feb;12(2):84-9. PMID: 12582016
- <sup>149</sup> [Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver.](#)  
Cheng Z, Guo S, Copps K, Dong X, Kollipara R, Rodgers JT, Depinho RA, Puigserver P, White MF. Nat Med. 2009 Nov;15(11):1307-11. doi: 10.1038/nm.2049. Epub 2009 Oct 18. PMID: 19838201
- <sup>150</sup> [Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP.](#)  
Hurley RL, Barré LK, Wood SD, Anderson KA, Kemp BE, Means AR, Witters LA. J Biol Chem. 2006 Dec 1;281(48):36662-72. doi: 10.1074/jbc.M606676200. Epub 2006 Oct 5. PMID: 17023420
- <sup>151</sup> [Fasting regulates EGR1 and protects from glucose- and dexamethasone-dependent sensitization to chemotherapy.](#)  
Di Biase S, et al. PLoS Biol. 2017. PMID: 28358805
- <sup>152</sup> [Nutrition, longevity and disease: From molecular mechanisms to interventions.](#)  
Longo VD, Anderson RM. Cell. 2022 Apr 28;185(9):1455-1470. doi: 10.1016/j.cell.2022.04.002. PMID: 35487190
- <sup>153</sup> [AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer.](#)  
Hardie DG. Biochem Soc Trans. 2011 Jan;39(1):1-13. doi: 10.1042/BST0390001. PMID: 21265739
- <sup>154</sup> [Autophagy and the integrated stress response.](#)  
Kroemer G, Mariño G, Levine B. Mol Cell. 2010 Oct 22;40(2):280-93. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023. PMID: 20965422
- <sup>155</sup> [Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready?](#)  
Longo VD, Antebi A, Bartke A, Barzilai N, Brown-Borg HM, Caruso C, Curiel TJ, de Cabo R, Franceschi C, Gems D, Ingram DK, Johnson TE, Kennedy BK, Kenyon C, Klein S, Kopchick JJ, Lepperdinger G, Madeo F, Mirisola MG, Mitchell JR, Passarino G, Rudolph KL, Sedivy JM, Shadel GS, Sinclair DA, Spindler SR, Suh Y, Vijg J, Vinciguerra M, Fontana L. Aging Cell. 2015 Aug;14(4):497-510. doi: 10.1111/ace1.12338. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25902704
- <sup>156</sup> [Nutrient-sensitive mitochondrial NAD+ levels dictate cell survival.](#)  
Yang H, Yang T, Baur JA, Perez E, Matsui T, Carmona JJ, Lamming DW, Souza-Pinto NC, Bohr VA, Rosenzweig A, de Cabo R, Sauve AA, Sinclair DA. Cell. 2007 Sep 21;130(6):1095-107. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.035. PMID: 17889652
- <sup>157</sup> [Nutrition, longevity and disease: From molecular mechanisms to interventions.](#)  
Longo VD, Anderson RM. Cell. 2022 Apr 28;185(9):1455-1470. doi: 10.1016/j.cell.2022.04.002. PMID: 35487190
- <sup>158</sup> [Prolonged fasting reduces IGF-1/PKA to promote hematopoietic-stem-cell-based regeneration and reverse immunosuppression.](#)



# Bibliografia

Cheng CW, Adams GB, Perin L, Wei M, Zhou X, Lam BS, Da Sacco S, Mirisola M, Quinn DI, Dorff TB, Kopchick JJ, Longo VD. *Cell Stem Cell*. 2014 Jun 5;14(6):810-23. doi: 10.1016/j.stem.2014.04.014. PMID: 24905167

<sup>159</sup> [Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States.](#)

Mattson MP, Arumugam TV. *Cell Metab*. 2018 Jun 5;27(6):1176-1199. doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.011. PMID: 29874566

<sup>160</sup> [Nutritional strategies to optimise cognitive function in the aging brain.](#)

Wahl D, Cogger VC, Solon-Biet SM, Waern RV, Gokarn R, Pulpitel T, Cabo Rd, Mattson MP, Raubenheimer D, Simpson SJ, Le Couteur DG. *Ageing Res Rev*. 2016 Nov;31:80-92. doi: 10.1016/j.arr.2016.06.006. Epub 2016 Jun 26. PMID: 27355990

<sup>161</sup> [Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction.](#)

Golbidi S, Daiber A, Korac B, Li H, Essop MF, Laher I. *Curr Diab Rep*. 2017 Oct 23;17(12):123. doi: 10.1007/s11892-017-0951-7. PMID: 29063418

<sup>162</sup> [Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake.](#)

Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):6216-20. doi: 10.1073/pnas.1035720100. Epub 2003 Apr 30. PMID: 12724520

<sup>163</sup> [Publisher Correction: Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health.](#)

Mattson MP, Moehl K, Ghena N, Schmaedick M, Cheng A. *Nat Rev Neurosci*. 2020 Aug;21(8):445. doi: 10.1038/s41583-020-0342-y. PMID: 32606453

<sup>164</sup> [mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease.](#)

Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeblerlein M. *Nature*. 2013 Jan 17;493(7432):338-45. doi: 10.1038/nature11861. PMID: 23325216

<sup>165</sup> [mTOR signaling in growth control and disease.](#)

Laplante M, Sabatini DM. *Cell*. 2012 Apr 13;149(2):274-93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017. PMID: 22500797

<sup>166</sup> [Late-onset intermittent fasting dietary restriction as a potential intervention to retard age-associated brain function impairments in male rats.](#)

Singh R, Lakhanpal D, Kumar S, Sharma S, Kataria H, Kaur M, Kaur G. *Age (Dordr)*. 2012 Aug;34(4):917-33. doi: 10.1007/s11357-011-9289-2. Epub 2011 Aug 23. PMID: 21861096

<sup>167</sup> [Middle age onset short-term intermittent fasting dietary restriction prevents brain function impairments in male Wistar rats.](#)

Singh R, Manchanda S, Kaur T, Kumar S, Lakhanpal D, Lakhman SS, Kaur G. *Biogerontology*. 2015 Dec;16(6):775-88. doi: 10.1007/s10522-015-9603-y. Epub 2015 Aug 30. PMID: 26318578

<sup>168</sup> [Chronic intermittent fasting improves cognitive functions and brain structures in mice.](#)

Li L, Wang Z, Zuo Z. *PLoS One*. 2013 Jun 3;8(6):e66069. doi: 10.1371/journal.pone.0066069. Print 2013. PMID: 23755298

<sup>169</sup> [Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice.](#)

Duan W, Guo Z, Mattson MP. *J Neurochem*. 2001 Jan;76(2):619-26. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00071.x. PMID: 11208925

<sup>170</sup> [Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice.](#)

van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 9;96(23):13427-31. doi: 10.1073/pnas.96.23.13427. PMID: 10557337

<sup>171</sup> [The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning.](#)

O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. *Behav Brain Res*. 2007 Jan 25;176(2):362-6. doi: 10.1016/j.bbr.2006.10.018. Epub 2006 Nov 20. PMID: 17113656

<sup>172</sup> [Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease.](#)

Halagappa VK, Guo Z, Pearson M, Matsuoka Y, Cutler RG, Laferla FM, Mattson MP. *Neurobiol Dis*. 2007 Apr;26(1):212-20. doi: 10.1016/j.nbd.2006.12.019. Epub 2007 Jan 13. PMID: 17306982

<sup>173</sup> [Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models.](#)



# Bibliografia

Patel NV, Gordon MN, Connor KE, Good RA, Engelman RW, Mason J, Morgan DG, Morgan TE, Finch CE. *Neurobiol Aging*. 2005 Jul;26(7):995-1000. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.09.014. Epub 2004 Nov 25. PMID: 15748777

<sup>174</sup> [Caloric restriction attenuates beta-amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease.](#)  
Wang J, Ho L, Qin W, Rocher AB, Seror I, Humala N, Maniar K, Dolios G, Wang R, Hof PR, Pasinetti GM. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):659-61. doi: 10.1096/fj.04-3182fje. Epub 2005 Jan 13. PMID: 15650008

<sup>175</sup> [Caloric restriction attenuates amyloid deposition in middle-aged dtg APP/PS1 mice.](#)  
Mouton PR, Chachich ME, Quigley C, Spangler E, Ingram DK. *Neurosci Lett*. 2009 Oct 30;464(3):184-7. doi: 10.1016/j.neulet.2009.08.038. Epub 2009 Aug 20. PMID: 19699265

<sup>176</sup> [Protein restriction cycles reduce IGF-1 and phosphorylated Tau, and improve behavioral performance in an Alzheimer's disease mouse model.](#)  
Parrella E, Maxim T, Maialetti F, Zhang L, Wan J, Wei M, Cohen P, Fontana L, Longo VD. *Aging Cell*. 2013 Apr;12(2):257-68. doi: 10.1111/accel.12049. Epub 2013 Mar 11. PMID: 23362919

<sup>177</sup> [Intermittent Fasting Protects against Alzheimer's Disease Possible through Restoring Aquaporin-4 Polarity.](#)  
Zhang J, Zhan Z, Li X, Xing A, Jiang C, Chen Y, Shi W, An L. *Front Mol Neurosci*. 2017 Nov 29;10:395. doi: 10.3389/fnmol.2017.00395. eCollection 2017. PMID: 29238290

<sup>178</sup> [Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus.](#)  
Vivar C, Potter MC, Choi J, Lee JY, Stringer TP, Callaway EM, Gage FH, Suh H, van Praag H. *Nat Commun*. 2012;3:1107. doi: 10.1038/ncomms2101. PMID: 23033083

<sup>179</sup> [Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice.](#)  
Lee J, Serogy KB, Mattson MP. *J Neurochem*. 2002 Feb;80(3):539-47. doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00747.x. PMID: 11905999

<sup>180</sup> [Effect of Alternate-Day Fasting on Weight Loss, Weight Maintenance, and Cardioprotection Among Metabolically Healthy Obese Adults: A Randomized Clinical Trial.](#)  
Trepanowski JF, Kroeger CM, Barnosky A, Klempel MC, Bhutani S, Hoddy KK, Gabel K, Freels S, Rigdon J, Rood J, Ravussin E, Varady KA. *JAMA Intern Med*. 2017 Jul 1;177(7):930-938. doi: 10.1001/jamainternmed.2017.0936. PMID: 28459931

<sup>181</sup> [Fasting-mimicking diet and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease.](#)  
Wei M, Brandhorst S, Shelehchi M, Mirzaei H, Cheng CW, Budniak J, Groshen S, Mack WJ, Guen E, Di Biase S, Cohen P, Morgan TE, Dorff T, Hong K, Michalsen A, Laviano A, Longo VD. *Sci Transl Med*. 2017 Feb 15;9(377):eaai8700. doi: 10.1126/scitranslmed.aai8700. PMID: 28202779

<sup>182</sup> [Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans.](#)  
Mirzaei H, Suarez JA, Longo VD. *Trends Endocrinol Metab*. 2014 Nov;25(11):558-66. doi: 10.1016/j.tem.2014.07.002. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25153840

<sup>183</sup> [Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population.](#)  
Levine ME, Suarez JA, Brandhorst S, Balasubramanian P, Cheng CW, Madia F, Fontana L, Mirisola MG, Guevara-Aguirre J, Wan J, Passarino G, Kennedy BK, Wei M, Cohen P, Crimmins EM, Longo VD. *Cell Metab*. 2014 Mar 4;19(3):407-17. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.006. PMID: 24606898

<sup>184</sup> [Caloric restriction improves memory in elderly humans.](#)  
Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Flöel A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 27;106(4):1255-60. doi: 10.1073/pnas.0808587106. Epub 2009 Jan 26. PMID: 1917190

<sup>185</sup> [Diet intervention and cerebrospinal fluid biomarkers in amnesic mild cognitive impairment.](#)  
Bayer-Carter JL, Green PS, Montine TJ, VanFossen B, Baker LD, Watson GS, Bonner LM, Callaghan M, Leverenz JB, Walter BK, Tsai E, Plymate SR, Postupna N, Wilkinson CW, Zhang J, Lampe J, Kahn SE, Craft S. *Arch Neurol*. 2011 Jun;68(6):743-52. doi: 10.1001/archneurol.2011.125. PMID: 21670398

<sup>186</sup> [Fasting-Mimicking Diet Promotes Ngn3-Driven  \$\beta\$ -Cell Regeneration to Reverse Diabetes.](#)  
Cheng CW, Villani V, Buono R, Wei M, Kumar S, Yilmaz OH, Cohen P, Sneddon JB, Perin L, Longo VD. *Cell*. 2017 Feb 23;168(5):775-788.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.040. PMID: 28235195

<sup>187</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03595540>

<sup>188</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03700437>

# Bibliografia

- <sup>189</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03811587>
- <sup>190</sup> [Mild cognitive impairment as a diagnostic entity.](#)  
Petersen RC. J Intern Med. 2004 Sep;256(3):183-94. doi: 10.1111/j.1365-2796.2004.01388.x. PMID: 15324362
- <sup>191</sup> [Free and Cued Selective Reminding Test sensitivity.](#)  
Castilhos RM, Chaves ML. Alzheimers Dement (Amst). 2017 Nov 26;10:75. doi: 10.1016/j.dadm.2017.11.005. eCollection 2018. PMID: 29234723
- <sup>192</sup> [The role of nutrition and diet in Alzheimer disease: a systematic review.](#)  
Shah R. J Am Med Dir Assoc. 2013 Jun;14(6):398-402. doi: 10.1016/j.jamda.2013.01.014. Epub 2013 Feb 16. PMID: 23419980
- <sup>193</sup> [The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action.](#)  
Fernando WM, Martins IJ, Goozee KG, Brennan CS, Jayasena V, Martins RN. Br J Nutr. 2015 Jul 14;114(1):1-14. doi: 10.1017/S0007114515001452. Epub 2015 May 22. PMID: 25997382
- <sup>194</sup> [Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial.](#)  
Valls-Pedret C, Sala-Vila A, Serra-Mir M, Corella D, de la Torre R, Martínez-González MÁ, Martínez-Lapiscina EH, Fitó M, Pérez-Heras A, Salas-Salvadó J, Estruch R, Ros E. JAMA Intern Med. 2015 Jul;175(7):1094-1103. doi: 10.1001/jamainternmed.2015.1668. PMID: 25961184
- <sup>195</sup> [Dietary DHA and health: cognitive function ageing.](#)  
Cardoso C, Afonso C, Bandarra NM. Nutr Res Rev. 2016 Dec;29(2):281-294. doi: 10.1017/S0954422416000184. Epub 2016 Nov 21. PMID: 27866493
- <sup>196</sup> [Mediterranean diet: The role of long-chain ω-3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease.](#)  
Román GC, Jackson RE, Gadhia R, Román AN, Reis J. Rev Neurol (Paris). 2019 Dec;175(10):724-741. doi: 10.1016/j.neurol.2019.08.005. Epub 2019 Sep 11. PMID: 31521398
- <sup>197</sup> [Nutrition and prevention of cognitive impairment.](#)  
Scarmeas N, Anastasiou CA, Yannakoulia M. Lancet Neurol. 2018 Nov;17(11):1006-1015. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30338-7. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30244829
- <sup>198</sup> [Coffee, tea, and caffeine consumption and prevention of late-life cognitive decline and dementia: a systematic review.](#)  
Panza F, Solfrizzi V, Barulli MR, Bonfiglio C, Guerra V, Osella A, Seripa D, Sabbà C, Pilotto A, Logroscino G. J Nutr Health Aging. 2015 Mar;19(3):313-28. doi: 10.1007/s12603-014-0563-8. PMID: 25732217
- <sup>199</sup> [Recommendations for Development of New Standardized Forms of Cocoa Breeds and Cocoa Extract Processing for the Prevention of Alzheimer's Disease: Role of Cocoa in Promotion of Cognitive Resilience and Healthy Brain Aging.](#)  
Dubner L, Wang J, Ho L, Ward L, Pasinetti GM. J Alzheimers Dis. 2015;48(4):879-89. doi: 10.3233/JAD-150536. PMID: 26402120
- <sup>200</sup> [Body composition and morphological assessment of nutritional status in adults: a review of anthropometric variables.](#)  
Madden AM, Smith S. J Hum Nutr Diet. 2016 Feb;29(1):7-25. doi: 10.1111/jhn.12278. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25420774
- <sup>201</sup> [Body composition and morphological assessment of nutritional status in adults: a review of anthropometric variables.](#)  
Madden AM, Smith S. J Hum Nutr Diet. 2016 Feb;29(1):7-25. doi: 10.1111/jhn.12278. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25420774
- <sup>202</sup> [Bioelectrical impedance analysis-part II: utilization in clinical practice.](#)  
Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Manuel Gómez J, Lilienthal Heitmann B, Kent-Smith L, Melchior JC, Pirlich M, Scharfetter H, M W J Schols A, Pichard C; ESPEN. Clin Nutr. 2004 Dec;23(6):1430-53. doi: 10.1016/j.clnu.2004.09.012. PMID: 15556267
- <sup>203</sup> [The theory and fundamentals of bioimpedance analysis in clinical status monitoring and diagnosis of diseases.](#)  
Khalil SF, Mohktar MS, Ibrahim F. Sensors (Basel). 2014 Jun 19;14(6):10895-928. doi: 10.3390/s140610895. PMID: 24949644

# Bibliografia

---

- <sup>204</sup> [A Frailty Index Based On Deficit Accumulation Quantifies Mortality Risk in Humans and in Mice.](#)  
Rockwood K, Blodgett JM, Theou O, Sun MH, Feridooni HA, Mitnitski A, Rose RA, Godin J, Gregson E, Howlett SE. Sci Rep. 2017 Feb 21;7:43068. doi: 10.1038/srep43068. PMID: 28220898
- <sup>205</sup> [The Addenbrooke's Cognitive Examination Revised \(ACE-R\): a brief cognitive test battery for dementia screening.](#)  
Mioshi E, Dawson K, Mitchell J, Arnold R, Hodges JR. Int J Geriatr Psychiatry. 2006 Nov;21(11):1078-85. doi: 10.1002/gps.1610. PMID: 16977673
- <sup>206</sup> [Fasting in diabetes treatment \(FIT\) trial: study protocol for a randomised, controlled, assessor-blinded intervention trial on the effects of intermittent use of a fasting-mimicking diet in patients with type 2 diabetes.](#)  
van den Burg EL, Schoonakker MP, van Peet PG, van den Akker-van Marle ME, Willems van Dijk K, Longo VD, Lamb HJ, Numans ME, Pijl H. BMC Endocr Disord. 2020 Jun 24;20(1):94. doi: 10.1186/s12902-020-00576-7. PMID: 32580710
- <sup>207</sup> [Effects of Fasting-Mimicking Diet and Specific Meal Replacement Foods on Blood Glucose Control in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial.](#)  
Tang F, Lin X. Oxid Med Cell Longev. 2020 Dec 5;2020:6615295. doi: 10.1155/2020/6615295. eCollection 2020. PMID: 33376581
- <sup>208</sup> [Efficacy of a fasting-mimicking diet in functional therapy for depression: A randomised controlled pilot trial.](#)  
Maniaci G, La Cascia C, Giammanco A, Ferraro L, Chianetta R, Di Peri R, Sardella Z, Citarrella R, Mannella Y, Larcian S, Montana S, Mirisola MG, Longo V, Rizzo M, La Barbera D. J Clin Psychol. 2020 Oct;76(10):1807-1817. doi: 10.1002/jclp.22971. Epub 2020 May 11. PMID: 32394438
- <sup>209</sup> [Safety and feasibility of various fasting-mimicking diets among people with multiple sclerosis.](#)  
Roman SN, Fitzgerald KC, Beier M, Mowry EM. Mult Scler Relat Disord. 2020 Jul;42:102149. doi: 10.1016/j.msard.2020.102149. Epub 2020 May 6. PMID: 32408153
- <sup>210</sup> [Exceptional tumour responses to fasting-mimicking diet combined with standard anticancer therapies: A sub-analysis of the NCT03340935 trial.](#)  
Ligorio F, Fucà G, Provenzano L, Lobefaro R, Zanenga L, Vingiani A, Belfiore A, Lorenzoni A, Alessi A, Pruneri G, de Braud F, Vernieri C. Eur J Cancer. 2022 Sep;172:300-310. doi: 10.1016/j.ejca.2022.05.046. Epub 2022 Jul 8. PMID: 35810555