

Relazione di progetto finale

Valerolactones and healthy Ageing: Linking Dietary factors, nutrient biomarkers, metabolic status and inflammation with cognition in older adults

ACRONIMO	DEL	PROGE	TTO:
,	/ΔΙΙ	D	

______ Parma, 20 Giugno 2020



Indice

1.	Progetto	3
2.	Descrizione del progetto	5
3.	Relazione finale del progetto	7
4.	Obiettivi, benefici e criticità del progetto	12
5	Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto	14



1. Progetto				
Dati generali				
Titolo del progetto	Valerolactones and healthy Ageing: Linking Dietary factors, nutrient metabolic status and inflammation with cognition in older adults	biomarkers,		
Acronimo del progetto	VALID			
Area strategica di intervento¹	AREA 6			
Linea di attività ²	LINEA 4D			
Settore produttivo ³	SETTORE E			
Tipo di progetto	■ Bando □ Affidamento diretto □	Sportello		
Riferimento del Bando/Affidamento diretto/Sportello	AZIONE ERA-HDHL - BANDO ERA-NET COFUND FEBBRAIO 2016			
Durata del progetto	24			
Costo ammesso	€ 115.330,00			
Contributo concesso	€ 114.176,70			
Importo rendicontato				
		Natura giuridica		
Soggetto proponente il progetto	UNIVERSITÀ DI PARMA	■ Pubblico □ Privato		
Rappresentante legale	ANDREI PAOLO – NDRPLA62R10G337G			
Coordinatore del progetto	DEL RIO DANIELE - DLRDNL76H22H223Y			
Numero di Unità Operative	1			
ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE				
		Natura giuridica		
Unità Operativa n. 1 - Denominazione	UNIVERSITÀ DI PARMA	■ Pubblico		
		☐ Privato Natura giuridica		
Unità Operativa n. 2 -	0 – ZERO	□ Pubblico		
Denominazione		☐ Privato		



Numero di partner esterni al progetto	0 - ZERO	
	ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE	
		Natura giuridica
Partner n. 1 - Denominazione		□ Pubblico
		☐ Privato
		Natura giuridica
Partner n. 2 - Denominazione		☐ Pubblico
Benominazione		☐ 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.



2. Descrizione del progetto

Sintesi del progetto

Il principale obiettivo di questa call è l'identificazione e la validazione di biomarker modulabili dalla dieta e che possano predire un cambiamento nello stato di salute e/o di rischio di sviluppare una patologia che sia influenzata dall'alimentazione del soggetto stesso.

Gli obiettivi del progetto VALID sono: i) validare l'utilizzo di γ-valerolattoni plasmatici come indicatori di consumo di alimenti ricchi in catechine e procianidine; ii) valutare l'associazione tra i livelli di γ-valerolattoni circolanti e i livelli di alcuni marker di infiammazione e metabolismo di una coorte europea di soggetti anziani; iii) valutare l'associazione tra i livelli di γ-valerolattoni circolanti e il declino delle funzioni cognitive di una coorte europea di soggetti anziani.

Per attuare questo progetto, verranno utilizzati dati e campioni di una coorte di 5.186 soggetti di età compresa tra 60 e 102 anni reclutati in Irlanda. La quasi totalità dei campioni e dei dati sono conservati presso il Trinity Ulster college di Dublino, Dipartimento di Agricoltura (TUDA) e riguardano i dati relativi allo stato nutrizionale, infiammatorio e cognitivo dei soggetti. La restante parte dei campioni è in corso di raccolta e verrà terminata in tempo utile per la fine dello studio. Infatti, sarà possibile avere accesso anche ai campioni della coorte "TUDA 5+", un gruppo di 1.000 soggetti della coorte TUDA che è stata monitorata per cinque anni dall'arruolamento. L'importanza di questa sotto-coorte è data dal fatto che sarà possibile determinare il ruolo di alimenti ricchi in catechine e procianidine nella prevenzione del declino cognitivo in un arco temporale di cinque anni.

Il progetto si articolerà nei seguenti punti:

- WP2: Valutare se la concentrazione di γ-valerolattoni plasmatici è modulata dal consumo di alimenti ricchi in catechine e procianidine. È fondamentale approfondire questo aspetto visto che le catechine e le procianidine hanno una clearance molto veloce e rimangono in circolo per poco tempo dopo il consumo di frutta e verdura. Allo stesso tempo è stato valutato che i γ-valerolattoni hanno una clearance molto più lenta e sono derivati microbici di catechine e procianidine. Per valutare questa associazione, nel progetto VALID saranno analizzati 500 campioni plasmatici della coorte TUDA per contenuto di γ-valerolattoni e questi dati saranno correlati con quelli provenienti dai diari alimentari dei soggetti, dove sono annotati tutti i consumi alimentari. Il contenuto di catechine e procianidine dagli alimenti segnalati dai soggetti verrà valutato mediante database estremamente aggiornati, quali USDA e Phenol Explorer database. L'unità dell'Università di Parma sarà altamente coinvolta nella quantificazione dei γ-valerolattoni nei campioni di plasma con metodica UHPLC-MS-MS.
- WP3: Valutare se i livelli di γ-valerolattoni circolanti, intesi come biomarker di consumo di alimenti ricchi di catechine e procianidine, possano avere effetti positivi sul miglioramento delle funzioni cognitive della coorte TUDA. Numerosi studi in vitro e in vivo dimostrano come alimenti ricchi in polifenoli hanno un ruolo estremamente positivo nel contrastare il declino delle funzioni cognitive dovuto all'età avanzata.

Nel progetto VALID, una volta dimostrata l'effettiva robustezza dell'associazione tra γ-valerolattoni circolanti e consumo di alimenti ricchi in catechine e procianidine, si andranno a valutare i livelli di γ-valerolattoni circolanti in 5186 campioni plasmatici della coorte TUDA. Dopodiché, questi valori saranno messi in correlazione con i dati ottenuti dai test di declino cognitivo della coorte TUDA, corretti per diversi parametri, come condizioni socio-economiche, consumo di alimenti ricchi in vitamine, ... L'unità dell'Università di Parma sarà altamente coinvolta nella quantificazione dei γ-valerolattoni nei campioni di plasma con metodica UHPLC-MS-MS.

- WP4: Valutare il ruolo del consumo di alimenti ricchi in catechine e procianidine nella prevenzione del declino cognitivo nell'arco di cinque anni di follow-up di una sotto-coorte TUDA, definita TUDA 5+. Non ci sono al momento dati in letteratura che prendano in considerazione dati alimentari in un periodo di tempo così lungo e permettano di fare delle associazioni di consumo di alimenti ricchi in polifenoli e miglioramento del declino cognitivo. Per questo motivo, nel progetto VALID, verranno valutati i livelli di γ-valerolattoni in 1000 campioni di plasma di soggetti appartenenti alla coorte TUDA, ma di cui sono stati monitorati in un arco temporale di cinque anni le loro abitudini alimentari e i loro parametri di deficit cognitivi (sotto-coorte TUDA 5+). L'unità dell'Università di Parma sarà altamente coinvolta nella quantificazione dei γ-valerolattoni nei campioni di plasma con metodica UHPLC-MS-MS.
- WP5: Valutare il possibile ruolo anti-infiammatorio dei γ-valerolattoni saggiando dei marker di infiammazione sistemici e di metabolismo. È stato valutato che l'effetto positivo sul miglioramento delle funzioni cognitive potrebbe passare tramite il ruolo anti-infiammatorio che svolgono gli alimenti ricchi in catechine e procianidine una volta consumati. Gli stessi γ-valerolattoni sembrano avere attività antiossidanti e anti-infiammatorie, che possono portare dei miglioramenti alle funzioni cognitive. Nel progetto VALID, 6186 campioni plasmatici dei soggetti di entrambe le coorti TUDA e TUDA 5+ verranno



saggiati per valutare i livelli di marker specifici di infiammazione e, successivamente, verranno messi in correlazione con i livelli di γ-valerolattoni circolanti, per valutare un potenziale effetto anti-infiammatorio di questi ultimi.

- WP6: Valutare la relazione esistente il tipo di alimentazione e fattori fisici, sociali e ambientali in modo tale da capire se questi ultimi possano influire sullo stato di salute e di declino cognitivo di soggetti anziani. È stata valutata come di fondamentale importanza la complessa interazione tra fattori biologici e socio-ambientali nello sviluppo di malattie relative al declino delle funzioni cognitive, es. la demenza senile. Tecniche di analisi geo-statistiche possono integrare i dati nutrizionali con quelli socio-ambientali in modo tale da creare degli strumenti di sorveglianza pubblica per un miglior approccio preventivo delle malattie derivate da una diminuzione delle funzioni cognitive. Nel progetto VALID, i componenti delle coorti TUDA e TUDA 5+ verranno "geo-codificati" in modo tale da raccogliere più informazioni possibili riguardanti il loro ambiente sociale, demografico, economico; questi dati verranno quindi integrati coi dati nutrizionali in modo tale da fornire dei suggerimenti per la prevenzione di malattie date dal declino cognitivo.

In conclusione, il progetto VALID avrà come obbiettivo quello di validare dei nuovi marker di consumi di categorie alimentari che potrebbero avere un ruolo di miglioramento delle funzioni cognitive nel tempo. Ci si avvarrà di una coorte TUDA per ricavare dati da utilizzare nella prevenzione di malattie degenerative mediante un'alimentazione corretta.



3. Relazione finale del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO

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

INTRODUZIONE

Numerose evidenze epidemiologiche indicano che una dieta ricca in alimenti di origine vegetale sia associabile ad una riduzione del rischio di numerose malattie croniche e l'effetto benefico di tali alimenti è stato spesso attribuito numerosi composti bioattivi che essi contengono. Tra questi, sono state osservate associazioni tra il consumo dei polifenoli e la riduzione di malattie cardiovascolari, di alcuni tumori e di malattie neurodegenerative quali la perdita di memoria e il peggioramento delle performance cognitive (Del Rio D. et al., 2013). In particolare, diversi studi hanno posto l'attenzione sul ruolo positivo, nel contrastare l'insorgenza e lo sviluppo di tali disturbi, da parte di alimenti ricchi in flavan-3-oli, classe di composti polifenolici appartenenti al sottogruppo dei flavonoidi, le cui strutture polimeriche vengono chiamate proantocianidine o, se costituite da sole unità di (epi)catechine, procianidine (Del Rio D. et al., 2013; Monagas M. et al., 2010). A tal proposito, è nato l'interesse nel ricercare possibili biomarker nutrizionali per il consumo di flavan-3-oli che possano quindi essere un buon punto di partenza per esplorare ulteriormente i benefici attribuibili al consumo di fonti alimentari di catechine e procianidine. Diversi studi hanno dimostrato che questo ruolo sembra poter essere svolto efficacemente dai fenil-y-valerolattoni, metaboliti derivati dal catabolismo dei composti flavan-3-olici da parte del microbiota colonico. Essi, a differenza delle catechine coniugate che sono il risultato principale dell'assorbimento dei flavan-3-oli nel primo tratto gastrointestinale, derivano dalla maggior parte degli oligomeri e dei polimeri che non vengono assorbiti in questo tratto e che raggiungono quindi il colon, motivo per il quale vengono assorbiti ed escreti con un ritardo di svariate ore, mostrando alte concentrazioni urinarie e plasmatiche per periodi di tempo prolungati (Calani L. et al., 2012; Borges G. et al., 2017; Castello F. et al., 2018; Del Rio D. et al., 2010).

SCOPO DELLA RICERCA

Il lavoro svolto in questo progetto, che coinvolge Regno Unito, Italia ed Irlanda, ha avuto l'obiettivo di validare i fenil-γ-valerolattoni plasmatici come biomarker di consumo di alimenti ricchi di catechine/procianidine e di dimostrare la loro associazione con marker dell'infiammazione, della salute metabolica e, in definitiva, delle funzioni cognitive (Angelino D. et al. 2020).

Il lavoro operativo svolto presso l'Università di Parma è stato:

- estrarre, in fase solida, i composti di interesse dai campioni plasmatici ricevuti (WP2, WP3, WP4);
- analizzare i campioni ottenuti mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa al fine di identificare e quantificare i fenil-γ-valerolattoni (WP2, WP3, WP4);
- correlare i dati ottenuti da tale analisi con quelli di intake dei soggetti partecipanti (WP2).

MATERIALI E METODI

Sui campioni plasmatici ricevuti, contenenti circa 1000 μL di plasma, è stata eseguita un'estrazione in fase solida (SPE) secondo il seguente protocollo:

- 350 μL di plasma venivano addizionati con 350 μL di acido fosforico al 4% e 5 μL di Standard Interno (acido diidroisoferulico-3-O-solfato deuterato) alla concentrazione di 28 μM. In questo modo la concentrazione in pozzetto risultava essere di 0.2 μM;
- dopo agitazione mediante vortex, i campioni sono stati centrifugati a 17.968 x g per 10 minuti a 4 °C;
- 600 μL di campione sono stati prelevati e caricati per l'estrazione in fase solida in pozzetti di una piastra da 96 pozzetti ti tipo Oasis, con 2 mg di resina Sorbent per pozzetto, con 30 μm di diametro per particella.

Il protocollo di estrazione in piastra prevedeva:

- un lavaggio con 200 µL di acqua bidistillata
- un lavaggio con 200 µL di acido acetico allo 0,2 % in acqua
- un'estrazione con 60 µL di metanolo
- I campioni così estratti sono stati stoccati a -80 °C fino al momento dell'analisi UHPLCMS/MS.



I campioni sono stati analizzati mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa. Il sistema era formato da un UHPLC DIONEX 3000 accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, USA), dotato di una sorgente riscaldata a ionizzazione elettrospray (H-ESI-II; Thermo Fisher Scientific Inc.). La separazione è stata fatta secondo il protocollo pubblicato da Brindani N. et al (Brindani N. et al., 2017). La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna C18 per UHPLC (100 x 2,1mm), avente una porosità di 2,6 μm. La fase mobile A era costituita da 0,2% di acido formico in acqua mentre la fase mobile B da acetonitrile contenente 0,2% di acido formico. Il gradiente iniziava con un 5% di B, mantenendo condizioni isocratiche per 0,5 minuti, raggiungendo il 95% di B a 7 minuti, seguito da 1 minuto a 95% di B e poi 4 minuti alle condizioni iniziali per riequilibrare la colonna. Il flusso è stato settato a 0,4 mL/min, il volume di iniezione impostato a 5 μL e la colonna termostata a 40 °C. L'acquisizione in massa è stata ottenuta in modalità a ionizzazione negativa con una temperatura capillare di 270 °C, mentre la sorgente a 300°C. Le condizioni caratteristiche dell'MS sono state ottimizzate per ogni fenil-γ-valerolattone. Il metodo applicato consisteva nella determinazione selettiva di ogni ione-precursore target attraverso l'acquisizione degli ioni-prodotto caratteristici nella modalità SRM (Selected Reaction Monitoring). Due transizioni molecolari sono state utilizzate per qualificare e quantificare i fenil-γ-valerolattoni coniugati. Gli standard non commerciali sono stati sintetizzati secondo il protocollo di Brindani N.et al. (Brindani N. et al., 2017, **Tabella 1**).

Tabella 1. Parametri di identificazione e quantificazione UHPLC-ESI-MS/MS dei fenil-γ-valerolattoni presenti nei campioni di plasma umano

		Parent		Quantif	ier	Qualif	ier		
No.	RT (min)	ion (<i>m/z</i>)	S- lens	Product ion (m/z)	CE (V)	Product ion (m/z)	CE (V)	LOD (nM)	LLOQ (nM)
1	4.04	207	75	163	20	122	30	100	200
2	3.64	207	75	123	21	163	30	180	380
3	4.95	271	93	191	25	106	21	2.0	6.0
4	4.78	271	93	191	23	147	21	2.0	6.0
5*	3.90	287	96	207	24	163	23	0.75	2.5
6	2.13	287	96	207	23	163	23	125	250
7	4.20	367	93	191	25	147	20	15.0	30.0
8	3.90	383	93	207	23	163	27	3.0	7.5
9	3.70	383	93	163	23	163	27	3.0	7.5

Legenda: 1)5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ-valerolactone; 2) 5-(3',5'-Dihydroxyphenyl)- γ-valerolactone; 3) 5-phenyl-γ-valerolactone-3'-sulfate, 4) 5-phenyl-γ-valerolactone-4'-sulfate; 5)5-(Hydroxyphenyl)-γ-valerolactone-sulfate*; 6) 5-(5'-Hydroxyphenyl)-γ-valerolactone-3'-sulfate; 7) 5-phenyl-γ-valerolactone-3'-glucuronide; 8) 5-(4'-Hydroxyphenyl)-γ-valerolactone-3'-glucuronide. CE, Collision Energy; LOD, Limit of Detection; LLOQ, Lower Limit of Quantification; RT, Retention Time. * Il composto è la somma di due isomeri che co-eluiscono, 5-(3'-hydroxyphenyl)-γ-valerolactone-4'-sulfate e 5-(4'-hydroxyphenyl)-γ-valerolactone-3'-sulfate.



A questo proposito sono stati acquistati e rendicontati i seguenti articoli: piastre a 96 pozzetti pre-paccate con resina OASIS, colonne e precolonne cromatografiche per strumentazione UHPLC/MS/MS.

I campioni plasmatici utilizzati provengono dalla coorte TUDA (Trinity, Ulster, Department of Agriculture) costituita da 5,186 adulti di un'età compresa tra i 60 e i 102 anni affetti da declino cognitivo moderato, reclutati da Regno Unito ed Irlanda (McCarroll K. et al, 2015). Un certo numero di test validati è stato utilizzato per la valutazione delle loro performance cognitive e diverse informazioni sono state raccolte sulla storia clinica generale, sullo stile di vita e sulle misure antropometriche dei soggetti. Ai partecipanti è stato poi somministrato telefonicamente un questionario telefonico di frequenza, messo a punto per valutare il loro intake abituale di flavan-3-oli. Per selezionare gli alimenti da includere è stata generata una lista di alimenti contenenti flavan-3-oli basata sul database Phenol-Explorer e su quello dell'Dipartimento dell'Agricoltura statunitense (USDA). L'apporto alimentare è stato stimato per i tre maggiori sottogruppi flavan-3-olici (monomeri, proantocianidine e teaflavine). Per la validazione dei fenil-γ-valerolattoni plasmatici come biomarker di intake nutrizionali di alimenti ricchi in catechine e procianidine, dopo l'analisi dei dati ricavati dai questionari telefonici, i soggetti sono stati suddivisi in terzili di intake, con le categorie "basso", "medio" ed "alto" intake di alimenti ricchi in catechine e procianidine. A questo punto, sono stati suddivisi i fenil-γ-valerolattoni plasmatici più rappresentativi in base ai suddetti terzili.

RISULTATI

Considerati i 5186 campioni analizzati, tra i fenil-y-valerolattoni plasmatici considerati il 5-(idrossifenil)-y-valerolattone-solfato (#5), somma dei due isomeri 5-(4'-idrossifenil)-y-valerolattone-3'-solfato e 5-(3'-idrossifenil)-y-valerolattone-4'-solfato, ed il 5-(4'-idrossifenil)-y-valerolattone-3'-glucuronide (#8) sono risultati essere i composti più rappresentativi e con maggior concentrazione plasmatica e si presentano quindi come potenziali biomarker di diete ricche in (epi)catechine e procianidine (Tabella 2).

	Campioni				
No.	positivi	Media ± SEM	Mediana [IQR]	Max	Min
	(%)	(nM)	(nM)	(n M)	(nM)
3	8	0.60 ± 0.08	0.00 (0.00)	321.14	0.00
4	5	0.21 ± 0.02	0.00 (0.00)	28.42	0.00
5*	83	22.28 ± 0.66	6.55 (20.14)	689.62	0.00
6	5	0.31 ± 0.09	0.00 (0.00)	125.00	0.00
7	2	0.73 ± 0.12	0.00 (0.00)	389.11	0.00
8	43	9.82 ± 0.38	0.00 (9.80)	767.38	0.00
9	13	1.98 ± 0.13	0.00 (0.00)	190.84	0.00
Somma 3 to 9	85	35.92 ± 1.01	11.26 (33.42)	1240.17	0.00

Tabella 2. Concentrazione dei fenil-γ-valerolattoni trovati nei 5186 campioni analizzati della coorte TUDA.

Legenda: 3) 5-phenyl-y-valerolactone-3'-sulfate, 4) 5-phenyl-y-valerolactone-4'-sulfate; 5) 5-(Hydroxyphenyl)-y-valerolactone-sulfate*; 6) 5-(5'-Hydroxyphenyl)-y-valerolactone-3'-sulfate; 7) 5-phenyl-y-valerolactone-3'-glucuronide; 8) 5-(4'-Hydroxyphenyl)-y-valerolactone-3'-glucuronide; 9) 5-(5'-Hydroxyphenyl)-y-valerolactone-3'-glucuronide. IQR, InterQuartile Range; SEM, Standard Error of the Mean. * Il composto è la somma di due isomeri che coeluiscono, 5-(3'-hydroxyphenyl)-y-valerolactone-4'-sulfate e 5-(4'-hydroxyphenyl)-y-valerolactone-3'-sulfate.



Nella sotto-coorte TUDA 5+, ossia soggetti appartenenti alla coorte TUDA che sono stati monitorati in un arco temporale di cinque anni per le loro abitudini alimentari e parametri di deficit cognitivi, sono stati valutati i livelli plasmatici di fenil-γ-valerolattoni, per un totale di 953 campioni (**Tabella 3**). I r risultati mostrano come i composti maggiormente rappresentativi e con maggior concentrazione siano il 5-(idrossifenil)-γ-valerolattone-solfato e il 5-fenil-γ-valerolactone-3'-glucuronide, sia al campionamento iniziale che quello dopo 5 anni.

No.	Tempo di raccolta campioni	Campioni positivi (%)	Media ± SEM (nM)	Mediana [IQR] (nM)	Max (nM)	Min (nM)
3	0 anni	11	0.85 ± 0.16	0.00 (0.00)	105.71	0.00
3	5 anni	13	1.09 ± 0.27	0.00 (0.00)	199.92	0.00
4	0 anni	4	0.15 ± 0.03	0.00 (0.00)	10.44	0.00
4	5 anni	19	0.80 ± 0.08	0.00 (0.00)	28.14	0.00
5*	0 anni	86	24.81 ± 1.65	7.95 (23.92)	630.48	0.00
o"	5 anni	88	23.01 ± 1.89	6.51 (20.64)	928.26	0.00
<u> </u>	0 anni	4	0.66 ± 0.29	0.00 (0.00)	125.00	0.00
6	5 anni	1	0.72 ± 0.42	0.00 (0.00)	241.30	0.00
	0 anni	35	8.85 ± 0.93	0.00 (0.00)	609.99	0.00
7	5 anni	63	18.42 ± 1.79	3.75 (20.81)	1029.85	0.00
8	0 anni	4	0.43 ± 0.11	0.00 (0.00)	82.91	0.00
0	5 anni	32	3.03 ± 0.25	0.00 (3.75)	77.45	0.00
9	0 anni	1	0.42 ± 0.13	0.00 (0.00)	71.50	0.00
<u> </u>	5 anni	9	3.28 ± 0.50	0.00 (0.00)	244.24	0.00
21.0	0 anni	83	36.17 ± 2.54	9.89 (34.00)	1240.17	0.00
3 to 9	5 anni	86	30.41 ± 3.02	9.63 (32.67)	1240.17	0.00

Tabella 3. Concentrazione dei fenil-y-valerolattoni trovati nei 953 campioni analizzati della coorte TUDA 5+.

Legenda: 3) 5-phenyl-y-valerolactone-3'-sulfate, 4) 5-phenyl-y-valerolactone-4'-sulfate; 5) 5-(Hydroxyphenyl)-y-valerolactone-sulfate*; 6) 5-(5'-Hydroxyphenyl)-y-valerolactone-3'-sulfate; 7) 5-phenyl-y-valerolactone-3'-glucuronide; 8) 5-(4'-Hydroxyphenyl)-y-valerolactone-3'-glucuronide; 9) 5-(5'-Hydroxyphenyl)-y-valerolactone-3'-glucuronide. IQR, InterQuartile Range; SEM, Standard Error of the Mean. * Il composto è la somma di due isomeri che coeluiscono, 5-(3'-hydroxyphenyl)-y-valerolactone-4'-sulfate e 5-(4'-hydroxyphenyl)-y-valerolactone-3'-sulfate.

Di un sottogruppo di 410 soggetti appartenenti alla coorte TUDA, sui quali è stato condotto il questionario telefonico al fine di raccogliere informazioni sul loro consumo abituale di alimenti ricchi in procianidine, sono stati identificati e quantificati i fenil-γ-valerolattoni contenuti nei rispettivi campioni plasmatici. I composti più rappresentativi sono risultati essere il 5-(idrossifenil)-γ-valerolattone-solfato, il 5-(3',4'-diidrossifenil)-γ-valerolattone-3'-O-glucuronide ed il 5-(3',5'-diidrossifenil)-γ-valerolattone-3'-O-glucuronide ed il 5-(3',5'-diidrossi



valerolattone-3'-O-glucuronide, con una percentuale di presenza del 94,9%, 77,3% e 49,5% rispettivamente. I flavan-3-oli assunti con la dieta da parte dei 410 soggetti sono stati quindi estrapolati e classificati secondo le diverse categorie. Il valore medio di intake di flavan-3-oli totali si aggirava intorno ai 645 mg/giorno ed i maggior contribuenti risultavanoessere i flavan-3-oli monomerici (circa 330 mg/giorno), seguiti dalle proantocianidine (circa 239 mg/giorno), ma con un contributo rilevante dato anche dalle teaflavine (circa 75 mg/giorno).

Una prima valutazione dei dati ha tenuto conto della presenza di numerosi outlier, identificati come quei valori maggiori di 3 deviazioni standard rispetto alla media totale della popolazione. Questo set di soggetti – 64 in tutto – è stato escluso dalla valutazione statistica dei dati. Nei 346 soggetti rimanenti il 5-(idrossifenil)-γ-valerolattone-solfato, il 5-(3',4'-diidrossifenil)-γ-valerolattone-3'-O-glucuronide ed il 5-(3',5'-diidrossifenil)-γ-valerolattone-3'-O-glucuronide si sono confermati i composti più rappresentativi, riscontrati rispettivamente nel 95%, 77% e 52% dei campioni plasmatici analizzati, e sono stati quindi relazionati con i corrispondenti dati di intake di flavan-3-oli. L'analisi statistica è stata effettuata suddividendo la popolazione in base ai terzili di intake di flavan-3-oli totali: "basso" (0-120 mg/giorno), "medio" (121- 168 mg/giorno) ed "alto" (≥ 169 mg/giorno). I dati hanno quindi dimostrato che: per quanto riguarda il 5-(idrossifenil)-γ-valerolattone-solfato ed il 5-(3',4'-diidrossifenil)-γ-valerolattone-3'-O-glucuronide effettivamente i soggetti che risultavano maggiori consumatori di flavan-3-oli avevano anche una concentrazione significativamente più alta di tali composti (p< 0.05) rispetto ai bassi e medi consumatori, mentre per il 5-(3',5'-diidrossifenil)-γ-valerolattone-3'-O-glucuronide non è stata evidenziata un'associazione statisticamente significativa con l'intake di flavan-3-oli totali (p> 0.05).

CONCLUSIONI

Seppur con alcuni limiti, i risultati del nostro studio si sono dimostrati coerenti tra loro, evidenziando sempre il 5-(idrossifenil)γ-valerolattone-solfato ed il 5-(3',4'-diidrossifenil)-γ-valerolattone-3'-O-glucuronide quali composti più rappresentativi del set
di soggetti considerato e, una volta correlati con i dati di intake di flavan-3-oli, coloro che risultavano maggiori consumatori
di flavan-3-oli avevano effettivamente anche una concentrazione significativamente più alta di tali composti rispetto ai bassi
e medi consumatori. Quindi, i risultati ottenuti, coerenti anche con quanto riportato in letteratura, ci permettono di confermare
che tali composti possono effettivamente essere considerati biomarker plausibili di diete ricche in flavan-3-oli e che l'uso di
tali metaboliti per monitorare i polifenoli assunti con la dieta, e quindi i potenziali effetti protettivi delle diete ricche di polifenoli
sulle funzioni cognitive nell'invecchiamento, meritano ulteriori indagini.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Angelino, D., Caffrey, A., Moore, K., Laird, E., Moore, A. J., Gill, C. I., ... & Mullen, B. (2020). Phenyl-γ-valerolactones and healthy ageing: Linking dietary factors, nutrient biomarkers, metabolic status and inflammation with cognition in older adults (the VALID project). Nutrition Bulletin. In press, DOI: 10.1111/nbu.12444.
- 2) Borges, G., Ottaviani, J.I., van der Hooft, J.J.J., Schroeter, H. & Crozier, A. (2017). Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: A review of recent findings. Molecular Aspects of Medicine, 1-13.
- Brindani, N., Mena, P., Calani, L., Benzie, I., Choi, S.W., Brighenti, F., ... Del Rio, D. (2017). Synthetic and Analytical Strategies for the Quantification of Phenyl-γ-Valerolactone Conjugated Metabolites in Human Urine. Molecular Nutrition &Food Research, 61 (9), 6–10.
- 4) Calani, L., Del Rio, D., Callegari, ML., Morelli, L. & Brighenti, F. (2012). Updated bioavailability and 48 h excretion profile of flavan-3-ols from green tea in humans. International Journal of Food Sciences and Nutrition,63(5), 513–521.
- Castello, F., Costabile, G., Bresciani, L., Tassotti, M., Naviglio, D., Luongo, D., ...& Mena, P. (2018). Bioavailability and pharmacokinetic profile of grape pomace phenolic compounds in humans. Archives of Biochemistry and Biophysics, 646, 1-9.
- 6) Del Rio, D., Calani, L., Cordero, C., Salvatore, S., Pellegrini, N., Brighenti, F. (2010). Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. Nutrition, 26, 1110-1116.
- 7) Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G. & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxidants& Redox Signaling, 18(14), 1818-92.
- 8) McCarroll, K., Beirne, A., Casey, M., McNulty, H., Ward, M., Hoey, L., ...& Cunningham, C. (2015). Determinants of 25-hydroxyvitamin D in older Irish adults. Age and Ageing, 44, 847-53.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., ...& Bartolomé, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. Food &Function, 1(3), 233-53.



4. Obiettivi, benefici e criticità del progetto

SPA	SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO				
	Descrizione	degli obiettivi d	el progetto		
Obiettivi generali	Obiettivi specifici	Linee di attività in WP	Risultati attesi	Risultati raggiunti	
	I. Identificazione e quantificazione di dei γ-valerolattoni in 500 campioni plasmatici della TUDA	• WP2	Identificazione e quantificazione dei γ- valerolattoni circolanti	Identificazione e quantificazione dei γ- valerolattoni circolanti	
a. Identificazione e quantificazione di γ- valerolattoni plasmatici	2. Identificazione e quantificazione di dei γ-valerolattoni in 5186 campioni plasmatici della TUDA	• WP3	Identificazione e quantificazione dei γ- valerolattoni circolanti	Identificazione e quantificazione dei γ- valerolattoni circolanti	
	 Identificazione e quantificazione di dei γ-valerolattoni in 1000 campioni plasmatici della TUDA 5+ 	• WP4	Identificazione e quantificazione dei γ- valerolattoni circolanti	Identificazione e quantificazione dei γ- valerolattoni circolanti	
 b. Associazione tra l livelli plasmatici di γ-valerolattoni e declino cognitivo in soggetti anziani. 	Analisi statistica per la valutazione della correlazione tra livelli plasmatici di γ- valerolattoni e funzione cognitiva	• WP3	Diretta correlazione tra i livelli di γ-valerolattoni circolanti e miglioramento del declino cognitivo in soggetti anziani	Correlazione tra γ- valerolattoni circolanti e parametri di declino cognitivo	
C. Associazione tra livelli di γ- valerolattoni plasmatici e declino cognitivo durante 5 anni di monitoraggio do 1000 soggetti della coorte TUDA 5+	1. Analisi statistica per la valutazione della correlazione tra livelli plasmatici di γ- valerolattoni e funzione cognitiva al tempo iniziale	• WP4	Diretta correlazione tra i livelli di γ- valerolattoni circolanti e miglioramento del declino cognitivo in soggetti anziani durante il follow-up di 5 anni	Correlazione tra γ- valerolattoni circolanti e parametri di declino cognitivo nella coorte TUDA5+	



d. Correlazione tra i livelli plasmatici di γ- valerolattoni e biomarker di infiammazione e metabolismo delle coorti TUDA e TUDA 5+, 6186 partecipanti	1. Analisi statistica per la valutazione della correlazione tra livelli plasmatici di γ- valerolattoni e marker di infiammazione e metabolismo	• WP5	Diretta correlazione tra i livelli di γ- valerolattoni circolanti e miglioramento dei marker di infiammazione sistemica	Correlazione tra γ- valerolattoni circolanti e parametri di infiammazione sistemica
e. Ruolo dei γ- valerolattoni e altri marker nutrizionali come parte di un approccio olistico nella promozione delle funzioni	1. Localizzazione, mappaggio e Geographic Information Science (GIS) del 6188 partecipanti	WP6WP6	Evidenziare le differenze socio- economiche dei soggetti anziani e provare una diretta correlazione di una migliore condizione socio-economica con	Non raggiunto (*)
cognitive nell'anzianità, con collegamenti anche	2. Elaborazione statistica dei dati GIS 3. Modellizzazione	WDC	un miglioramento dei dati nutrizionalii e cognitivi	
all'attività fisica e le condizioni socio- ambientali	del progetto VALID secondo la statistica bayesiana	• WP6	COGINIIVI	
f. Piano sfruttamento dei risultati, divulgazione dei risultati	Divulgazione dei dati mediante pubblicazioni su riviste con sistema peer-review, convegni di settore, rassegne stampa	• WP7	Divulgazione dei dati mediante mezzo stampa, convegni del settore, articoli scientifici su riviste peer-review	L'Obiettivo è stato raggiunto mediante: 1) la partecipazione a convegni nazionali ed internazionali di settore (missione a Los Angeles Del Rio D. presso UCLA-CNSR Oppenheimer Center for Neurobiology of Stress and Resilience 24-30/12/2019, partecipazione da parte del Prof. Del RioD. e del Dott. Angelino D. alla 13ma European Nutrition Conference, Federtion of European Nutrition Societies (FENS-2019) 15-18/10/2019 Dublino-Irlanda, partecipazione dott. Angelino D. al Berry Health Benefits Symposium 2019-Portland Seattle USA 7-9/05/201; 2) pubblicazioni scientifiche peer review, rassegne stampa:



			- Conference Abstracts of SINU 2018- A16 VALEROLACTONES AND HEALTHY AGEING: LINKING DIETARY FACTORS, NUTRIENT BIOMARKERS, METABOLIC STATUS AND INFLAMMATION WITH COGNITION IN OLDER ADULTS e THE VALID PROJECT; -Phenyl-c-valerolactones and healthy ageing Linking dietary factors nutrient biomarkers, metabolic status and inflammation with cognition in olde adults (the VALID project) peer-review Bulletin Bulletin; - Why dietary polyphenols are important for the ageing brain: Early findings from the VALID project – Winter 2020 nutrition&dieteticreview - IMPACT-NOURISHING NUTRITION AND HEALTH RESEARCH - Polyphenols for healthier ageing;	
,				
		NOTE		
(*) Obiettivo non raggiunto e.1, e.2, e.3: analisi ancora in fase di svolgimento, ma non di pertinenza dell'unità dell'Università di Parma.				

5. 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



SPAZIO R	ISERVATO ALL'ESPERTO	(qualora designato)
Ossei	vazioni alle azioni corretti	ve messe in atto

Timbro dell'Ente proponente il progetto

Il Coordinatore del progetto F.to Prof. Daniele Del Rio



Documento informatico sottoscritto con <u>firma elettronica digitale</u> ai sensi dell'art.21 e 24 del Dlgs n.82/2005



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

Luogo e Data

Firma leggibile dell'Esperto (qualora designato)



181 - 4 -

¹Note

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
- 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.
- 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:
 - Zootecnico;
 - b) Orticolo;
 - c) Cerealicolo;d) Viticolo;

 - e) Frutticolo;
 - Olivicolo;
 - g) Biologico;
 - h) Floricolo;
 - Forestale;
 - Innovazione sociale;
 - k) Piante officinali;
 - I) Risicolo;
 - m) Pesca e acquacoltura.