Relazione di progetto finale

CirculAting Bile Acids as biomarkers of metabolic health - Linking microbiotA, Diet and Health.

ACRONIMO DEL PROGETTO:
CABALA_Diet&Health

Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, Trento, 38010.
22/12/2020

Indice

1. Progetto 3
2.Descrizione del progetto 5
3.Relazione intermedia/finale del progetto 6
3.1.Obiettivi, benefici e criticità del progetto 7
4.Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto 8

Progetto

Dati generali

Titolo del progetto	CirculAting Bile Acids as biomarkers of metabolic health - Linking microbiotA, Diet and Health
Acronimo del progetto	CABALA_DIET&HEALTH

Area strategica di intervento[1]	Area 4 - Qualità, tipicità e sicurezza degli alimenti e stili di vita sani

[1] **Note**

Inserire una delle 6 aree prioritarie previste dal capitolo 2 del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:

Area 1 - Aumento sostenibile della produttività, della redditività e dell'efficienza delle risorse negli agro ecosistemi
Area 2 - Cambiamento climatico, biodiversità, funzionalità suoli e altri servizi ecologici e sociali dell'agricoltura
Area 3 - Coordinamento e integrazione dei processi di filiera e potenziamento del ruolo dell'agricoltura
Area 4 - Qualità, tipicità e sicurezza degli alimenti e stili di vita sani
Area 5 - Utilizzo sostenibile delle risorse biologiche a fini energetici ed industriali
Area 6 - Sviluppo e riorganizzazione del sistema della conoscenza per il settore agricolo, alimentare e forestale
Area 7 - Pesca e acquacoltura

Linea di attività[2]	Valorizzazione della relazione tra alimentazione e salute e della valenza nutraceutica dei prodotti agroalimentari.
Settore produttivo[3]	k) Piante officinali;

[2] Inserire una delle seguenti linee di attività (previste dal Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale 2014-2020). La linea di attività da inserire dovrà corrispondere all'area strategica di intervento indicata nel precedente campo, ovvero per la:

Area 1 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

a. Scelte varietali, di razza, di destinazione d'uso, miglioramento genetico mediante l'utilizzo di biotecnologie sostenibili;

b. Uso sostenibile dei nutrienti, dei prodotti fitosanitari e dei prodotti zooprofilattici, utilizzazione di microrganismi, insetti utili e molecole bioattive per la difesa delle piante;

c. Ottimizzazione dei processi produttivi (tecnica colturale, alimentazione, benessere animale, pratiche di prevenzione, risparmio energetico, ecc.), anche mediante l'utilizzo di sistemi di supporto alle decisioni (telerilevamento, agricoltura e zootecnia di precisione, meccanizzazione integrale, robotica e altri sistemi automatici intelligenti, applicazione di principi e strumenti di intelligenza artificiale ecc.) e biotecnologie sostenibili;

d. Soluzioni tecnologiche per il miglioramento degli impianti e delle strutture aziendali;

e. Gestione efficiente della risorsa idrica e della qualità delle acque;

f. Conservazione, conservabilità e condizionamento delle produzioni (riduzione degli sprechi, conservanti naturali ecc.);

g. Strumenti e sistemi funzionali alla gestione aziendale (pianificazione, costi di produzione, diversificazione ecc.) e alla sua caratterizzazione (impronta ecologica).

Area 2 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

a. Strategie per la mitigazione e per lo studio dell'adattamento al cambiamento climatico;

b. Valorizzazione delle varietà e razze locali e salvaguardia delle risorse genetiche;

c. Tutela del fattore "suolo": conservazione, qualità, fertilità e salvaguardia della biodiversità microbica;

d. Valorizzazione di alcuni servizi ecologici forniti dal settore primario: manutenzione e ripristini ambientali, verde urbano, agricoltore/selvicoltore custode, bonifica dei terreni inquinati ecc.;

e. Valorizzazione del ruolo sociale dell'agricoltura: "agricoltura sociale", relazioni urbano – rurale, accettabilità sociale dell'attività agricola.

Area 3 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

a. Soluzioni organizzative, economiche e sociali alle difficoltà strutturali di integrazione orizzontale e verticale nei distretti e nelle filiere;

b. Soluzioni tecnologiche per il miglioramento dei processi di filiera;

c. Sviluppo di sistemi distributivi, commerciali, promozionali e di marketing.

Area 4 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

a. Produzione di alimenti di qualità per tutti (food security);

b. Miglioramento, tutela e tracciabilità della qualità e della distintività e adeguamento dei relativi standard di certificazione;

c. Tecniche sostenibili per la trasformazione, conservazione e confezionamento dei prodotti agroalimentari;

d. Valorizzazione della relazione tra alimentazione e salute e della valenza nutraceutica dei prodotti agroalimentari.

Area 5 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

a. Sviluppo e razionalizzazione delle filiere di biomasse e di biocarburanti con adeguati requisiti di sostenibilità ambientale ed economica;

b. Sviluppo di bioraffinerie per la produzione di materiali industriali e mezzi tecnici a partire da residui e scarti agricoli nell'ottica dell'adeguata remunerazione del settore agricolo.

Area 6 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

a. Nuovi strumenti di governance per il coordinamento e l'efficienza del sistema della conoscenza: analisi dei fabbisogni, pianificazione, monitoraggio, valutazione ecc.;

b. Promozione del trasferimento dell'innovazione mediante servizi di supporto, formazione e consulenza alle imprese agricole, alimentari e forestali;

c. Sviluppo di nuove modalità.

[3] Inserire uno degli 13 settori produttivi previsti dall'Allegato A del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:

a) Zootecnico;
b) Orticolo;
c) Cerealicolo;
d) Viticolo;
e) Frutticolo;
f) Olivicolo;
g) Biologico;
h) Floricolo;
i) Forestale;
j) Innovazione sociale;
k) Piante officinali;

Tipo di progetto	**X Bando** ☐ **Affidamento diretto** ☐ **Sportello**
Riferimento del Bando/Affidamento diretto/Sportello	ERA-HDHL Call for Joint Transnational Research Proposals: "Biomarkers for Nutrition and Health" 19th of April 2016
Durata del progetto	36
Costo ammesso	€. 151.515,15
Contributo concesso	€. 150.000,00
Importo rendicontato	€. 182.207,86

Soggetto proponente il progetto	Fondazione Edmund Mach	**Natura giuridica** ☐ **Pubblico** **X Privato**
Rappresentante legale	Annapaola Rizzoli – RZZNPL63E70C372J	

Coordinatore del progetto	Kieran Tuohy - THYKNM71P06Z116I

Numero di Unità Operative	1 - uno	
ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE		
Unità Operativa n. 1 - Denominazione	Fondazione Edmund Mach	**Natura giuridica** ☐ **Pubblico** **X Privato**

l) Risicolo;
m) Pesca e acquacoltura.

Numero di partner esterni al progetto	4- quattro	
ELENCO DEI PARTNER ESTERNI DI PROGETTO		
Partner n. 1 - Denominazione	**Università di Reading, Regno Unito (UoR)**	**Natura giuridica** **X Pubblico** **□ Privato**
Partner n. 2 - Denominazione	**University College Cork, Irlanda (UCC)**	**Natura giuridica** **X Pubblico** **□ Privato**
Partner n. 3 - Denominazione	**EPIMED Research Center, University of Insubria, Varese (USDI)**	**Natura giuridica** **X Pubblico** **□ Privato**
Partner n. 4 - Denominazione	**Ben-Gurion University del Negev, Israele (BGU)**	**Natura giuridica** **X Pubblico** **□ Privato**

L'esempio riportato nel presente modello è riferito a un numero di due unità operative e di due partner. Qualora il progetto dovesse prevedere più unità operative o più partner aggiungere una riga per ogni unità operativa/partner.

Descrizione del progetto

Sintesi del progetto

Gli acidi biliari (BA) attraverso il recettore accoppiato a proteina G 1 (GPBAR1 o TGR5) e i recettori nucleari quali il recettore farnesoide X (FXR) regolano l'infiammazione nei mammiferi, ed il metabolismo di lipidi, glucosio, e xenobiotici. Il microbiota intestinale modula il ricircolo enteoepatico degli acidi biliari ed i metaboliti secondari microbici degli acidi biliari sembrano essere agonisti del recettore più potenti degli acidi biliari stessi, fornendo un legame meccanistico fra la struttura/funzione del microbioma e la regolazione della fisiologia dell'ospite. Evidenze derivanti principalmente da studi su animali mostrano che le fibre alimentari ed i polifenoli possono legarsi agli acidi biliari, trasportandoli al colon modificando il loro assorbimento e/o l'escrezione e tale effetto piò avere un impatto rilevante sul metabolismo degli acidi biliari. Similmente, alcuni batteri probiotici che posseggono attività idrolizzante dei sali biliari (BSH) modulano il profilo degli acidi biliari circolanti (CBA) ed influenzano fortemente l'assorbimento del colesterolo. Tuttavia dati sull'uomo che confermino la modulazione dei profili di CBA attraverso la dieta e la conseguente regolazione dell'omeostasi fisiologica rimangono tuttora elusivi. CABALA_DIET&HEALTH ha come obiettivo quello di stabilire i profili di BA circolanti come biomarcatori di salute, modulati tramite l'alimentazione e l'esercizio fisico, i quali riflettono un cambiamento nella salute metabolica. Questo progetto stabilirà in che modo la modulazione dei BA attraverso la dieta è indice di cambiamento nello stato di salute. Utilizzando campioni ottenuti dalla coorte RoCAV e da trial clinici randomizzati esistenti (RCT), correleremo i profili di CBA con l'aderenza alla dieta mediterranea, il consumo di cibi ricchi di fibre e polifenoli e misureremo la salute metabolica (BMI, omeostasi glucosio/insulina e dei lipidi). In un RCT appropriatamente disegnato, misureremo la capacità di probiotici, prebiotici e polifenoli di modulare il profilo post-prandiale dei BA e in un intervento sulla dieta e sullo stile di vita a lungo termine (18 mesi), su larga scala (n=300) misureremo come cibi ricchi di polifenoli e l'esercizio fisico promuovono la salute metabolica in individui suscettibili attraverso la modulazione del segnale dei BA. Infine, collegheremo i profili di BA o il metabotipo con l'impronta del microbioma e la potenziale biotrasformazione dei BA, utilizzando metagenomica ad alta risoluzione e stabilendo le basi molecolari della regolazione dell'omeostasi immunitaria e metabolica da parte dei BA mediante misurazione del potenziale di attivazione del relativo recettore per il metabotipo di BA. CABALA_DIET&HEALTH fornirà un'evidenza diretta sull'uomo che le interazioni dieta:microbiota intestinale, come indicato dai profili di CBA, determinano il rischio di malattie metaboliche fornendo un biomarcatore convalidato di salute e una base molecolare di efficacia per probiotici, prebiotici e polifenoli.

Parole chiave (max 10 parole)

Profili di acidi biliari circolanti, microbiota, polifenoli, fibra, probiotici, salute, rischio metabolico

Relazione intermedia/finale del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO

Relazione tecnico-scientifica (intermedia max 10 pagine – finale max 20 pagine)

[Deve essere riportato in maniera chiara ed esaustiva lo stato dell'arte del progetto al momento della richiesta di monitoraggio o di liquidazione parziale/finale. La relazione è utilizzata dall'ufficio per controlli e verifiche tecnico-scientifiche e amministrativo-contabili sulle attività finanziate.]

Title: CirculAting Bile Acids as biomarkers of metabolic health - Linking microbiotA, Diet and Health. **(CABALA_Diet&Health)**

Scopo: L'obiettivo generale di CABALA_DIET & HEALTH è di fornire prove dirette nell'uomo che le interazioni tra microbiota intestinale e alimentazione, come indicato dai profili degli acidi biliari circolanti (CBA), determinino il rischio di malattie metaboliche, fornendo al contempo un biomarker di salute validato e una base molecolare univoca per l'efficacia probiotici, prebiotici e polifenoli.

Partners: Il progetto è coordinato dalla Fondazione Edmund Mach (FEM), Italia, e coinvolge partners dal Regno Unito (University of Reading, UoR), Italia (Università degli Studi dell'insubria, UDSI) e Irlanda (University College Cork, UCC), e come collaboratore la Ben Gurion University of Negev (BGU) in Israele. Tutti i partner hanno firmato il consortium agreement.

Data di inizio : 01 Giugno 2017

Data di fine : 31 Decembre 2020 (FEM)

Website : http://www.cabalaproject.eu/

Gli obiettivi specifici di CABALA_DIET&HEALTH sono:

1. Correlare i profili di CBA con parametri di salute e malattie metaboliche legate alla dieta in popolazioni a rischio.

2. Correlare i profili di CBA con pattern alimentari individuali e il consumo di cibo

3. Determinare la modulazione specifica dei profili di CBA associati a un migliorato stato di salute

4. Correlare i profili di CBA con profili di batteri intestinali ed i loro potenziali enzimatici nel modulare la circolazione enteroepatica dei BA.

5. Misurare come specifiche classi di componenti bioattivi dei cibi comunemente trovati in diete associate a basso rischio di malattie metaboliche abbiano effetto sia sui CBA a digiuno, e sia su come i livelli di CBA post-prandiali cambino in risposta a pasti test standardizzati.

6. Misurare se i profili di CBA riflettono uno stato di salute migliorato e/o un ridotto rischio di malattie metaboliche conseguenti un intervento sulla dieta curativo a lungo termine (18 mesi) e aumentato esercizio fisico.

7. Coordinazione del progetto, gestione della comunicazione, diffusione dei risultati e sito web.

8. Diffusione dei risultati del progetto, pubblicazioni scientifiche, l'identificazione e la tutela della proprietà intellettuale, la comunicazione esterna.

CABALA_DIET&HEALTH è progettato per raggiungere questi obiettivi attraverso 5 principali attività:

1. **UTILIZZO DEI DATI DA STUDI E COORTI NUTRIZIONALI ESISTENTI:** Utilizzando campioni disponibili da studi esistenti (FEM, UoR, UDSI, UCC), il progetto mira a correlare i profili BA circolanti (FEM) con indicatori di salute metabolica, come indice di massa corporea, insulino-omeostasi / omeostasi glicidica e lipidica (UDSI) e composizione del microbiota intestinale (FEM). Gli studi esistenti includono:
   (1) AVAG (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01988389): intervento dietetico con mele Renetta Canada, ricche di polifenoli, 40 soggetti ipercolesterolemici, studio crossover RCT, Reading, UK in collaborazione con FEM.
   (2) Studio Aleurone (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02067026): studio MioCuore, prodotti da forno arricchiti con aleurone di frumento, n = 80 soggetti in sovrappeso, RCT in parallelo, FEM, Italia
   (3) Studio PreBiOil (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02664428): Studio PreBiOil, FEM, biscotti arricchiti di sansa di oliva, n = 64 soggetti obesi, RCT in parallelo, FEM, Italia.
   (4) RoCav (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27894269/): Rischio di malattie cardiovascolari e aneurisma dell'aorta addominale a Varese (RoCAV) studio sulla popolazione, maschi di età compresa tra 50 e 75 anni e femmine di età compresa tra 60 e 75 anni , Varese, Italia. N = 5000, 1000 soggetti selezionati per l'analisi CABALA_diet &

health. UDSI

(5) Campioni di chirurgia bariatrica Roma: campioni di feci e plasma da pazienti sottoposti a gastrectomia a manica, diversione biliopancreatica o bypass gastrico con route-en-Y, prima e 12 mesi dopo l'intervento (più 7 e 30 giorni dopo l'intervento per campioni di gastrectomia a manica). Collaborazione con Università Cattolica di Roma e Bambino Gesù, Roma (Prof. Mingrone, Prof. Basso e Prof. Casella), 80 campioni. Questo studio è stato incluso come strategia di mitigazione a causa dei ritardi nell'anno 1 di CABALA_diet & health come descritto nel rapporto del primo anno e nel rapporto a medio termine di JPI. FEM ha analizzato gli acidi biliari circolanti, il microbiota mediante sequenziamento di rRNA 16S e sequenziamento completo full shotgun per le feci raccolte da questi pazienti.

Il ruolo di FEM in CABALA_diet & health è stato quello di coordinare le attività tra le organizzazioni partner (UoR, UDSI, UCC) e collaboratore (BGU) e di eseguire l'analisi degli acidi biliari plasmatici (UCC ha eseguito l'analisi BA fecale) e l'analisi del microbioma utilizzando sia la meta tassonomia 16S rRNA sia una analisi full shotgun per un numero limitato di campioni. FEM ha fornito studi di partenza AVAG, Aleurone e PreBiOil, ed inoltre nuovi campioni dal progetto di chirurgia bariatrica Roma come strategia di mitigazione dei ritardi sia all'inizio del progetto che successivamente a causa delle restrizioni COVID_19 che hanno ritardato l'identificazione dei microbiomi (n = 50).
Metodi di quantificazione degli acidi biliari: la quantificazione dei BA plasmatici per tutti i campioni CABALA_diet & health è stata eseguita utilizzando un metodo stabilito e convalidato come parte di CABALA_diet & health. Questo lavoro è stato condotto da Maria Ulaszewska nei primi mesi di CABALA_diet & health, quando la Dottoressa Ulaszewska lavorava ancora nel Gruppo di Metabolomica del Prof. Fulvio Mattivi e della Dott.ssa Urska Vrhovsek presso FEM, prima della sua partenza per l'Ospedale San Raffaele di Milano. Tutte le analisi dei campioni eseguite presso FEM per il progetto CABALA_diet & health sono state eseguite dal Dr Andrea Mancini (Unità di Nutrizione e Nutrigenomica e Unità di Metabolomica, FEM) e da Simone Delaiti, assistente di ricerca in visita dal partner UDSI. Il metodo è stato pubblicato nel Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (DOI: 10.1016 / j.jpba.2019.05.002). Utilizzando i dati di uno studio nutrizionale sul consumo di mirtilli, il documento non solo ha descritto il metodo di analisi, ma ha evidenziato differenze significative nelle concentrazioni di CBA tra uomini e donne (inferiore nelle donne) e la capacità di identificare i metabotipi di CBA all'interno della popolazione in studio (n = 20). CABALA_diet & health è menzionato come progetto a supporto della pubblicazione.
Il team FEM ha correlato il CBA con i profili di rRNA 16S del microbiota intestinale e con i parametri clinici relativi al rischio metabolico in tre RCT (Aleurone, PreBiOil e lo studio AVAG) e in campioni di chirurgia bariatrica di Roma. Abbiamo anche incluso dati di 16S rRNA, metagenomica e nuove misurazioni di CBA da una coorte di pazienti bariatrici, come parte di una strategia di mitigazione, delineata nei reports del primo anno e di medio termine. Questi dati, che sono relativi a campioni raccolti prima e dopo la chirurgia bariatrica e la remissione da diabete nel post-operatorio, forniscono uno strumento unico per esaminare l'impatto del drastico rimodellamento del microbioma su CBA e servono come un confronto importante con gli effetti più fini attesi dall'intervento sulla dieta. In effetti, correlando i profili di rRNA 16S con CBA raccolti da studi nutrizionali FEM Aleurone e PreBiOil e dai campioni di chirurgia bariatrica Roma, vediamo chiaramente associazioni più sottili tra CBA e la struttura della comunità del microbiota intestinale negli studi di intervento sulla dieta, mentre queste associazioni diventano più forti con i cambiamenti più estremi del microbioma associati alla chirurgia bariatrica (**Figura 1, appendice**). Una delle principali osservazioni di questa analisi è stata che le associazioni tra singoli phyla batterici e singoli acidi biliari plasmatici non sono sempre riproducibili negli studi. Ciò suggerisce che da un lato batteri diversi potrebbero occupare le stesse nicchie ecologiche in individui o coorti diversi, oppure dall'altro lato il metabolismo di BA sia meglio visto come un'attività di comunità, con diverse specie batteriche che svolgono gli stessi compiti enzimatici in comunità diverse. Infatti, dopo aver eseguito modelli matematici multi-variati (in questo caso combined partial least squares with network analysis, **Figura 2A, appendice**) abbiamo osservato associazioni più forti, statisticamente più significative e riproducibili tra CBA e descrittori della struttura della comunità del microbioma assimilabili ad enterotipi nei diversi studi. Allo stesso modo, le correlazioni tra i singoli batteri e le conversioni biochimiche note (ad es. Conversione dell'acido colico (CA) in acido desossicolico (DCA) hanno permesso di definire più chiaramente le associazioni con i singoli taxa batterici e il metabolismo degli acidi biliari. Questo era anche il caso della correlazione dei rapporti dei prodotti finali alternativi del metabolismo degli BA, ad esempio acido ursodesossicolico (UDCA) *versus* acido litocolico (LCA) (**Figura 2B**).

Lo studio AVAG ha mostrato che 2 mele al giorno riducono significativamente i livelli di colesterolo e ICAM-1 sia negli uomini che nelle donne (**Figura 3**). I risultati dello studio AVAG (pubblicazione congiunta FEM e UoR) sono stati pubblicati sull'American Journal of Nutrition (febbraio 2020 doi: 10.1093 / ajcn / nqz282.) con il riconoscimento del supporto di CABALA_diet & health e FOODBALL per statistiche e modelli matematici. I risultati chiave dell'analisi CABALA_diet & health dei dati dello studio AVAG sulle mele includono un modello matematico che dimostra che l'LCA circolante è positivamente associato ai livelli di colesterolo e all'età e che la quantità di acido glicosodeossicolico circolante (GUDCA) prevede la riduzione del colesterolo dopo il consumo cronico di 2 mele al giorno per 2 mesi (**Figura 4**). Il modello matematico ha anche mostrato che il consumo di mele attenua l'effetto dell'età sui livelli di colesterolo nel sangue (**Figura 4a, appendice**). Ulteriori analisi dei dati di questo studio ci hanno permesso di esplorare i biomarcatori dell'assunzione di mele e di correlarli con la composizione del microbiota fecale. Questo lavoro è stato pubblicato in un secondo articolo sull'European Journal of Nutrition (doi: 10.1007 / s00394-020-02201-8.). Questo articolo riconosce anche il contributo dei progetti JPI-ERA HDHL CABALA_diet & health e FOODBALL.
Nell'ambito del progetto CABALA_diet & health, i campioni fecali di questo studio (AVAG) sono stati inviati alla Prof.ssa

Susan Joyce, partner dell'UCC, per la misurazione degli acidi biliari fecali. Questo lavoro è stato completato e un nuovo articolo di ricerca, con autori di FEM, UoR e UCC è attualmente in preparazione con data di pubblicazione prevista per aprile 2021. L'analisi statistica presso l'UCC ha identificato specifici profili degli acidi biliari associati ai fenotipi responder e non responder, fornendo nuove informazioni sui metabotipi degli acidi biliari (**Figura 5**). Il lavoro di segnalazione cellulare UCC esplorerà le conseguenze fisiologiche dei cambiamenti indotti dalla dieta nel metabolismo microbico degli acidi biliari sarà pubblicato in un terzo articolo dallo studio AVAG con più partner coinvolti (UCC, FEM, UoR) ed è programmato per la primavera 2021 (i partner UCC, UoR e UDSI hanno ricevuto estensioni per i loro progetti a causa delle restrizioni COVID-19 e dei ritardi precedenti, fino all'agosto 2021).

I campioni di chirurgia bariatrica Roma analizzati all'interno di CABALA_diet & health provengono da due diversi esperimenti. La prima serie comprende microbioma, BA plasmatici e misurazioni cliniche in pazienti sottoposti a gastrectomia a manica con campionamento prima dell'intervento (giorno 0) e poi al giorno 7, 30 e ad un anno dall'intervento. La seconda serie di dati prevede un confronto tra microbioma fecale, BA plasmatico e parametri clinici in pazienti sottoposti a uno dei tre distinti tipi di interventi bariatrici (sleeve gastrectomy, Biliopancreatic Diversion o ruote-en-Y gastric bypass), prima dell'intervento ed a 12 mesi dall'intervento. Gli studi sono stati eseguiti presso l'Ospedale Bambino Gesù di Roma, in collaborazione con l'Università Cattolica di Roma, e le misurazioni di microbioma e BA sono state eseguite da FEM. Le **Figure 6A** e **6B** e la **Tabella 1** nell'**appendice** mostrano lo spostamento dei profili BA plasmatici dopo l'intervento. Coerentemente con la letteratura, abbiamo scoperto che dopo un picco iniziale di BA plasmatici, in particolare BA secondari, i livelli plasmatici tornano ai livelli iniziali ma con un profilo alterato, con BA secondari che sono i principali fattori di separazione dopo 1 anno rispetto ad altri timepoints. La gastrectomia a manica ha mostrato di avere un impatto simile sulla composizione del microbiota intestinale, con una drastica riduzione della alpha-diversity 7 e 30 giorni dopo l'intervento, per poi tornare a una maggiore diversità microbica dopo un anno (**Figura 7**). Allo stesso modo, la beta-diversity misurata dall'indice di Bray Curtis, ha mostrato una divergenza direzionale tra i microbiomi immediatamente dopo l'intervento chirurgico (**Figura 8**).

2. MODULAZIONE POSTPRANDIALE DEL MICROBIOTA IN UNO STUDIO SULLA NUTRIZIONE: (UoR, Reading CABALA study https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03369548) Il partner UoR ha eseguito uno studio con disegno in parallelo, randomizzato, controllato, su uomini e donne sani, abituali consumatori di colazione, di età compresa tra 25 e 70 anni e con BMI 23-32 kg/m^2. Lo scopo era definire come i cambiamenti nel microbiota intestinale indotti dall'ingestione cronica (8 settimane) di probiotici (*Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242), prebiotici (avena) o polifenoli (mele Renetta Canada) influenzano sia il digiuno che profilo postprandiale di BA circolante (**Figura 9** e **10**). L'obiettivo era misurare il cambiamento nel profilo CBA postprandiale causato dalla modulazione dietetica del microbiota intestinale. Lo studio è stato condotto da UoR, che ha anche misurato i parametri clinici. Tutti gli alimenti utilizzati nello studio, comprese le mele fresche spedite dai produttori in Italia da FEM, sono stati forniti gratuitamente da collaboratori industriali (Quakers Oats, Melinda Srl. E UAS Labs). Lo studio ha ricevuto una valutazione etica favorevole dal Comitato etico e di ricerca dell'Università di Reading e lo studio è stato completato entro la fine del 2019 e tutti i campioni sono stati spediti a FEM e UCC all'inizio di gennaio 2020. La **Figura 10** riassume l'intervento dietetico e le caratteristiche antropologiche dei soggetti. L'UoR ha richiesto un'estensione anticipata del progetto a causa del lento reclutamento per lo studio umano di nutrizione. Questo è stato concesso dalla BBSRC, la agenzia di finanziamento di afferenza per UoR. Una seconda proroga è stata richiesta a causa del COVID-19 e del congedo di maternità della ricercatrice coinvolta presso UoR, anche questa concessa dal BBSRC. Questa proroga è fino a maggio 2021 e consentirà all'UoR di completare l'analisi dei campioni biologici raccolti durante l'intervento dietetico. I livelli plasmatici di CBA e FGF-19 sono stati misurati al FEM (tutte le misurazioni sono state completate e i dati inviati a UoR PI Prof Julie Lovegrove). Il partner UCC ha misurato BA fecale e FEM hanno misurato i profili del microbiota fecale (profilazione dell'rRNA 16S basata su ampliconi, tutti i dati completati e condivisi con UoR). Vengono ora eseguite analisi statistiche e modelli matematici, inclusi sottogruppi (analisi responder *versus* non responder) e i dati di BA e 16S rRNA di FEM sono riassunti nelle **Figure 1** e nelle **Tabelle 2** e **3**. I primi risultati mostrano che, come previsto, gli interventi dietetici non hanno modificato la composizione lipidica plasmatica (lo studio non è stato disegnato con calcolo della numerosità del campione con l'obiettivo di osservare cambiamenti nella dislipidemia, che avrebbe richiesto un numero maggiore di soggetti, bensì per osservare potenziali correlazioni tra BA e altri marcatori clinici e biochimici), e sebbene i cambiamenti grossolani osservati nelle concentrazioni medie di BA a digiuno o nelle risposte BA postprandiali (area media sotto la curva) non fossero statisticamente significativi a causa di alti livelli di variazioni interindividuali (**Figure 11-13**), sono stati evidenziati piccoli cambiamenti nel microbioma (**Tabella 2** e **3**) e nelle risposte individuali post-prandiali di BA e FGF-19. UCC, misurando le concentrazioni di BA nelle feci, ha identificato responder e non responder. Vengono ora intraprese analisi statistiche avanzate e modelli matematici per modellare i cambiamenti individuali nel tempo e correlarli ai profili di rRNA 16S individuali. Un incontro online nel settembre 2020 ha delineato due pubblicazioni in merito a questo lavoro. La pubblicazione iniziale sarà sottoposta a una rivista di nutrizione che riporta l'obiettivo primario dello studio e mette in correlazione le risposte postprandiali di BA e FGF-19 con l'assunzione di cibo, i profili del microbiota fecale e le misure cliniche. Una seconda pubblicazione sarà presentata alla rivista *Microbiome*, presentando le correlazioni tra responder e non responder, possibili metabotipi per il metabolismo di BA e come rispondono alla sfida dietetica. Entrambi gli articoli sono ora in preparazione per la pubblicazione a metà del 2021 e coinvolgeranno autori di UoR, FEM e UCC.

3. ESPERIMENTI DI SEGNALAZIONE CELLULARE: Questi esperimenti, condotti da UCC, mirano a valutare il potenziale di diversi profili BA nella regolazione della risposta immunitaria e delle vie metaboliche utilizzando modelli di

colture cellulari in vitro. UCC ha costruito vettori di fusione reporter per fornire strumenti rapidi per valutare l'attivazione dei recettori coinvolti nella segnalazione mediata da BA, come il recettore FXR nucleare e l'attivazione di GPCR5. Diverse linee cellulari sono state testate per l'espressione di diversi recettori degli acidi biliari (BAR), comprese le linee cellulari epiteliali HT29 e Caco2, la linea cellulare epatica HepG3 e la linea cellulare dell'intestino tenue FHs 74. Diversi esperimenti in vitro sono stati eseguiti da UCC per modellare Segnalazione cellulare indotta da BA. I primi risultati includono la dimostrazione che il muco intestinale interferisce con la segnalazione cellulare mediata da BA ed è necessario per mantenere o migliorare l'integrità del monostrato epiteliale trattato con acido taurodesossicolico (T-DCA) BA. È stato anche dimostrato che la segnalazione delle cellule BA è ridotta o nascosta dalla presenza di lipidi.
Le attività completate dagli UCC includono:
io. Valutazione dell'espressione proteica delle diverse BAR in presenza di agonisti, antagonisti e ligandi;
ii. Valutazione dell'espressione genica e dell'attivazione non solo del recettore ma anche della via di segnalazione a valle dello stesso in risposta a differenti profili di BA;
iii. Validazione di costrutti plasmidici e valutazione dell'espressione di differenti BAR in risposta a cambiamenti nei profili BA;
iv. Valutazione della presenza di specifici profili BA associati a salute o malattia in modelli cellulari già validati
v. Analisi di BA su campioni raccolti dopo il completamento dello studio CABALA_diet & health UoR.
vi. L'UCC ha analizzato campioni di acqua fecale dallo studio AVAG (FEM) al fine di condurre esperimenti *in vitro* per esaminare come il consumo di mele modula il microbiota intestinale e il metabolismo di BA in uno studio in cui tale nutrizione ha mostrato cambiamenti significativi nei livelli circolanti di CBA e colesterolo.
UCC ha ricevuto un'estensione fino a maggio 2021.

4. STUDIO SU DIETA A LUNGO TERMINE E SULLO STILE DI VITA: Lo studio DIRECT-PLUS condotto dal collaboratore del progetto Ben Gurion University of the Negev in Israele (Professor Iris Shai), ha misurato l'impatto di tre diverse strategie di stile di vita sul peso corporeo e sui fattori di rischio di malattie metaboliche (inclusa la deposizione di grasso corporeo e epatico mediante risonanza magnetica) e funzione cognitiva. I tre interventi sullo stile di vita erano (i) Linee guida dietetiche salutari e più esercizio fisico (iscrizione gratuita in palestra), (ii) Una dieta in stile mediterraneo (Med) (alimenti forniti) più esercizio fisico, o (iii) la dieta in stile mediterraneo verde (Green Med) (con più del doppio della quantità di polifenoli nella dieta rispetto alla dieta Med e ridotto apporto di carne, alimenti forniti) più esercizio fisico. I soggetti pre-diabetici (n = 100 per trattamento) hanno seguito gli interventi sullo stile di vita per 18 mesi e le modifiche nelle misure fisiologiche correlate a malattia metabolica (BGU), BA circolante (FEM), profili microbiota (FEM) e metaboliti plasmatici dei polifenoli (FEM) misurata al basale (0) e dopo 6 e 18 mesi di intervento dietetico (**Figura 14**). Lo studio DIRECT-PLUS (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03020186) è stato completato entro la fine del 2018 e FEM ha completato tutti i profili di rRNA 16S del microbioma fecale, BA e misurazioni di polifenoli (analisi statistica dei dati e interpretazione in corso). L'analisi preliminare dei dati BA dallo studio DIRECT-PLUS mostra un impatto significativo della dieta sui profili CBA, con la dieta Green Med che mostra la più forte riduzione delle concentrazioni di CBA (**Figura 15** e **16**). Ciò è coerente con la letteratura e con i dati dalle correlazioni di base tra i profili di rRNA 16S e CBA dallo studio DIRECT-PLUS (**Figura 17**) e dallo studio RoCAV (vedere di seguito, **Tabelle 4** e **5**). I risultati iniziali mostrano che i profili BA plasmatici basali mostrano correlazioni significative con obesità (BMI, circonferenza della vita, peso), pressione sanguigna, livelli di colesterolo e dislipidemia **(Figura 17)**. Ciò è coerente con le analisi di correlazione condotte da USDI (vedi sotto) per lo studio RoCAV. L'analisi congiunta di questi set di dati convaliderà, in due popolazioni molto diverse (1000 soggetti, uomini e donne di età superiore ai 50 anni campionati tra la popolazione generale a Varese, in Italia, e uomini pre-diabetici, di 20 anni di età campionati in Israele) lo stato del biomarcatore BA circolanti come indicatori di rischio di malattie metaboliche. In collaborazione con BGU, FEM sta ora esplorando come le differenze temporali nella composizione del livello del microbiota intestinale di individui selezionati influenzino i livelli di CBA e il loro potenziale di segnalazione cellulare, come riflesso nei cambiamenti nei parametri clinici relativi alla malattia metabolica. Ci aspettiamo articoli che correlino i cambiamenti indotti dalla dieta nei BA plasmatici con la resistenza all'insulina, al colesterolo e alla pressione sanguigna.

Per merito di CABALA_diet & health, FEM ha acquisito ulteriori finanziamenti per uno studente di dottorato di ricerca per lavorare sull'analisi dei polifenoli in campioni generati dallo studio DIRECT-PLUS e anche per studiare in vitro, la composizione nutrizionale e il potenziale di modulazione del microbiota di un nuovo alimento vegetale, Mankai ® utilizzato nello studio DIRECT-PLUS. Mankai è una pianta acquatica del sud-est asiatico con una lunga storia alimentare ed è ricca di polifenoli e proteine. Ha un profilo di aminoacidi più simile al pollo rispetto ad altri alimenti vegetali. I dati FEM hanno caratterizzato oltre 50 diversi polifenoli presenti in Mankai, esplorato il loro metabolismo dal microbiota intestinale utilizzando modelli in vitro. Questo lavoro è stato presentato per la pubblicazione nel Journal of Functional Foods (dicembre 2020). Inoltre, il dottorando FEM ha anche misurato i metaboliti dei polifenoli presenti nel plasma dei partecipanti DIRECT-PLUS. Questo lavoro ha dimostrato che i polifenoli totali e i singoli acidi fenolici erano significativamente associati a una riduzione del grasso epatico e anche alla modulazione dei depositi di grasso viscerale / sottocutaneo. Questo lavoro è stato preparato per la pubblicazione, il primo articolo sul grasso epatico è stato accettato dalla rivista *Gut* nel novembre 2020, il secondo presentato al *New England Journal of Medicine*.
Inoltre, un sotto-studio del DIRECT-PLUS ha studiato l'impatto del trapianto di microbioma fecale autoctono (aFMT) sul mantenimento della perdita di peso dopo 6 mesi di intervento sullo stile di vita (**Figura 18**). FEM ha analizzato un ulteriore timepoint di campionamento al mese 14 (n = 90 per misurazioni di CBA e microbioma fecale). I principali risultati di questo sotto-studio sono stati che la dieta in stile mediterraneo verde (dieta Green Med ad alto contenuto di polifenoli

[incluso Mankai] e a basso contenuto di carne) aveva maggior potenziale di modulare il microbiota intestinale e alleviare i marcatori di malattia metabolica in questi pre-diabetici pazienti. aFMT con capsule orali al giorno per circa 100 giorni con le proprie feci raccolte nel punto di maggior perdita di peso (e modulazione del microbioma) induce un aumento di peso significativamente ridotto e un migliore mantenimento di salute metabolica. aFMT supportava una modulazione del microbioma indotta dalla dieta Green Med, sia in termini di struttura della comunità filogenetica (**Figura 19**) che di potenziale metabolico (**Figura 20**). I dati di sequenziamento shotgun per questo studio verranno utilizzati per correlare la presenza di geni metabolizzanti i BA codificati dal microbioma con i profili CBA misurati presso FEM. Questo sotto-studio è stato recentemente pubblicato su *Gastroenterology*, riconoscendo CABALA_diet & health per il loro contributo all'analisi del microbiota (doi: 10.1053 / j.gastro.2020.08.041).

5. MODELLI MATEMATICI E STATISTICI: Il Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR) ha ufficialmente confermato il suo sostegno economico all'Università dell'Insubria (USDI) nel marzo 2019. Pertanto le attività all'interno di CABALA_diet & health che dipendevano dall'USDA sono state ritardate di due anni. In particolare, USDI non ha potuto inviare i campioni di sangue dello studio RoCAV (n = 1000, popolazione di studio descritta nella **Tabella 4**) a FEM per l'analisi di BA e la quantificazione di FGF-19 né potè lavorare sui metadati associati a questo studio in ordine correlare CBA alla nutrizione e al rischio di malattie metaboliche e cardiovascolari. Nonostante questi ritardi, tutte le misurazioni degli acidi biliari plasmatici dallo studio ROCAV sono state completate da FEM e l'analisi statistica e la modellazione matematica sono in corso presso l'USDI. USDI ha ora un'estensione del progetto fino ad agosto 2021. I dati preliminari sulla modellazione dell'associazione tra CBA e varianza dietetica sono mostrati nelle **Tabelle 5** e **6**. Sono state osservate correlazioni significative tra fattori dietetici tra cui carboidrati totali, carboidrati solubili, fibra alimentare, vitamina C, acido folico e calcio con specie specifiche di acidi biliari (**Tabella 5**). Allo stesso modo, correlazioni statisticamente significative tra acidi biliari e pattern di acidi biliari, sono state trovate con FGF-19, trigliceridi, circonferenza della vita, profili lipidici e marker di insulino-resistenza (**Tabella 6**). È importante sottolineare che correlazioni simili sono state trovate nell'analisi di correlazione di base DIRECT-PLUS ed entrambe le osservazioni sono coerenti con i livelli di CBA più bassi trovati nel gruppo dieta Green Med, dopo assunzione di aFMT e con marcatori migliorati di rischio di malattia metabolica.

Come parte della strategia di mitigazione per affrontare i ritardi all'inizio del progetto, principalmente causati dal ritardo nella approvazione da parte del MIUR per il partner USDI, abbiamo incluso una nuova analisi degli studi FEM in corso per fornire dati metagenomici al fine di correlare la composizione del microbiota (profili di rRNA 16S, metagenomica a livello di ceppo e singoli enzimi metabolizzanti BA microbici) con l'uso di CBA nei campioni di soggetti sottoposti a chirurgia bariatrica (campioni di chirurgia bariatrica Roma, vedi sopra). La nostra analisi dei profili di rRNA 16S ha rilevato che diverse forme di chirurgia bariatrica (sleeve gastrectomy, RYGB, deviazione biliopancreatica con switch duodenale) inducono diversi cambiamenti nella composizione del microbiota e cambiamenti significativi nei CBA con remissione concomitante dal diabete (**Figura 21 e 22**). L'analisi di rete ha rivelato correlazioni tra i singoli taxa microbici (a livello di genere) e le specie di BA (**Figura 23**). Allo stesso modo, abbiamo monitorato la composizione del microbioma in pazienti obesi sottoposti a gastrectomia a manica, confrontando la composizione del microbioma e i profili di BA plasmatici prima dell'intervento e poi nei giorni 7, 30 e un anno dopo l'intervento (descritto sopra e nelle **Figure 5-7**). L'analisi di rete ha rivelato forti correlazioni tra i generi batterici e le singole specie di BA, tuttavia la significatività statistica è stata persa dopo la correzione multipla (Bonferroni e False Discovery Rate, FDR) **(Figure 24 e 25)**. Abbiamo eseguito network analysis dei profili di rRNA 16S (livello di genere batterico) con marcatori di malattia metabolica (**Figura 26**), concentrazioni di BA e parametri clinici, e abbiamo osservato associazioni statisticamente significative tra circonferenza della vita (Waist to Hip) e peso con acido glicocenodeossicolico (CDCA-GLC), e tempo dall'intervento con BAs terziari acido tauroursodesossicolico (T-UDCA) e acido glicoursodesossicolico solfato (GUDCA-solfato). Questi dati verranno utilizzati da UDSI e FEM per progettare modelli matematici più informativi, impiegando associazioni enerotipiche e trasformazioni BA, utilizzando i dati CABALA_diet & health studies.

FEM ha anche eseguito il sequenziamento completo full shotgun sui campioni di chirurgia bariatrica Roma per fornire la caratterizzazione del livello di ceppo del microbiota, accedere al potenziale genetico dei microbiomi, sperimentando una modulazione drammatica in risposta alla chirurgia e associata alla remissione del diabete post-chirurgia bariatrica. La FEM ha subito un ritardo nel fornire questi dati a causa delle restrizioni COVID-19 (chiusura della struttura di sequenziamento presso l'Università di Trento e conseguente rallentamento delle attività di sequenziamento). Tuttavia, tutti i dati sono stati ora recuperati e l'analisi preliminare completata. La **Tabella 7** descrive i dati metagenomici raccolti dai campioni Rom, che rappresentano un totale di 81,8 Gbp di dati, con una media di 1,7 Gbp per campione. Questa profondità è sufficiente per l'analisi a livello tassonomico di ceppo batterico, come mostrato nella **Figura 27** per il pan-genoma di *Escherichia coli* e la rappresentazione all'interno della coorte di chirurgia bariatrica Roma. L'analisi preliminare ha anche confermato la presenza relativamente rara di geni inducibili dagli acidi biliari (geni *bai*) all'interno del set di dati Roma (**Figura 28**). Al fine di valutare la coerenza di questa osservazione con i set di dati esistenti, abbiamo esaminato la profondità di copertura degli enzimi metabolizzanti BA di riferimento in grandi set di dati di metagenomica umana. Abbiamo esaminato 147 campioni disponibili al pubblico da studi disponibili al pubblico, inclusi campioni di intestino umano del progetto HMP e epidemia di *E. coli* [Loman 2013]. È stato possibile rilevare solo una bassa prevalenza di geni di riferimento degli acidi biliari NCBI solo in pochi campioni metagenomici. Il miglior risultato, relativo a un gene dell'idrolasi dei sali biliari (*bsh*), presente solo in 4 campioni di microbioma intestinale, è mostrato in **Figura 29**. Molti geni di riferimento degli acidi biliari non sono stati rilevati in alcun campione. Ciò solleva interrogativi sia sulla rilevanza dei geni riconosciuti che metabolizzano gli acidi biliari all'interno del microbioma intestinale, sia suggerisce che,

poiché le forme secondarie e terziarie di acido biliare sono ubiquitarie nei soggetti umani, la maggior parte degli enzimi che metabolizzano BA devono ancora essere identificati. Attualmente stiamo lavorando a strumenti bioinformatici per identificare putativi enzimi che metabolizzano gli acidi biliari in modo che le sequenze candidate possano essere identificate, amplificate, clonate ed espresse per collegare il fenotipo BA a enzimi precedentemente sconosciuti. In caso di successo, un tale strumento si rivelerebbe un importante output scientifico da CABALA_diet & health da mettere a disposizione della comunità scientifica.

Attività trasversali con altri progetti JPI-HDHL e attività aggiuntive:
• CABALA_diet & health ha partecipato a un incontro congiunto con il progetto HEALTHMARK, durante il loro primo incontro annuale.
• FEM e Università di Torino stanno collaborando alla caratterizzazione del microbiota fecale murino sui campioni raccolti nell'ambito del progetto JPI-HDHL SALIVAGES. Questa nuova analisi ha permesso di valutare come un'importante caratteristica del moderno stile alimentare occidentale, associato ad un aumentato rischio di malattie metaboliche, ovvero il prodotto finale della glicazione avanzata, influenzi la composizione del microbiota intestinale. Il lavoro ha portato alla pubblicazione di due articoli recenti e costituirà un importante contributo per una tesi di dottorato presso FEM (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32824970/, https: //pubmed.ncbi.nlm. nih.gov/32413585/).
• FEM ha reclutato due dottorandi attraverso fondi esterni al progetto per lavorare in collaborazione con il team CABALA_diet & health. Una studentessa (Camilla Diotallevi), iscritta alla Libera Università di Bolzano, ha condotto l'analisi metabolomica mirata sui campioni di plasma dello studio DIRECT-PLUS e caratterizzato la composizione polifenolica di Mankai, un nuovo alimento vegetale ricco di polifenoli e aminoacidi utilizzato nello studio DIRECT-PLUS. La studentessa ha esaminato anche l'impatto dell'assunzione di Mankai sulla composizione del microbiota intestinale umano utilizzando un modello di fermentazione in vitro ed ha esplorato l'utilità di identificare il DNA dei cloroplasti nelle feci come potenziale marker per l'assunzione di cibi vegetali interi.
• FEM ha reclutato una seconda studentessa di dottorato (Giulia Gaudioso), iscritta all'Università di Trento, nell'ambito del progetto EUREGIO-EFH (http://euregio-efh.eu/). Questo studente, il cui dottorato è focalizzato sulla dieta: interazione dei microrganismi nell'obesità, ha analizzato campioni fecali dallo studio SALIVAGES.

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)
Osservazioni alla relazione tecnico-scientifica

Obiettivi, benefici e criticità del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO				
Descrizione degli obiettivi del progetto				
Obiettivi generali	**Obiettivi specifici**	**Linee di attività in WP**	**Risultati attesi**	**Risultati raggiunti** *(Se il risultato atteso non è stato raggiunto specificare la motivazione nel campo note)*
Misurazione di profili di circolanti acidi biliari (CBA) nel sangue	1. Correlare i profili CBA con parametri di malattie metaboliche legate alla dieta e di salute in popolazioni a rischio.	WP 1: Misura del profilo dei BA circolanti plasmatici. (WP leader: Urska Vrhovsek; partners coinvolti FEM e UCC)	Del. 1.1: Controllo di qualità fra centri (LC-MS CBA) Responsabile FEM; mese 3.	Deliverable, Del. 1.1, completato. Articolo presentato per la pubblicazione. Ulaszewska, M.M., Mancini, A. , Garcia-Aloy, M., Del Bubba, M., Tuohy, K.M., Vrhovsek, U. (2019). Isotopic dilution method for bile acid profiling reveals new sulfate glycine-conjugated conjugated glyco-dihydroxy bile acids and glucuronide bile acids in serum. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31100508/).
			Del. 1.2: Raccolta di dati di CBA da RCT esistenti – AVAG (UoR, FEM), MioCuore (FEM) e PreBioOil (FEM) studi di intervento sulla dieta già condotti presso FEM. Responsabile FEM; Mese 3.	Deliverable Del. 1.2, completato. Analisi dei BA, analisi del microbiota tramite 16S rRNA e dati sulla composizione della dieta raccolti per gli studi AVAG, PreBiOil e MioCuore (Aleurone) completati.
			Del. 1.3: quantificazione CBA per coorte RoCAV. Responsabile FEM; mese 12.	Deliverable FEM Del 1.3 completato e dati consegnati al partner USDI. Analisi statistica, modellazione matematica e preparazione articoli in corso (UDSI + FEM).

		WP2: Analisi statistica e costruzione degli algoritmi (responsabile del WP: Francesco Gianfagna, partner coinvolti: USDI, FEM, UoR, BGU).WP n.	Del. 1.4: Quantificazione di CBA per lo studio "Polyphenol basket" (ora DIRECT-PLUS) Responsabile FEM; Mese 30. Del. 1.5: Quantificazione di CBA per campioni CBA-FaP (now called UoR CABALA_diet&health study). Responsabile FEM; Mese 35 Del. 2.1: Selezione/trasferimento di 1000 campioni del RoCAV. Responsabile: USDI; Mese 1. Del. 2.2: Valutazione della qualità dei dati relativi alle nuove misurazioni effettuate: CBA, glucosio, FGF-19. Responsabile USDI; mese 16.	Deliverable FEM Del 1.4 completato e dati consegnati al partner USDI. Analisi statistica, modellazione matematica e preparazione articoli in corso (UDSI + FEM). Deliverable FEM Del 1.5 completato e dati consegnati ai partner UoR e UCC. Analisi statistica, modellazione matematica e preparazione articoli in corso (UoR + FEM + UCC). Deliverable Del 2.1 campioni RoCAV completati consegnati a FEM dal partner USDI. Deliverable Del 2.2 completato. Controllo di qualità dei nuovi dati CBA, glucosio e FGF-19 per lo studio RoCAV completato da USDI.
	2. Correlare i profili di CBA con pattern alimentari individuali e consumo di cibo	WP2: Analisi statistica e costruzione degli algoritmi (responsabile del WP: Francesco Gianfagna, partner coinvolti: USDI, FEM, UoR, BGU).	Del. 2.3: Risultati delle associazioni tra CBA e dieta e attività fisica. Responsabile USDI; Mese 18	Deliverable Del 2.3 completato. Associazioni tra CBA e attività fisica valutate da USDI - nessuna associazione nel set di dati.
Correlare i profili di CBA con pattern	3. Determinare la modulazione specifica dei profili CBA associati a	WP2: Analisi statistica e costruzione degli algoritmi	Del. 2.4: Risultati delle associazioni tra CBA e salute metabolica.	Deliverable Del 2.4 completato completato. Completate Determination of associazioni tra CBA e marker di malattia metabolica per studio RoCAV sono state

alimentari individuali e consumo di cibo	un migliorato stato di salute	(responsabile del WP: Francesco Gianfagna, partner coinvolti: USDI, FEM, UoR, BGU). WP 3: CBA cell signalling.	Responsabile USDI; mese 18 Del. 3.1: Three robust cell models for the measurement of the effects of BA signaturesupon host signalling pathways. Responsabile UCC; mese 18 Del.3.2: Data relating BA signatures to host signalling events in robust model systems. Questo deliverable è in tempo. Responsabile UCC; mese 30 Del. 3.3: Data relating actual Patient CBA signatures to cell signalling events in model systems. Responsabile UCC; mese 36	completate e sono in corso analisi CABALA_diet & health e studi DIRECT-PLUS. L'importante contributo di FEM è stato completato con il trasferimento dei dati CBA ad altri partner. Questo risultato (Del. 3.1) è stato completato (UCC). Questo (Del. 3.2) deliverable è quasi completato e in linea con le nuove tempistiche previste (UCC) Questo (Del. 3.3, cell signalling) deliverable è quasi completato e in linea con le nuove tempistiche previste (UCC)
	4. Correlare i profili CBA con profili di batteri intestinali ed i loro potenziali enzimatici per modulare la circolazione enteroepatic	WP4: Correlation of CBA profiles with gut microbiota 16S rRNA profiles, metagenomic metabolic potential and strain level metagenomics.	Del. 4.1: 16S rRNA profiling of faecal microbiota from existing RCT studies. Responsabile FEM; mese 1 Del. 4.3: Coinertia analysis of 16S rRNA profiles and CBA: Responsabile FEM; mese 20.	Questo deliverable, Del. 4.1, è stato completato. Il profilo del microbiota intestinale per gli studi AVAG, PreBioOil e MioCoure/Aleurone è stata completata. Analisi delle correlazioni dei profili di rRNA 16S e BA del plasma completate. Per AVAG, i campioni di acqua fecali sono stati inviati a UCC per le misurazioni di BA fecali (analisi completata da UCC). Una pubblicazione congiunta con FEM, UoR e UCC sui risultati delle correlazioni tra composizione del microbiota intestinale e BA è in preparazione per metà 2021. Questo deliverable è stato completato. L'analisi Coinertia e l'analisi della rete sono state condotte su campioni fecali provenienti dagli studi AVAG, PreBiOil e MioCoure/Aleurone. Sono state identificate le correlazioni tra i profili di rRNA batterico 16S e gli acidi biliari del plasma. Questi rapporti verranno confermati utilizzando analisi del 16S rRNA e i BA plasmatici da campioni dello studio DIRECT-PLUS. Ulteriori campioni

				di soggetti sottoposti a chirurgia bariatrica sono stati inclusi come strategia correttiva per il ritardo nella consegna dei campioni derivati dallo studio RoCAV da parte dell'Università dell'Insubria. L'analisi delle correlazioni degli acidi biliari plasmatici e della composizione del microbiota fecale modulato da diverse tipologie di chirurgia bariatrica e da pazienti sottoposti a gastrectomia è stata completata.
			Del. 4.4: Deep (1-3 Gb) shot-gun metagenomic sequencing.	Del. 4.4: L'obiettivo di Del. 4.4 era correlare i profili degli acidi biliari plasmatici noti per il rischio di malattie metaboliche con i batteri fecali, anche a livello di ceppo. A causa del ritardo nell'accesso ai campioni di sangue RoCAV presso l'Università dell'Insubria, gli acidi biliari plasmatici correlati ai marker di malattia metabolica non sono stati forniti fino al terzo anno. Come strategia di mitigazione, abbiamo analizzato campioni fecali (16S rRNA e sequenziamento del fucile a pompa) da pazienti prima e dopo diverse forme di chirurgia bariatrica. Questi pazienti hanno perso peso corporeo e il loro diabete è stato curato chirurgicamente a 12 mesi. I cambiamenti nei profili BA e nel microbiota fecale sono stati correlati con la remissione del diabete nei pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica post-chirurgica. È stata completata l'analisi degli acidi biliari e del microbiota intestinale mediante sequenziamento dell'rRNA 16S. Il sequenziamento con pistola di 48 campioni fecali è stato completato ed è stata completata l'analisi bioinformatica iniziale, inclusa l'analisi del livello di ceppo. Inoltre, i dati di sequenziamento del fucile a pompa generati dal collaboratore di CABALA_diet & Health BGU da campioni fecali DIRECT-PLUS verranno utilizzati per correlare la presenza di geni metabolizzatori del microbiota BA con i profili CBA. Pertanto i dati per completare questo risultato sono stati raccolti e l'analisi dei dati è in corso presso FEM e BGU.
			Del. 4.5: Microbiota profiles to the strain level and with respect to specific BA metabolizing genes (e.g. specific SNPs or species of bile salt hydrolases).	Del. 4.5: Sono stati completati i dati di sequenziamento con “shotgun” a pallini da pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica (come strategia di mitigazione a causa del ritardo nei campioni RoCAV) e campioni fecali DIRECT-PLUS. L'analisi preliminare a livello di ceppo e lo screening per i geni che metabolizzano gli acidi biliari sono stati completati e ulteriori analisi sono in corso (FEM). Il deliverable, Del. 4.5, è

				parzialmente completato ma in linea per essere completato entro la fine di CABALA_diet&health.
Correlazione CBA con la dieta	5. Misurare come specifiche classi di componenti bioattivi dei cibi comunemente trovati in diete associate a basso rischio di malattie metaboliche abbiano effetto sia sui CBA a diguino, e sia su come i CBA post-prandiali rispondono a pasti test standardizzati.	WP5: CBA_Fasting and Postprandial [CBA_FaP] study (now called UoR CABALA_deit& health study)	Del. 5.1: Ethics and Good Clinical Practice training etc. Responsabile UoR; mese 4. Del. 5.2: Screening, recruitment and running cohort 1 study (visits 1, 4 and 8 weeks). Responsabile UoR; mese 14. Deliverable 5.3: Screening, recruitment and running cohort 2 (visits 1, 4, 8 weeks). Responsabile UoR; mese 27. Deliverable 5.4: Sample analysis. Responsabile UoR; mese 33. Deliverable 5.5: Data collation, statistical analysis and report writing. Responsabile UoR; mese 36.	Questo risultato (Del. 5.1) è stato completato. Questo risultato (Del. 5.2) è stato completato. Il deliverable, Del. 5.3, è stato completato. Il deliverable, Del. 5.4, è stato parzialmente completato. La generazione dei dati da parte di FEM e UCC è completa, la maggior parte dei dati da UoR è stata raccolta. Previsto completamento del deliverable marzo 2021. Il deliverable, Del. 5.4, è stato parzialmente completato. Previsto completamento del deliverable aprilo 2021.
	6. Misurare se i profili di CBA riflettono uno stato di salute migliorato e/o ridoto rischio di malattie metaboliche conseguenti un intervento sulla dieta curativo a lungo termine (18 mesi) e aumentato esercizio fisico.	WP4: Correlation of CBA profiles with gut microbiota 16S rRNA profiles, metagenomic metabolic potential and strain level metagenomics. WP2: Analisi statistica e costruzione degli algoritmi (responsabile del WP: Francesco Gianfagna,	Del. 4.2: 16S rRNA profiling dei campioni fecali dello studio BGU Polyphenol Basket (now DIRECT-PLUS). Responsabile FEM; mese 30. Del. 2.5: Algoritmi CABALA_DIET&HEALTH per il calcolo del rischio di syndrome metabolica e stato di salute cardiovascolare ideale. Responsabile USDI; mese 30.	Il deliverable, Del. 4.2, è stato completato. Il deliverable, Del. 2.5 è parzialmente completato. Il contributo FEM per la raccolta dei dati e la modellazione preliminare (analisi di rete, proposta di nuove analisi dei minimi quadrati parziali di rete) è stato completato. La collaborazione con il partner USDI è in corso e la data di consegna nell'ambito

		partner coinvolti: USDI, FEM, UoR, BGU).	Deliverable 2.6: Validazione degli algoritmi CABALA_DIET&HEALTH utilizzando I dataset di tutti gli altri studi disponibili. Responsabile USDI; Mese 35 Deliverable 2.7: Systematic review dei dati relative a tutti I dati ottenuti nel progetto. Responsabili: tutti i partner, mese 36.	della nuova estensione del progetto assegnata USDI. Il deliverable, Del. 5.2 è parzialmente completato. Il contributo FEM per la raccolta dei dati e la modellazione preliminare (analisi di rete, proposta di nuove analisi dei minimi quadrati parziali di rete) è stato completato. La collaborazione con tutti gli altri partner è in corso e la consegna è prevista all'interno delle estensioni concesse consentite da JPI-HDHL. Il Deliverable 2.7 è in corso (una serie di recensioni già pubblicate o in corso di stampa che forniranno supporto per la stesura della revisione sistematica). La stesura della revisione sistematica attende il completamento dell'analisi statistica su tutti gli studi CABALA_diet e sulla salute.
Coordinamento	Coordinazione del progetto, gestione della comunicazione, diffusione dei risultati e sito web	WP6 FEM (Tuohy, Kieran)	Del. 6.1: Conferenze Skype ogni 6 mesi. Responsabile FEM, 0-36. Del. 6.2: Incontri con i partner Responsabile FEM, mesi 1, 18 e 36. Del 6.3 CABALA_Diet&Health website. Responsabile FEM, mese 1.	Del. 6.1: Una regolare comunicazione tra i partner è stata mantenuta tramite conversazioni skype, telefoniche ed e-mail. Deliverable 6.2: Gli incontri faccia a faccia che hanno coinvolto tutti i partner si sono tenuti all'inizio (Londra, Regno Unito) e nelle fasi intermedie (FEM, Italia) del progetto. Un incontro finale è previsto per il mese 36 ospitato da UCC, l'Irlanda è stata annullata a causa di COVID-19 e si è tenuta online invece. Tutti i partner hanno partecipato. Un evento di disseminazione finale è stato organizzato immediatamente dopo il completamento finale del progetto. Il progetto CABALa_diet & health sarà presentato in una sessione speciale con i relatori di tutti i partner all'11 ° congresso Probiotics, Prebiotics & New Foods Roma, 11-14 settembre 2021. Del 6.3: Questo deliverable è stato completato (https://eventi.fmach.it/CABALA).
Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati	Diffusione dei risultati del progetto, pubblicazioni scientifiche, l'identificazione e la tutela della	WP7 FEM (Tuohy, Kieran)	Del. 7.1: Diffusione dei risultati del progetto a congressi internazionali. Responsabile , tutti partner, mesi 12-36.	Del 7.1: Questo risultato è in corso. Elenco di articoli, poster e delle attività di divulgazione tramite comunicazioni orali a congressi attualmente condotte è fornito in seguito.

	proprietà intellettuale, la comunicazione esterna.		Del 7.2: Pubblicazioni scientifiche. Responsabile , tutti partner, mesi 0-36. Del. 7.3: Identificazione e strategia di protezione per qualsiasi nuova proprietà intellettuale, Responsabile FEM, mese 36.	Questo risultato, Del. 7.2, è in corso. Elenco di articoli, poster e delle attività di divulgazione è fornito di seguito. Questo risultato, Del. 7.3, è in corso.

Diffusione dei risultati del progetto a congressi internazionali.

1. Kieran Tuohy "Microbiota and fat tissue distribution". Diabesità. Pisa, Italy, 2017
2. Kieran Tuohy "Probiotic reverse engineering – choose your mechanism first then your strain". 4th Microbiome R&D and Business Collaboration Forum: Europe and Probiotics Congress: Europe. Amsterdam, 2017.
3. Kieran Tuohy, "The gut microbiota and human health - a molecular cross-talk". European Medical Association Annual Conference, London 2017
4. Kieran Tuohy, "The gut microbiota and human health - a molecular cross-talk". European Medical Association Annual Conference, London 2017Video https://www.youtube.com/watch?v=hTVQTYRqH70
5. Kieran Tuohy, "Microbiome Modulation for Improved Metabolic Health." ILSI-Taiwan Annual meeting & Scientific Symposium, Taipei, 2018
6. Kieran Tuohy "ILSI Europe activities related to 'Human Microbiome & Health". ILSI-Europe annual Meeting, Brussels, 2017
7. Kieran Tuohy "Gut microbiota composition, bile acid signalling and human health: CABALA_Diet&Health". 9th Probiotics, Prebiotics, New Foods conference, Rome, Italy, 2017
8. Kieran Tuohy, "Microbiota-diet interactions in neurodegeneration, and in Parkinson's disease". The selection and management of advanced therapies in the Parkinson's disease in specialist centers (National Medical Conference on Parkinsons), Rovereto, Italy, 2018
9. Kieran Tuohy ILSI Europe Functional Foods Task force meeting, May 2018. 'Microbiome Modulation for Improved Metabolic Health'. Brussels, 2018
10. Kieran Tuohy, FOOD2030, Plovdov. Side event 6: Food in Regions – one health, from regionality to functionality, Date 13th June 2018 (14:00 – 18:00), Type of event: Open to the public. Venue: Sankt Petersburg Hotel, Plovdiv (BG)
11. Kieran Tuohy, ILSI Europe Symposium on 'Nutrition for the Ageing Brain: Moving Towards Clinical Applications', Madrid, Spain. 30/08/2018 – 31/08/2018 "Microbiome and ageing – dietary microbiome modulation for improved mental and physical quality of life in old age."
12. Kieran Tuohy, Dr Schar (https://www.drschaer.com/), presentation including CABALA_diet&health, July 19th 2018, Trieste.
13. Kieran Tuohy, "The Gut Microbiota in health and disease - role of diet", Ferraro and Ferraro MSc in Food and Human Nutrition, University of Turin, January 18th 2019.
14. Kieran Tuohy "Fondazione Edmund Mach, Trentino and mountain foods for health and sustainability", Food2030 Side event 6: Food in Regions – one health, from regionality to functionality, Date 13th June 2018 (14:00 – 18:00), Sankt Petersburg Hotel, Plovdiv, Bulgaria.
15. Kieran Tuohy "Host:microbe cross talk in metabolic disease and healthy ageing – potential for dietary manipulation." METAORGANISMS, MICROBIAL BIOREFINERIES AND HUMAN HEALTH,

Fondazione Golinelli – Bologna, 18-19 giugno 2018. Consorzio Interuniversitario delle Biotecnologie CIB (http://www.cibiotech.it/).

16. Kieran Tuohy, "Microbiome variants in relation to bioavailability of plant food bioactives", Final Conference of the Horizon2020 COST Action FA1403 POSITIVe, 25th and 26th of September 2018, Lisbon, Portugal.

17. Kieran Tuohy, "Diet:Microbe interactions in the gut for improved health – talking molecules", Microbiome R&D and Business Collaboration Forum: Europe, 20th to 22nd May, 2019.

18. Kieran Tuohy, "Diet:Microbe interactions in the gut– talking molecules", Free University of Bolzano, From Bread, Cheese and Wine Sciences to Processing and Tasting, Free University of Bozen-Bolzano Room A2.2.32 at NOI Techpark 18 — 19 June 2019

19. Kieran Tuohy, "SY03-4: Modulating gut microbial bile acid metabolism with polyphenol rich foods for improved health", The 9th International Conference on Polyphenols and Health, Kobe, Japan, 29th November 2019.

20. Kieran Tuohy, "Influence of phytonutrients on the gut microbiome", American Society for Nutrition annual conference, Pepsico sponsored satellite event entitled, *Plant-based foods and a healthy microbiome*, June 2nd 2020, online.

21. Andrea Mancini, A. Speaker su invito: "CirculAting Bile Acids as biomarkers of metabolic health - Linking microbiotA, Diet and Health", Annual Congress on Nutrition & Healthcare, Paris, France, October 18-20, 2018.

22. Francesca Fava. Speaker su invito convegno "The Nutrition Society, IRISH SECTION CONFERENCE 2018:TARGETED APPROACHES TO TACKLING CURRENT NUTRITIONAL ISSUES, intitolata "Gut microbiota and health: connecting actors across the metabolic system" – Ulster 21 giugno 2018.

23. Fava, F. Speaker su invito, al convegno 16th International Conference on Nutrition and Health intitolata ""Apples and cardiovascular health-Is the gut microbiota a core consideration?" - November 22-23, 2018 Paris.

Pubblicazioni scientifiche.

1. Duc H. Le (2017) 4th Microbiome R&D and Business Collaboration Forum, and Probiotics Congress, April 3–4, 2017, Amsterdam, The Netherlands. EBioMedicine. 2017 May; 19: 2–3. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.04.019 (description of CABALA_diet&health from poster presented at conference)
2. SL Long, R Prete ,SA Joyce*, A Corsetti Genotypic and phenotypic characterization of food-associated Lactobacillus plantarum isolates for potential probiotic activities. FEMS Microbiology Letters, 2020 doi.org/10.1093/femsle/fnaa076
3. Geng, W., Long, S.L., Chang, Y., Joyce, S.A.* & J.Lin*. Evaluation of bile salt hydrolase inhibitor efficacy for modulating host bile profile and physiology using a chicken model system. Sci Rep 10, 4941 (2020). doi.org/10.1038/s41598-020-61723-7
4. Prete, R., Long, S.L., Gallardo, A.L., Corsetti A., Joyce S.A*. Beneficial bile acid metabolism from Lactobacillus plantarum of food origin. Sci Rep 10, 1165 (2020). https://doi.org/10.1038/s41598-020-58069-5
5. Benjamin H Mullish, … Susan A Joyce, …., Elaine Holmes, Thomas B Clarke, Mark R Thursz, Julian R Marchesi. Microbial bile salt hydrolases mediate the efficacy of faecal microbiota transplant in the treatment of recurrent Clostridioides difficile infection Gut 2019;68:1791-1800. doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317842
6. Lasalvia P, Gianfagna F, Veronesi G, Franchin M, Tozzi M, Castelli P, Grandi AM, Zambon A, Iacoviello L, Ferrario MM. Identification of dietary patterns in a general population of North Italian adults and their association with arterial stiffness. The RoCAV study. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2020 Aug 11:S0939-4753(20)30337-9. doi: 10.1016/j.numecd.2020.08.001. Epub ahead of print. PMID: 32981800.

7. R.A.G. Pushpass, S. Alzoufairi, K.G. Jackson, J.A. Lovegrove. Circulating bile acids as a link between the gut microbiota and cardiovascular health: Impact of Prebiotics, probiotics and polyphenol-rich foods. Nutrition Research Reviews (under revision).
8. Rinott E, …., Scholz, M, Tuohy K, Fava F, …Hu FB, Stampfer MJ, Shai I. (2020) The effect of diet-modulated autologous fecal microbiota transplantation on weight loss regain A Randomized Clinical Trial. Gastroenterology, doi.org/10.1053/j.gastro.2020.08.041
9. Ulaszewska MM, Koutsos A, Trošt K, Stanstrup J, Garcia-Aloy M, Scholz M, Fava F, Natella F, Scaccini C, Vrhovsek U, Tuohy K, Lovegrove J, Mattivi F. (2020) Two apples a day modulate human:microbiome co-metabolic processing of polyphenols, tyrosine and tryptophan. Eur J Nutr. Feb 26.
10. Koutsos A, Riccadonna S, Ulaszewska MM, Franceschi P, Trošt K, Galvin A, Braune T, Fava F, Perenzoni D, Mattivi F, Tuohy KM, Lovegrove JA. (2020) Two apples a day lower serum cholesterol and improve cardiometabolic biomarkers in mildly hypercholesterolemic adults: a randomized, controlled, crossover trial. Am J Clin Nutr. Feb 1;111(2):307-318.
11. Ulaszewska MM*, Mancini A, Garcia-Aloy M, Del Bubba M, Tuohy KM, Vrhovsek U. (2019) Isotopic dilution method for bile acid profiling reveals new sulfate glycine-conjugated dihydroxy bile acids and glucuronide bile acids in serum. J Pharm Biomed Anal. Sep 5;173:1-17.
12. Meir, AY, Rinott, E, …….., Tuohy, K, Diotallevi, C, Vrhovsek, U, Hu FB, Stampfer, MJ, Shai RD, I. The effect of green Mediterranean diet on intrahepatic fat; A randomized controlled trial (2020) GUT (in press).
13. Diotallevia C, Fava F, Gobbetti M, Tuohy K * .(2020) Healthy dietary patterns to reduce obesity related metabolic disease –polyphenol:microbiome interactions unifying health effects across geography. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 23(6):437-444.
14. Mastrocola, R, Collotta, D, Gaudioso, G, Le Berre, M, Cento, AS, Ferreira, GA, Chiazza, F, Verta, R, Bertocchi, I, Manig, F, Hellwig, M, Fava, F, Cifani, C, Aragno, M, Henle, T, Joshi, L, Tuohy, K, Collino, M (2020) Effects of exogenous dietary advanced glycation end products on the cross-talk mechanisms linking microbiota to metabolic inflammation. Nutrients 2020, 12(9), 2497; https://doi.org/10.3390/nu12092497 (SALIVAGES)
15. Collotta D, Hull W, Mastrocola R, Chiazza F, Cento AS, Murphy C, Verta R, Alves GF, Gaudioso G, Fava F, Yaqoob M, Aragno M, Tuohy K, Thiemermann C, Collino M. (2020) Baricitinib counteracts metaflammation, thus protecting against diet-induced metabolic abnormalities in mice. Mol Metab. May 13;39:101009. (SALIVAGES)
16. Fava F*, Rizzetto L, Tuohy KM. (2018) Gut microbiota and health: connecting actors across the metabolic system. Proc Nutr Soc. 2018 Dec 18:1-12.
17. Rizzetto L*, Fava F, Tuohy KM, Selmi C. (2018) Connecting the immune system, systemic chronic inflammation and the gut microbiome: The role of sex. J Autoimmun. 2018 Aug;92:12-34

NOTE

La maggior parte dei risultati sono stati raggiunti e i risultati eccezionali saranno consegnati dai partner responsabili entro le nuove scadenze concordate con JPI-HDHL.

In particolare;

Deliverable Del 2.4 parzialmente completato. Completate Determination of associazioni tra CBA e marker di malattia metabolica per studio RoCAV sono state completate e sono in corso analisi CABALA_diet & health e studi DIRECT-PLUS. L'importante contributo di FEM è stato completato con il trasferimento dei dati CBA ad altri partner.

Del. 3.3: Questo (Del. 3.3, cell signalling) deliverable è quasi completato e in linea con le nuove tempistiche previste (UCC)

Del. 4.4: L'obiettivo di Del. 4.4 era correlare i profili degli acidi biliari plasmatici noti per il rischio di malattie metaboliche con i batteri fecali, anche a livello di ceppo. A causa del ritardo nell'accesso ai campioni di sangue RoCAV presso l'Università dell'Insubria, gli acidi biliari plasmatici correlati ai marker di malattia metabolica non sono stati forniti fino al terzo anno. Come strategia di mitigazione, abbiamo analizzato campioni fecali (16S rRNA e sequenziamento del fucile a pompa) da pazienti prima e dopo diverse forme di chirurgia bariatrica. Questi pazienti hanno perso peso corporeo e il loro diabete è stato curato chirurgicamente a 12 mesi. I cambiamenti nei profili BA e nel microbiota fecale sono stati correlati con la remissione del diabete nei pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica post-chirurgica. È stata completata l'analisi degli acidi biliari e del microbiota intestinale mediante sequenziamento dell'rRNA 16S. Il sequenziamento con "shotgun" di 48 campioni fecali è stato completato

ed è stata completata l'analisi bioinformatica iniziale, inclusa l'analisi del livello di ceppo. Inoltre, i dati di sequenziamento del fucile a pompa generati dal collaboratore di CABALA_diet & Health BGU da campioni fecali DIRECT-PLUS verranno utilizzati per correlare la presenza di geni metabolizzatori del microbiota BA con i profili CBA. Pertanto i dati per completare questo risultato sono stati raccolti e l'analisi dei dati è in corso presso FEM e BGU.

Del. 4.5: Sono stati completati i dati di sequenziamento "shotgun" da pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica (come strategia di mitigazione a causa del ritardo nei campioni RoCAV) e campioni fecali DIRECT-PLUS. L'analisi preliminare a livello di ceppo e lo screening per i geni che metabolizzano gli acidi biliari sono stati completati e ulteriori analisi sono in corso (FEM). Il deliverable, Del. 4.5, è parzialmente completato ma in linea per essere completato entro la fine di CABALA_diet&health.

Del. 2.5: Algoritmi CABALA_DIET&HEALTH per il calcolo del rischio di syndrome metabolica e stato di salute cardiovascolare ideale. Responsabile USDI; mese 30.

Il deliverable, Del. 2.5 è parzialmente completato. Il contributo FEM per la raccolta dei dati e la modellazione preliminare (analisi di rete, proposta di nuove analisi dei minimi quadrati parziali di rete, "PLS-network analysis") è stato completato. La collaborazione con il partner USDI è in corso e la data di consegna nell'ambito della nuova estensione del progetto assegnata USDI.

Deliverable 2.6: Validazione degli algoritmi CABALA_DIET&HEALTH utilizzando I dataset di tutti gli altri studi disponibili. Responsabile USDI; Mese 35

Il deliverable, Del. 5.2 è parzialmente completato. Il contributo FEM per la raccolta dei dati e la modellazione preliminare (analisi di rete, proposta di nuove analisi dei minimi quadrati parziali di rete, PSL-network) è stato completato. La collaborazione con tutti gli altri partner è in corso e la consegna è prevista all'interno delle estensioni concesse consentite da JPI-HDHL.

Deliverable 2.7: Systematic review dei dati relative a tutti I dati ottenuti nel progetto. Responsabili: tutti i partner, mese 36.

Il Deliverable 2.7 è in corso (una serie di recensioni già pubblicate o in corso di stampa che forniranno supporto per la stesura della revisione sistematica). La stesura della revisione sistematica attende il completamento dell'analisi statistica su tutti gli studi CABALA_diet&health..

Del. 6.2: Incontri con i partner Responsabile FEM, mesi 1, 18 e 36.

Deliverable 6.2: Gli incontri faccia a faccia che hanno coinvolto tutti i partner si sono tenuti all'inizio (Londra, Regno Unito) e nelle fasi intermedie (FEM, Italia) del progetto. Un incontro finale è previsto per il mese 36 ospitato da UCC, l'Irlanda è stata annullata a causa di COVID-19 e si è tenuta online invece. Tutti i partner hanno partecipato. Un evento di disseminazione finale sarà organizzato immediatamente dopo il completamento finale del progetto. Il progetto CABALA_diet & health sarà presentato in una sessione speciale con i relatori di tutti i partner all'11 ° congresso Probiotics, Prebiotics & New Foods Roma, 11-14 settembre 2021.

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Osservazioni al raggiungimento degli obiettivi del progetto

Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto

Descrivere gli ostacoli occorsi durante la realizzazione delle attività del progetto indicando la linea di attività interessata, l'Unità operativa coinvolta e le azioni che sono state attivate al fine di rimuovere gli ostacoli che impedivano la realizzazione degli obiettivi.

Numero WP	Unità operative coinvolte	Ostacolo	Azioni correttive

WP2	UDSI (FEM)	MIUR non ha confermato il support finanziario al partner USDI fino a Marzo 2019 (Deliverables 2.1-2.6). Progressi ulteriormente interrotti da COVID-19.	UDSI ha modificato la sua strategia di assunzione e ora assume 2 biostatistici e un biologo (per aiutare con le analisi dei CBA in FEM) e ha ricevuto una proroga dalla loro agenzia di finanziamento MIUR fino a maggio 2021. FEM ha completato la sua analisi di CBA e ha fornito il dati a USDI. USDI sta proseguendo l'analisi dei dati e dovrebbe concludere tutte le attività entro maggio 2021.
WP4	UDSI and FEM	Del. 4.4: Sequenziamento metagenomico a colpi di fucile profondo (1-3 Gb). Il sequenziamento della "shotgun" è stato ritardato a causa della mancanza di criteri di selezione del campione basati sulla correlazione tra CBA e parametri clinici del rischio di malattia metabolica. La consegna del sequenziamento è stata ulteriormente ritardata dalle misure di blocco del COVID-19.	Abbiamo incluso nuove analisi su studi FEM in corso per fornire dati metagenomici al fine di correlare la composizione del microbiota a livello di ceppo batterico e i loro geni legati al metabolismo BA con CBA utilizzando campioni di soggetti sottoposti a chirurgia bariatrica. La nostra analisi dell'rRNA 16S ha rilevato che diverse forme di chirurgia bariatrica (gastrectomia verticale parziale, RYGB, deviazione biliopancreatica con switch duodenale) inducono diversi cambiamenti nella composizione del microbiota e cambiamenti significativi nell'ACB con remissione parallela dal diabete. Il microbiota intestinale dei pazienti sottoposti a gastrectomia verticale parziale aumenta nella diversità 12 mesi dopo l'intervento. I campioni fecali pre e post-bariatrici sono stati ora sequenziati per l'analisi metagenomica e l'analisi dei dati preliminari include la caratterizzazione a livello di ceppo e lo screening per gli enzimi che metabolizzano gli acidi biliari e ulteriori analisi sono in corso al FEM. Questa analisi aggiuntiva ci consentirà di correlare gli CBA con i ceppi batterici nel microbiota intestinale e di monitorare come la modulazione del microbiota intestinale durante i 12 mesi successivi alla chirurgia bariatrica influisce sugli acidi biliari circolanti. Parallelamente, i dati dei pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica e quelli dello studio RoCAV ci aiuteranno a selezionare campioni fecali di particolare interesse per correlare la composizione del microbiota a livello di ceppo batterico con nutrizione e marker di sindromi metaboliche e rischio cardiovascolare. Questo deliverable sarà completato entro maggio 2021.

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)
Osservazioni alle azioni correttive messe in atto

Timbro dell'Ente proponente il progetto *Firma leggibile del Coordinatore del progetto*

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)
Valutazione complessiva del progetto

Luogo e Data

Firma leggibile dell'Esperto (qualora designato)