

LAVORO ORIGINALE

EFFETTO DEI POLIFENOLI SUL RISCHIO CARDIOVASCOLARE E LE PERFORMANCE NEUROCOGNITIVE

Effect of polyphenols on cardiovascular risk and neurocognitive performance

FRANCESCO POTÌ¹, MARCELLA PALUMBO², DANIELE SANTI^{3,4}, GIORGIA SPAGGIARI⁴, ILARIA ZANOTTI², FRANCESCA ZIMETTI²

¹Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Unità di Neuroscienze, Università di Parma;

²Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma;

³Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Unità di Endocrinologia, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena;

⁴Dipartimento di Medicine Specialistiche, Unità di Endocrinologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena, Ospedale Civile di Baggiovara, Modena

SUMMARY

Several studies have shown how a diet rich in polyphenols can have beneficial effects on the development of degenerative diseases, such as atherosclerosis and diseases affecting the central nervous system. This beneficial activity of polyphenols has been associated not only with their antioxidant and anti-inflammatory properties, but also with additional mechanisms such as the ability to modulate lipid metabolism and the functionality of the intestinal microbiota. However, long-term human studies have produced controversial results, making the prediction of the impact of polyphenols on health uncertain. The purpose of this review is to provide an overview and critical analysis of the literature relating to the effects of the main dietary polyphenols on cardiovascular and neurodegenerative diseases. The meta-analysis we conducted, including randomized controlled clinical trials on subjects who had taken polyphenol supplements, revealed that although some polyphenols may have a positive impact on certain specific markers of cardiovascular risk and cognitive status, in the literature there is a lot of inconsistent data. Therefore, precise indications regarding the use of these substances for the prevention of cardiovascular diseases and cognitive decline are not currently available. Once some fundamental aspects such as the bioavailability of polyphenols and the characterization of the pharmacokinetics and safety of the formulations containing them have been clarified, it will be possible to have a clearer picture of the real potential of polyphenols for disease prevention.

Key words: Polyphenols; prevention; cardiovascular disease; neurodegenerative disease; meta-analysis.

Indirizzo per la corrispondenza

Ilaria Zanotti

Università di Parma

E-mail: ilaria.zanotti@unipr.it

I. Introduzione

Negli ultimi anni è aumentato esponenzialmente l'interesse per gli effetti che i polifenoli hanno sulla salute umana. Sin dagli anni '80, sono stati pubblicati su PubMed più di 80.000 studi che riportano molteplici effetti dei polifenoli su un'ampia gamma di patologie (1). Tuttavia la maggior parte dei dati deriva da studi *in vitro* o *in vivo* (2), mentre gli studi clinici che valutano i benefici a lungo termine dei polifenoli sono scarsi. Inoltre, finora non sono stati ancora condotti studi con *endpoint* ben definiti (3). Una delle principali limitazioni degli studi attualmente pubblicati è rappresentata dall'inaccuratezza della scelta delle concentrazioni dei polifenoli testati. Infatti, spesso sono analizzate quantità molto più elevate di questi composti rispetto a quelle che si possono trovare negli alimenti. In più, la mancanza di informazioni sulla farmacocinetica, riguardanti in particolare l'assorbimento ed il metabolismo, può portare alla valutazione dell'attività di composti diversi da quelli effettivamente biodisponibili. I polifenoli si caratterizzano infatti per una biodisponibilità molto bassa, legata al fatto che sono presenti negli alimenti come composti glicosidati, con uno scarso assorbimento a livello intestinale. Una volta nel colon, l'idrolisi enzimatica dei glicosidi promossa dal microbiota intestinale libera l'aglicone, che a sua volta subisce l'assorbimento o va incontro ad ulteriore metabolismo (4). Tuttavia, la maggior parte degli studi che indagano il meccanismo d'azione dei polifenoli è condotta *in vitro* utilizzando i composti presenti negli alimenti e non i metaboliti che effettivamente raggiungono la cellula *target*. Di conseguenza, i numerosi dati risultanti da questo genere di studi hanno una scarsa rilevanza fisiologica.

Da numerosi lavori emerge l'azione benefica che i polifenoli rivestono nella prevenzione di svariati disturbi tra cui il cancro, la sindrome metabolica, il diabete e la steatosi epatica non alcolica. In questo lavoro di revisione e meta-analisi è stata analizzata in modo critico la letteratura riguardante lo studio nell'uomo dell'attività dei polifenoli sulle patologie cardiovascolari e neurodegenerative, la cui elevata incidenza a livello mondiale rappresenta una causa crescente di mortalità, morbilità e disabilità. In particolare, abbiamo selezionato studi effettuati su soggetti che assumevano a scopo preventivo integratori alimentari contenenti polifenoli, escludendo invece gli studi in cui tali composti venivano assunti soltanto attraverso la dieta. Questa strategia metodologica ci ha permesso di valutare più accuratamente le attività biologiche dei polifenoli, evitando le attività biologiche di altri composti alimentari bioattivi e delle matrici alimentari. I lettori interessati ad una ampia ed esauriente trattazione dell'impatto dei polifenoli dietetici sulla salute cardiovascolare sono invitati alla consultazione delle review di Visioli e Tomé-Carneiro (2, 3).

2. Effetto dei polifenoli sul rischio cardiovascolare

2.1 Studi sull'uomo

Com'è noto, le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morbilità e mortalità a livello mondiale, essendo responsabili del 32% della mortalità totale e del 44% di quella imputabile a malattie non trasmissibili. L'85% degli eventi fatali legati a malattie cardiovascolari è dovuto a ictus e ad infarto (5). Negli ultimi 20 anni, grazie all'implementazione di diverse misure preventive volte alla riduzione dei fattori di rischio come dieta sbilanciata, consumo eccessivo di alcol, inattività

fisica, fumo di sigaretta, il rischio di morte dovuta a malattie cardiovascolari o ad altre malattie non trasmissibili ha mostrato un lieve ma costante decremento (6). La terapia farmacologica ha inoltre fornito un importante contributo al miglioramento dell'aspettativa e della qualità della vita sia in prevenzione primaria, che secondaria, seppure la comparsa di effetti collaterali e la limitata aderenza ai trattamenti abbiano talvolta ridotto l'efficacia di questi interventi. Un ulteriore approccio per ridurre il rischio cardiovascolare prevede l'impiego di integratori alimentari/nutraceutici e alimenti funzionali, strategia che sta suscitando un discreto interesse, nonostante l'efficacia di questi prodotti non sempre sia avvalorata da studi clinici condotti con metodi rigorosi (7, 8). L'analisi quantitativa e sistematica dei dati derivanti dagli studi che abbiamo selezionato è descritta nella sezione di meta-analisi, mentre qui di seguito discuteremo l'effetto dei polifenoli su diversi *endpoint* cardiovascolari valutati in studi pubblicati negli ultimi sei anni.

Un limite all'analisi critica degli studi sui polifenoli è legato alla grande eterogeneità dei disegni sperimentali, della popolazione in studio, dei composti impiegati e degli *endpoint* valutati, oltre che alla scarsità di dati sull'attività biologica dei diversi metaboliti, fattori che rendono complesso il confronto tra gli studi e impediscono il raggiungimento di conclusioni univoche.

Un piccolo *trial* clinico randomizzato, controllato verso placebo, in doppio cieco, ha valutato l'effetto di 200 mg/die di proantocianidine oligomeriche, derivanti da un estratto di uva rossa, somministrate per 8 settimane a 70 soggetti moderatamente ipercolesterolemici. Gli autori hanno osservato una significativa riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo totale ($-14,8$ mg/dL \pm 19,7 *vs* livello basale, $p=0,001$), trigliceridi ($-19,4$ mg/dL \pm 42,4 *vs* livello

basale, $p=0,001$) e LDL-C ($-13,1$ mg/dL \pm 20,6 *vs* livello basale, $p=0,002$). Nello stesso studio diverse componenti anti-aterogene del plasma risultavano aumentate dal trattamento: apolipoproteina A-I (9,3 mg/dL \pm 11,7 *vs* livello basale, $p=0,001$), paraossonasi-1 (4,5 IU/L \pm 7,7 *vs* livello basale, $p=0,03$) e HDL-C (2,1 mg/dL \pm 3,7 *vs* livello basale, differenza non statisticamente significativa) (9).

In un altro studio 70 soggetti sono stati randomizzati per ricevere 162 mg/die di quercetina derivante da estratto di buccia di cipolla o placebo in un *trial* a *crossover*, in doppio cieco, controllato verso placebo, per un periodo di trattamento di 6 settimane, intervallato da sei settimane di *washout* (10). Questo studio è di particolare interesse perché in ciascun partecipante sono state misurate le concentrazioni plasmatiche di quercetina, dei suoi derivati monometilati tamrixetina, (4'-*O*-metil quercetina) ed isoramnetina (3'-*O*-metil quercetina), e del metabolita deidrossilato kaempferolo. Nel sottogruppo dei soggetti ipertesi, la quercetina ha ridotto significativamente la pressione sistolica (SBP) di 3,6 mmHg ($p=0,022$) rispetto al placebo. Tuttavia, i marcatori infiammatori, tra cui l'endotelina-1, sICAM-1, sVCAM-1, la dimetilarginina asimmetrica, la funzione endoteliale, i marcatori di ossidazione non sono stati influenzati dalla quercetina né in tutti i partecipanti, né nel sottogruppo degli ipertesi. Nella stessa coorte di soggetti, non sono state rilevate variazioni significative nelle concentrazioni sieriche di leptina, adiponectina, nell'HOMA-AD, glucosio, insulina, HOMA-IR, marcatori plasmatici di funzionalità epatica e renale, nei marcatori di infiammazione hs-CRP e TNF- α (11). Uno studio controllato verso placebo, randomizzato, in doppio cieco, che ha coinvolto 72 partecipanti sani, sovrappeso o obesi, trattati con 100 mg/die di quercetina per

12 settimane non ha evidenziato differenze significative nella pressione sanguigna tra i due bracci di trattamento rispetto ai valori basali. Tuttavia il trattamento è stato efficace nel migliorare la funzione endoteliale valutata come dilatazione flusso-mediata (FMD%; da $12,5 \pm 5,2\%$ a $15,2 \pm 6,1\%$; $p=0,002$), e nella conta delle cellule progenitrici endoteliali, valutata tramite citometria di flusso ($44,2 \pm 25,6\%$ vs $52,3 \pm 18,6\%$; $p=0,005$), rispetto ai valori basali (12).

Un altro studio randomizzato, controllato verso placebo, in doppio cieco, con un disegno a *crossover*, ha valutato l'effetto di (-)-epicatechina (100 mg/die) e quercetina-3-glucoside (160 mg/die) su marcatori di funzione endoteliale e d'infiammazione (13) o sulla funzionalità vascolare e la salute cardiometabolica, in una coorte di 37 soggetti sani, in una condizione di pre-ipertensione (SBP = 125-160 mmHg), di età compresa tra i 40 e gli 80 anni. La prima analisi ha mostrato una riduzione dei livelli plasmatici dei marcatori dell'infiammazione vascolare, come le selectine o l'interleuchina-1 beta. Tuttavia nella maggior parte dei casi le differenze non erano statisticamente significative. Nella seconda analisi la supplementazione di epicatechina ha invece migliorato l'insulina plasmatica a digiuno e l'HOMA-IR senza influenzare la pressione arteriosa, la rigidità arteriosa, l'NO, l'endotelina-1 o il profilo lipidico plasmatico. La supplementazione di quercetina-3-glucoside non ha avuto effetto su FMD, insulino resistenza o altri fattori di rischio per malattia cardiovascolare (14). Nonostante l'aderenza alla terapia e l'assorbimento dei polifenoli siano stati monitorati durante le quattro settimane di trattamento misurando le concentrazioni plasmatiche ed urinarie di epicatechina e quercetina, non sono state condotte ulteriori analisi sui metaboliti. Tuttavia, studiare i flavonoidi assunti come tali invece che

quelli integrati nelle complesse matrici alimentari d'origine può suscitare qualche problema. Infatti da una parte questo approccio riduce l'entità di possibili fattori confondenti, dall'altro può escludere potenziali interazioni favorevoli con altri flavonoidi e composti naturalmente presenti nelle fonti originali.

2.2. Meccanismi di cardioprotezione

Il ruolo dello stress ossidativo come promotore di disfunzione endoteliale, a sua volta responsabile dell'insorgenza di aterosclerosi e dei conseguenti disordini cardiovascolari, è ormai ampiamente accettato. Questo concetto fornisce il razionale per la strategia anti-infiammatoria e anti-ossidante nel campo della cardioprotezione (15) e rende i polifenoli degli agenti promettenti nel campo della prevenzione. Le proprietà antiossidanti dei polifenoli dipendono dalla presenza nella loro struttura di gruppi ossidrilici che possono essere facilmente ossidati, producendo i corrispondenti O-chinoni (16). Questa conversione risulta in un'efficace attività *scavenger* verso le specie reattive dell'ossigeno, che restano intrappolate entro complessi chimici stabili, senza possibilità di promuovere ulteriori reazioni radicaliche (17). La cosiddetta teoria degli *scavenger* biochimici è attualmente la più accreditata per spiegare gli effetti protettivi dei polifenoli nei confronti di un'ampia gamma di malattie non trasmissibili. Tuttavia, bisogna sottolineare che, nonostante l'attività antiossidante dei polifenoli sia stata largamente indagata, i risultati dei test *in vitro* non sempre si traducono in un aumento dello status antiossidante nell'uomo. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta all'ampia variabilità dei test utilizzati *in vitro*, ma anche alla presenza di una significativa variabilità individuale (18).

Oltre all'inibizione dello stress ossidativo, i polifenoli mostrano anche un cosid-

detto effetto antiossidante indiretto, che si manifesta attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare Nrf2. Questo evento induce l'attivazione di sistemi antiossidanti endogeni e sembra essere responsabile del mantenimento del corretto bilancio ossido-riduttivo cellulare, raggiunto attraverso l'equilibrio dell'attività degli enzimi di fase I e di fase II (19, 20). L'attività antinfiammatoria è dovuta a molteplici meccanismi, la maggior parte dei quali mediati dall'inibizione del fattore di trascrizione NF- κ B, da cui deriva la riduzione della produzione cellulare di mediatori dell'infiammazione (21-23), l'inibizione dell'espressione di molecole d'adesione (24), con conseguente alterazione della chemiotassi dei monociti nei tessuti infiammati. Altri meccanismi responsabili dell'attività cardioprotettiva dei polifenoli coinvolgono il metabolismo lipidico, la cui alterazione rappresenta un fattore causale nello sviluppo dell'aterosclerosi (25). A questo proposito, un esauriente trattato sulla capacità di alimenti ricchi di polifenoli di modulare positivamente il metabolismo lipidico e lipoproteico è stato pubblicato dal nostro gruppo di ricerca (26). La riduzione di LDL-C in seguito al consumo di polifenoli è ampiamente riportata in letteratura e sembra essere legata a meccanismi epatici ed intestinali. Nel primo caso, la riduzione della sintesi di colesterolo, l'aumento dell'espressione e dell'attività dei recettori per le LDL (27) e l'aumento dell'espressione dei trasportatori di colesterolo ATP-Binding Cassette G5/ATP-Binding Cassette G8 (28) sono stati dimostrati in modelli *in vivo*. Nel secondo caso, la capacità di polifenoli come l'epigallocatechina gallato di spiazzare il colesterolo dalle micelle intestinali è stato associato ad un aumento dell'eliminazione fecale del colesterolo *in vivo* (29). L'effetto dei polifenoli sui livelli plasmatici di trigli-

ceridi è legato alla riduzione della produzione di apolipoproteina B48 e di apolipoproteina B100 nel fegato e nell'intestino, come dimostrato in soggetti obesi (30), o all'interferenza con l'espressione epatica della lipoproteina lipasi, come evidenziato in modelli sperimentali di suini (31). I meccanismi responsabili dell'aumento di HDL-C sono limitati ad evidenze *in vitro*. Tra queste, è stato riportato un aumento della sintesi di apolipoproteina A-I in colture di epatociti o cellule intestinali esposte ai polifenoli del cacao (32).

I polifenoli possono inoltre migliorare la funzione endoteliale, la cui alterazione è un noto fattore di rischio per lo sviluppo di aterosclerosi. Questa attività è stata dimostrata nell'uomo, ma bisogna segnalare come la dose efficace per aumentare la FMD fosse significativamente più alta rispetto a quella derivante da una normale assunzione dietetica (33). Il meccanismo di questo effetto probabilmente risiede nell'aumento dell'attività della NO sintasi, come suggerito da studi *in vitro* (34) e nell'uomo (35). La vasodilatazione mediata da NO, insieme all'influenza sul sistema della renina-angiotensina (36), è responsabile di un'ulteriore attività cardioprotettiva dei polifenoli: la riduzione della pressione sanguigna. È interessante sottolineare come questo effetto sia evidente anche dopo il consumo di alimenti ricchi di polifenoli (37).

Infine, i benefici cardiovascolari dei polifenoli possono essere imputabili alle peculiari proprietà farmacocinetiche menzionate in precedenza. Mentre questi composti nella maggior parte dei casi raggiungono immutati la parte distale del tratto gastrointestinale, una volta metabolizzati dal microbiota intestinale possono svolgere un'azione prebiotico-simile (38), favorendo la crescita selettiva di batteri benefici (39-41) e riducendo quella di cep-

pi dannosi (40-42). Questo effetto è stato dimostrato in studi di intervento ed in modelli *ex vivo* di fermentazione fecale, e può essere riconducibile al miglioramento dei marcatori di malattia cardiovascolare.

2.3. Meta-analisi

2.3.1. Metodi

La ricerca in letteratura è stata eseguita utilizzando i database MEDLINE ed Embase, considerando tutti i manoscritti pubblicati in lingua inglese fino al 10 novembre 2018, ed utilizzando la seguente strategia di ricerca: ((*polyphenol*) OR *flavonoids*) OR *polyphenolic compounds*) OR *isoflavone*) OR *flavanol*) OR *phytoestrogen*) OR *resveratrol*) AND *atherosclerosis*) OR *cardiovascular*) OR *cardiovascular disorder*) OR *cardiovascular health*. La ricerca è stata ripetuta aggiungendo le parole “*administration*” e “*therapy*”, utilizzando termini Mesh. Per la selezione degli studi sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione:

- 1) disegno dello studio in doppio cieco, randomizzato e controllato;
- 2) pazienti adulti (di età superiore a 18 anni);
- 3) assunzione cronica di polifenoli;
- 4) assunzione di polifenoli come integratori alimentari o composti isolati.

Pertanto, entrambi i sessi sono stati considerati idonei, così come tutti i composti polifenolici e la via di somministrazione. Inoltre, sono stati inclusi solo periodi di trattamento superiori a 2 settimane. Durante l'estrazione dei dati, sono stati analizzati i seguenti *endpoint*: HDL-C, LDL-C, hs-CRP, FMD e pressione sanguigna.

La meta-analisi dei dati estratti dagli studi inclusi è stata condotta utilizzando il software Review Manager 5.2 (Versione 5.2.4 Copenhagen: The Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2012). I dati sono stati combinati utilizzan-

do modelli a effetti casuali o fissi, in base all'eterogeneità dei dati. L'eterogeneità tra i risultati dei diversi studi è stata esaminata ispezionando la dispersione dei dati e la sovrapposizione nei loro intervalli di confidenza, ed eseguendo test del chi-quadrato e misure I^2 . Per I^2 superiore al 60%, è stato adottato un modello a effetti casuali, che fornisce una stima più conservativa dell'effetto complessivo, particolarmente utile nell'analizzare studi di diverso disegno e durata. Le differenze medie ponderate e gli intervalli di confidenza al 95% sono stati stimati per ciascun *endpoint* considerato. I valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

2.3.2. Risultati

Inizialmente, la ricerca in letteratura ha restituito un totale di 2.370.680 studi. Restringendo la ricerca ai soli studi clinici sull'uomo, sono stati selezionati 123.773 studi, ulteriormente ridotti a 305 eliminando tutti quelli che non rientravano nei criteri d'inclusione. Tra questi, 43 studi sono stati valutati per estrarre dati cardiovascolari, mentre i restanti sono stati esclusi per varie ragioni (es., assenza di *outcome* cardiovascolare o di composti polifenolici nel trattamento). Infine, sono stati ulteriormente esclusi 9 studi per indisponibilità di dati sull'*outcome*, mentre 34 studi sono stati inclusi nella meta-analisi (Tabella 1).

16 studi hanno analizzato la pressione arteriosa sistolica (SBP), valutando un totale di 1.190 soggetti (606 trattati con polifenoli e 584 con placebo). L'analisi complessiva ha mostrato una significativa riduzione della pressione sistolica dopo la somministrazione di polifenoli (differenza media -1,01, IC 95%: -2,04; 0,02, $p=0,005$). Inoltre, gli stessi studi hanno mostrato una riduzione significativa anche della pressione arteriosa diastolica in seguito

Tabella I - Caratteristiche degli studi selezionati nella meta-analisi sugli effetti cardiovascolari dei polifenoli.

Autore	Anno	Sostanza o estratto	Endpoint cardiovascolari
Arazi H.	2014	Estratto di tè verde	Pressione sanguigna
Argani H.	2016	Estratto di semi di uva rossa	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I, paraossonasi-1
Atteritano M.	2007	Genisteina	Profilo lipidico, ICAM-1, VCAM-1
Aubertin-Leheudre M.	2008	Isoflavoni	Profilo lipidico
Botden I.P.	2012	Polifenoli del vino rosso	Pressione sanguigna, Indice di augmentation aortica, Velocità dell'onda sfigmica
Brüll V.	2015	Quercetina	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, ET-1, ICAM-1, VCAM-1, hs-CRP, pressione sanguigna
Chan Y.H.	2008	Isoflavoni	hs-CRP, superossido dismutasi, FMD, pressione sanguigna
Chiva-Blanch G.	2013	Polifenoli del vino rosso	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I
Choi E.Y.	2015	Estratto di buccia di cipolla	FMD, Cellule endoteliali progenitrici
Colacurci N.	2005	Isoflavoni	ICAM1, VCAM1, E-selectina, FMD
Dower J.I.	2015	Epicatechina	Pressione sanguigna
Egert S.	2009	Quercetina	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, TNF α
Gliemann L.	2013	Resveratrolo	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, ICAM-1, VCAM-1
Hale G.	2002	Isoflavoni	FMD
Hallund J.	2006	Isoflavoni	ET-1, FMD, pressione sanguigna
Hanson L.N.	2006	Isoflavoni	hs-CRP
Hassellund S.S.	2013	Antocianine	HDL-C, LDL-C, trigliceridi
Howes J.B.	2000	Isoflavoni di trifoglio rosso	HDL-C, LDL-C, trigliceridi
Howes J.B.	2003	Isoflavoni di trifoglio rosso	Pressione sanguigna
Jayagopal V.	2002	Isoflavoni	HDL-C, LDL-C, trigliceridi
Lockyer S.	2017	Estratto di foglia di oliva ricco di fenoli	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, pressione sanguigna
Mainini G.	2013	Isoflavoni	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I, trigliceridi
Nestel P.	2007	Trans-tetraidrodaidzeina	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, pressione sanguigna
Nogueira L.P.	2017	Estratto di tè verde	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, pressione sanguigna
Panahi Y.	2015	Combinazione curcuminoide-piperina	hs-CRP
Pipe E.A.	2009	Proteine isolate dalla soia	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I, trigliceridi
Saarenhovi M.	2017	Polifenoli estratti dalla mela	FMD
Teede H.J.	2003	Biochanina	FMD, pressione sanguigna, rigidità arteriosa
Tomé-Carneiro J.	2013	Resveratrolo	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I, trigliceridi
Trautwein E.A.	2010	Flavonoidi del tè nero	HDL-C, LDL-C, trigliceridi
Valls R.M.	2016	Oligopin	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, pressione sanguigna
Verhoeven M.O.	2007	Isoflavoni	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, lipoproteine, hs-CRP
Weseler A.R.	2011	Flavanoli	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, hs-CRP
Xie L.	2017	Polifenoli dei frutti di bosco	HDL-C, LDL-C, trigliceridi

ET-1: Endotelina-1; FMD: dilatazione flusso-mediata; HDL-C: colesterolo HDL; hs-CRP: proteina C-reattiva ad alta sensibilità; ICAM: molecola di adesione cellulare intercellulare; LDL-C: colesterolo LDL; TNF- α : fattore di necrosi tumorale alfa; VCAM: molecola di adesione vascolare.

alla somministrazione di polifenoli (differenza media $-1,32$ mmHg, IC 95%: $-2,37$, $-0,27$ mmHg; $p=0,001$).

La valutazione della colesterolemia (HDL-C e LDL-C) è stata riportata in 21 studi, per un totale di 1.933 soggetti (988 trattati con polifenoli e 945 con placebo). La somministrazione di polifenoli ha aumentato significativamente i livelli sierici di HDL-C (differenza media $2,68$ mg/dL, IC 95%: $2,43$, $2,92$ mg/dL, $p<0,001$). Allo stesso modo, i livelli sierici di LDL-C erano significativamente ridotti dopo la somministrazione di polifenoli (differenza media $-4,39$ mg/dL, IC 95%: $-7,66$, $-1,11$ mg/dL, $p=0,009$).

Solo 8 studi hanno valutato la FMD, per un totale di 568 soggetti (289 trattati con polifenoli e 279 con placebo), nei quali la somministrazione di polifenoli ha indotto un aumento significativo di questo parametro di funzionalità endoteliale (differenza media $0,89\%$, IC 95%: $0,40$, $1,38\%$, $p<0,001$).

In 9 studi è stata esaminata la hs-CRP, per un totale di 611 pazienti (303 trattati con polifenoli e 308 con placebo). La somministrazione di polifenoli non ha modificato i livelli plasmatici di hs-CRP ($p<0,430$).

2.3.3. Discussione

Nel tentativo di fornire una valutazione quantitativa dell'effetto dei polifenoli sulla salute cardiovascolare, abbiamo condotto una meta-analisi dei principali parametri misurati negli studi selezionati. Poiché la nostra analisi si è focalizzata specificamente sulla supplementazione di polifenoli, tutte le dosi impiegate sono state tendenzialmente più alte di quelle raggiungibili tramite una dieta comune. Questo aspetto è particolarmente rilevante per i flavonoli, come la quercetina (>100 mg/die) (10-13) e gli isoflavoni (da 80 a 132 mg/die, Mainini 2013 e Jayagopal 2002), mentre in

alcuni casi come per le proantocianidine oligomeriche (200 mg/die (9)), le dosi impiegate rientravano nei livelli raggiungibili con la dieta (43).

Sulla base dei criteri di inclusione ed esclusione, un numero soddisfacente di studi ha contribuito all'analisi: 17 per la pressione arteriosa, 21 per i lipidi plasmatici e 8 per la funzione endoteliale e 9 per l'infiammazione sistemica. Il numero di soggetti valutati è stato da 500 a 2.000 , per ogni parametro considerato. Tuttavia è stata riscontrata un'ampia eterogeneità, legata anche alle differenze di trattamento in termini di formulazione, dose, fonte e tipo di polifenoli analizzati, discrepanze che hanno impedito la conduzione di analisi di sottogruppi. Tuttavia, l'analisi complessiva ha rivelato un effetto significativo dei polifenoli nel modulare positivamente i parametri cardiovascolari considerati. In particolare, i trattamenti hanno ridotto la pressione sistolica e, in maniera più accentuata, quella diastolica, così come i livelli plasmatici di LDL-C, e hanno incrementato HDL-C e FMD. La nostra meta-analisi non ha invece evidenziato effetti significativi su hs-CRP. Nonostante questi effetti siano significativi dal punto di vista statistico, le differenze evidenziate sono indubbiamente di modesta entità e talvolta di dubbio beneficio clinico. Per esempio, il valore assoluto di riduzione di LDL-C (differenza media $-4,39$ mg/dL) potrebbe essere d'interesse, poiché è stato dimostrato che esiste una reazione lineare tra l'abbassamento di LDL-C e la frequenza di eventi cardiovascolari maggiori (44). L'effetto sui livelli di HDL-C è invece più complesso da valutare, poiché è imputabile per circa il 95% ad un singolo studio (45) sui 21 considerati globalmente. Inoltre, secondo le più recenti evidenze derivanti sia da studi di randomizzazione mendeliana che da *trial* clinici, l'aumento

dei livelli di HDL-C in soggetti con un valore basale normale non rappresenta un approccio efficace per la riduzione del rischio cardiovascolare (46-48).

Il valore dei risultati della nostra meta-analisi è corroborato da una recente valutazione dell'appropriatezza degli *outcome* soggetti ad *health claims* per la salute cardiovascolare (49). Questo studio, in accordo con il Regolamento della Commissione Europea 1924/2006, ha fornito evidenze sulla solidità di parametri quali LDL-C e pressione sistolica per sostanziare gli *health claims* nel contesto delle malattie cardiovascolari, mentre HDL-C o trigliceridi non sono attualmente raccomandati.

3. Effetto dei polifenoli sulle funzioni cognitive

3.1 Polifenoli e funzioni cognitive nell'uomo

Grazie ai significativi progressi della medicina, negli ultimi anni si è verificato un notevole aumento della aspettativa di vita. Tuttavia, nonostante le indubbe conseguenze positive, il progressivo invecchiamento della popolazione ha determinato un aumento significativo dell'insorgenza di malattie associate all'età, tra cui le malattie neurodegenerative (50). La neurodegenerazione è una condizione comune condivisa da numerose malattie, tra le quali la sclerosi laterale amiotrofica, la malattia di Huntington, il morbo di Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD), la demenza frontotemporale ed il morbo di Parkinson (51).

L'eziologia di queste patologie è multifattoriale ed i meccanismi che sottendono alla malattia non sono ancora stati completamente chiariti. Tra i diversi fattori coinvolti si possono elencare per esempio l'infiammazione cronica e la neuroinfiammazione, la senescenza cellulare, l'instabilità del genoma e la deregolazione della

proteostasi (52, 53). Inoltre, anche fattori esogeni o l'esposizione a tossine possono concorrere ad aumentare il rischio di insorgenza di malattie neurodegenerative, determinando uno stato infiammatorio persistente e causando stress ossidativo (54, 55). Sebbene differenti in termini di manifestazioni cliniche, tutte queste malattie condividono caratteristiche e meccanismi comuni, tra cui è importante annoverare l'accumulo anomalo e l'aggregazione di peculiari proteine, diverse a seconda della malattia, che portano alla progressiva perdita di neuroni e sinapsi in specifiche regioni cerebrali (55, 56).

Da un punto di vista clinico, le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da un progressivo deterioramento della funzione cognitiva e/o motoria. Il declino cognitivo è per esempio la condizione preclinica tipica dell'AD e della demenza frontotemporale (57). Nel caso dell'AD, che rappresenta la principale causa di demenza a livello mondiale (60-80%) (58), i primi sintomi sono rappresentati da una progressiva perdita di memoria, da un declino delle funzioni cognitive e da particolari manifestazioni comportamentali, che comprendono cambiamenti del tono dell'umore e insorgenza di depressione (59). In particolare, la forma prodromica di AD è caratterizzata da un lieve deterioramento cognitivo (*mild cognitive impairment*, MCI) e da alterazioni di alcuni specifici domini cognitivi tra cui la memoria, la funzione esecutiva, l'attenzione, le abilità visuo-spaziali ed il linguaggio (60, 61). Questi soggetti hanno un rischio del 50% di progressione dei disturbi neurocognitivi a cinque anni (62). Gli attuali trattamenti per arrestare il declino cognitivo si limitano a contrastarne i sintomi e sembrano avere un impatto positivo sulle performance e sul comportamento che si manifesta tutta-

via in modo transitorio, senza intervenire realmente sulle cause della patologia. Questo attuale scenario rende prioritario lo sviluppo di strategie alternative per prevenire o rallentare la neurodegenerazione. Tra questi approcci, il ruolo della dieta come strumento preventivo nei confronti del declino cognitivo è stato oggetto di intense ricerche negli ultimi anni.

Per esempio, numerosi studi clinici osservazionali e di intervento hanno suggerito l'esistenza di una associazione tra l'assunzione di alimenti ad elevato contenuto di polifenoli, come frutti di bosco, uva, cacao e tè verde, ed un miglioramento delle funzioni cognitive (63-66). Ciò nonostante, non tutti gli studi hanno dato risultati positivi in modo univoco, lasciando aperto il dibattito sul potenziale utilizzo dei polifenoli per il mantenimento della salute cognitiva. In primo luogo, una recente meta-analisi non ha riportato alcun beneficio significativo della dieta mediterranea, il cui apporto di polifenoli corrisponde a circa 1 g/die (43), sull'incidenza del deterioramento cognitivo (67). Inoltre, una revisione sistematica degli studi sull'attività degli isoflavoni della soia ha concluso che gli effetti neuroprotettivi potrebbero essere limitati perché influenzati da diversi fattori legati alle caratteristiche individuali, al tipo di trattamento e anche fattori correlati alla pianta stessa (68). Allo stesso modo, i risultati di una meta-analisi di 21 studi clinici hanno suggerito come il trattamento con un estratto di *Ginkgo biloba* di pazienti che presentavano MCI non abbia portato a risultati convincenti sull'*endpoint* cognitivo (69). Le ragioni per spiegare queste discrepanze si possono ritrovare nei problemi di biodisponibilità precedentemente menzionati, oltre che nella variabilità interindividuale riguardante la composizione e la funzione del microbiota intestinale, che fa sì che l'assunzione degli stessi po-

lifenoli si possa tradurre in effetti diversi, a seconda delle caratteristiche di ciascun individuo (70). In sintesi, la mancanza di risultati convincenti degli studi clinici e le critiche sopra citate rendono difficile trarre una conclusione solida sull'effetto preventivo dei polifenoli sulle funzioni cognitive e sulla neurodegenerazione.

Al fine di contribuire a chiarire l'efficacia dei polifenoli sui diversi aspetti del declino cognitivo, in questo lavoro, abbiamo eseguito una meta-analisi di studi condotti sull'uomo. Nel dettaglio, ci si è focalizzati su soggetti anziani sani o affetti da MCI, per considerare l'impatto dei polifenoli sulla salute cognitiva globale, nonché l'effetto su alcuni domini specifici, tra cui la memoria e le funzioni verbali ed esecutive.

3.2. Meccanismi di neuroprotezione

È probabile che siano molteplici i meccanismi che concorrono a spiegare l'effetto dei polifenoli sulla neurodegenerazione legata all'invecchiamento (71, 72). Importanti osservazioni hanno attribuito questi benefici all'attività di *scavenging* dei radicali liberi molto nota per i polifenoli, consentendo la riduzione dello stress ossidativo e conseguentemente del danno alle cellule cerebrali. Tuttavia, come affermato precedentemente, anche nel caso della neuroprotezione, spesso i test *in vitro* hanno il limite di non riflettere sempre un'efficace capacità antiossidante nell'uomo (18). Un ulteriore meccanismo antiossidante dei polifenoli è rappresentato dall'attività chelante nei confronti dei metalli, che potrebbe impedire la reazione di produzione di specie reattive dell'ossigeno, catalizzata dai metalli stessi (16). Per esempio, è probabile che questo effetto sia responsabile, almeno parzialmente, dell'efficacia neuroprotettiva di alcuni flavonoidi (73). Evidenze recenti suggeriscono che i polifenoli, in particolare i flavonoidi, possano influen-

zare processi specifici coinvolti nell'insorgenza di malattie neurodegenerative. Tra questi, la riduzione dell'accumulo di proteine neuropatologiche (74) ed il miglioramento della plasticità sinaptica (75) sono fenomeni descritti in modelli animali di patologie neurocognitive e trattati con dosi fisiologiche di polifenoli. Inoltre, l'effetto dei polifenoli di miglioramento della funzione vascolare cerebrale, ed il conseguente aumento del flusso sanguigno cerebrale indispensabile per l'attività cognitiva, è stato ben documentato sia in soggetti giovani che di età avanzata (76, 77).

Per quanto riguarda invece lo studio dell'effetto protettivo dei polifenoli sulla neuroinfiammazione i risultati sono meno consistenti. I potenziali meccanismi antinfiammatori sono stati descritti sia in cellule gliali che neuronali esposte a concentrazioni sovralfisiologiche di flavonoidi e alcuni studi sull'uomo hanno rivelato la capacità dei flavonoidi di ridurre i livelli plasmatici di alcuni marcatori di infiammazione (78, 79). Tuttavia, il potenziale antinfiammatorio dei polifenoli rimane incerto, poiché questi effetti non sono stati confermati da altri studi (80, 81).

Inoltre, un meccanismo aggiuntivo che potrebbe spiegare l'azione neuroprotettiva dei polifenoli nell'AD è l'attività di inibizione delle colinesterasi, con conseguente potenziamento della trasmissione colinergica e miglioramento delle funzioni cognitive (82). Questo effetto è stato descritto per esempio per il resveratrolo, che ha mostrato la capacità di ridurre l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi in specifiche regioni cerebrali in modelli sperimentali di ratti diabetici, con una conseguente attenuazione della compromissione della memoria (83).

Infine, le interrelazioni precedentemente descritte tra polifenoli e microbiota potrebbero avere anche importanti implica-

zioni nel contesto della neuroprotezione. Infatti, è stato dimostrato che i metaboliti dei polifenoli di origine intestinale preven- gono l'oligomerizzazione del peptide neurotossico beta amiloide (A β), con un potenziale effetto protettivo dei disturbi neurodegenerativi in modelli animali (84).

3.3. Meta-analisi

3.3.1. Metodi

La ricerca in letteratura è stata eseguita valutando sia i *database* MEDLINE che Embase, considerando tutti i manoscritti pubblicati in lingua inglese fino al 10 novembre 2018, utilizzando la seguente strategia di ricerca: ((*polyphenol*) OR *flavonoids*) OR *polyphenolic compounds*) OR *Isoflavone*) OR *flavanol*) OR *phytoestrogen*) OR *resveratrol*) AND *neurocognitive function*) OR *cognitive function*) OR *cognition*. La ricerca in letteratura è stata ripetuta aggiungendo le parole "*administration*" e "*therapy*" utilizzando termini Mesh. Sono stati adottati gli stessi criteri di inclusione descritti sopra, per l'ambito cardiovascolare. Durante l'estrazione dei dati, sono stati considerati come *endpoint* i risultati dei seguenti test cognitivi: *Wisconsin Card Classification Test* (WCST) (85), *Reys Auditory Verbal Learning Task* (RAVLT) (86), *Trail Making test* (TMT A e B) (87), *Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale* (ADAS-Cog) (88), *Mini-Mental State Examination* (MMSE) (89) e *Wechsler Adult Intelligence Scale* (WAIS) (90). La meta-analisi dei dati estratti dagli studi inclusi è stata condotta come descritto nella Sezione 2.2.1.

3.3.2. Risultati

La ricerca in letteratura ha rilevato 293.093 documenti. Gli studi che valutavano modelli animali o cellulari sono stati esclusi e nei rimanenti 19.907 è stato valutato l'abstract. Tra questi, 61 studi hanno

soddisfatto i criteri di inclusione e sono stati ulteriormente valutati per l'estrazione dei dati. Gli *endpoint* neurocognitivi considerati per l'analisi erano disponibili in 21 studi. Questi ultimi sono stati poi inseriti nella meta-analisi (Tabella 2).

Il punteggio ADAS-Cog è stato riportato in 5 studi, per un totale di 508 pazienti trattati e 501 controlli. Gli effetti complessivi non hanno mostrato un impatto significativo dei polifenoli su ADAS-Cog ($p=0,310$). Tuttavia, l'analisi ha mostrato

Tabella 2 - Caratteristiche degli studi selezionati nella meta-analisi degli effetti neurodegenerativi dei polifenoli.

Autore	Anno	Sostanza o estratto	Endpoint neurodegenerativi
Dai C.X.	2018	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	HAMD, WCST
Anton S.D.	2017	Resveratrolo	Controlled Oral Word Association Digits Forward and Backward, Erikson-Flanker, Hopkins Verbal Learning Test-Revised, Task Switching, Trail Making Test
Evans H.M.	2017	Resveratrolo	Profile of Mood States, RAVLT, Semantic Memory Tests, Trail Making Test, Visual Spatial Working Memory
Lee J.	2016	Catechina ed epicatechina	ADAS-Cog, CIBIC-Plus, FAS, HARS, HDRS, Hopkins VLT, MMSE, Trail Making Test, WAIS-IIIWATR, WCST-64
Gleason C.E.	2015	Isoflavoni della soia	Fluency, MMSE, GDS, Labirinti, POMS, Stroop Color Word Test, Trail Making Test, Verbal Memory, Visual Memory, Visual Motor
Witte A.V.	2014	Resveratrolo	Auditory Verbal Learning Test, MRI
Gavrilova S.I.	2014	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	CAMCOG, Depression Scale, Geriatric Trail-Making Test, Inventory, MMSE, Neuropsychiatric State-Trait Anxiety Inventory
Henderson V.W.	2012	Isoflavoni della soia	Center for Epidemiological Studies Depression scale (CES-D), Neuropsychological battery, Wechsler Test of Adult Reading
Kaschel R.	2011	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	Test della memoria
Snitz B.E.	2009	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, MMSE
Gleason C.E.	2009	Isoflavoni della soia	Boston Naming test, Buschke Selective Reminding test, FAS, Grooved Pegboard, Labirinti, Stroop Color Word test (SCWT), Trail Making Test, VSL
Stough C.	2008	Estratto di <i>Bacopa monnieri</i>	CDR, RVIP
McCarney R.	2008	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, QOL-AD
Woelk H.	2007	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	CGI-C, EAAS, HAMA
Casini M.L.	2006	Isoflavoni della soia	Digit Symbol Test, HDRS, WAIS
Kreijkamp-Kaspers S.	2004	Isoflavoni della soia	MMSE, RAVLT, WAIS
Kanowski S.	2003	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, Valutazione clinica globale, MMSE
Santos R.F.	2003	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	Toulouse-Pièron Concentrated Attention, WAIS, WCST, Wechsler Memory Scale revised (WMS-R)
Woo J.	2003	<i>Pueraria lobata</i> (isoflavone)	HKLT, MMSE, SF-36, Trail making test, WAIS
Kritz-Silverstein D.	2003	Isoflavoni della soia	Category Fluency, Logical Memory e Recall, Trails A e B
Mix J.A.	2002	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	SRT, WAIS, WCST
Solomon P.R.	2002	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	CVLT, Boston Naming test, WAIS, WMS

Autore	Anno	Sostanza o estratto	Endpoint neurodegenerativi
File S.E.	2001	Isoflavoni della soia	PASAT, Stocking Cambridge Test, WMS
Mix J.A.	2000	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	MMSE, SCWT, Trail Making Test, WMS
Le Bars P.L.	2000	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, Valutazione geriatrica (GERRI) e valutazione clinica globale
Le Bars P.L.	1997	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, Valutazione geriatrica

ADAS-Cog: Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale; ADL-IS: Scala Internazionale delle Attività di Vita Quotidiana; AOT: test della soglia di audibilità; BLMD: Scala dell'umore di Bond e Lader; CAMCOG: Cambridge Cognition Examination; CANTAB: Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery; CDR: Clinical Dementia Rating Scale; CIBIC-Plus: The Clinician Interview-Based Impression of Change; CVLT: California Verbal Learning Test; DCT-G: Digit connection test-G; DMST: Delayed Matching To Sample Test; FAS: misura della fluidità fonemica della parola; GDS: Global Deterioration Scale; HADS: Hospital Anxiety and Depression Scales; HAMA: Hamilton Anxiety Rating; HDRS: Hamilton Depression Rating Scale; HKLT: Hong Kong List-Learning Test; ITVS: Test's increment threshold for visual stimuli; MMSE: Mini Mental State Examination; MRI: magnetic resonance imaging; NPI: Neuropsychiatric Inventory; PASAT: Paced Auditory Serial Addition Task; POMS: profile of mood states; QOL-AD: Quality of Life in Alzheimer's Disease; RAVLT: Rey Auditory Verbal Learning Test; RVIP: Rapid Visual Information Processing; SDS: self-rating depression scale including; SF-36: Short Form Health Survey; SIS-M: subjective intensity scale-mood; SMS: Sensorimotor synchronization test; SRT: Test della Memoria Selettiva; SWM: spatial working memory; WAIS: Wechsler Adult Intelligence Scale; WCST/WCST-64: Wisconsin Card Sorting Test/Wisconsin Card Sorting Test-64 (versione ridotta); WMS: Scala della Memoria di Weschler.

un effetto significativo di *Ginkgo biloba* su ADAS-Cog, rispetto al placebo (differenza media -2,02, IC 95% -3,79; -0,26, $p=0,020$).

Il MMSE è stato riportato in 8 studi, per un totale di 1868 pazienti trattati e 1856 controlli. Complessivamente non è emerso alcun effetto significativo dei polifenoli sull'esito di MMSE ($p=0,080$).

Per quanto riguarda il WAIS, solo tre *outcome* sono stati riportati in più di 3 studi: *Digital symbol*, *Block design* e *Digit Span*. Pertanto, solo questi 3 ambiti del test WAIS sono stati meta-analizzati. Il *Digital symbol* è stato riportato in 8 studi, per un totale di 4.032 pazienti (2.029 pazienti e 2.003 controlli), senza un effetto significativo dei polifenoli ($p=0,380$). Il *Block design*, al contrario, è stato valutato in 4 studi, per un totale di 3.389 pazienti, suggerendo una riduzione significativa ($p=0,005$), in particolare quando è stato utilizzato l'estratto di *Ginkgo biloba* (differenza media -0,43, IC 95%: -0,73; -0,13, $p=0,005$).

Il *Digit Span* è stato riportato in 5 studi per un totale di 308 pazienti e 309 controlli. L'effetto complessivo non è stato influen-

zato in modo significativo dalla somministrazione di polifenoli ($p=0,600$).

Il RAVLT è stato riportato in 3 studi, per un totale di 301 soggetti (150 trattati e 151 controlli). La somministrazione di polifenoli ha aumentato significativamente il punteggio del RAVLT - richiamo immediato (differenza media 1,63, IC 95%: 1,25; 2,00, $p<0,001$).

Il WCST è stato riportato in 4 studi per un totale di 456 pazienti. L'effetto complessivo non è stato significativamente influenzato dalla somministrazione di polifenoli ($p=0,070$).

Il test *trail making A* (TMT-A) è stato utilizzato in 7 studi, per un totale di 3473 pazienti. La somministrazione di polifenoli non ha migliorato significativamente questo punteggio ($p=0,620$). Allo stesso modo, il test *trail making B* (TMT-B) è stato utilizzato in 8 studi, per un numero totale di 3.503 soggetti (1.765 pazienti e 1.738 controlli). L'effetto complessivo dei polifenoli è stato statisticamente significativo (differenza media -1,59, IC 95%: -2,75; -0,43, $p=0,007$), probabilmente per il contributo del resveratrolo, valutato in due studi sin-

goli (differenza media -1,85, IC 95%: -3,14, -0,55, $p=0,005$).

3.3.3. Discussione

Nella meta-analisi condotta, abbiamo preso in considerazione gli effetti dei polifenoli su alcuni aspetti delle funzioni cognitive, al fine di fornire un quadro generale delle attività documentate. Come già specificato in precedenza, la nostra meta-analisi si è limitata ad includere studi di intervento che hanno utilizzato integratori alimentari contenenti polifenoli. In particolare, gli studi selezionati hanno previsto l'utilizzo di estratti ricchi di polifenoli fino ad un quantitativo massimo di 480 mg, 300 mg e 100 mg per *Ginkgo biloba*, resveratrolo e isoflavoni della soia, rispettivamente. Questi dosaggi verosimilmente forniscono una quantità di polifenoli decisamente maggiore rispetto a quella raggiungibile tramite la dieta (43).

I risultati della meta-analisi riportano come l'assunzione di polifenoli non abbia determinato miglioramenti significativi della funzione cognitiva globale, valutata tramite gli score MMSE e ADAS-Cog. L'unica eccezione a questo andamento è rappresentata dall'estratto di *Ginkgo biloba*, la cui assunzione ha determinato un miglioramento dello score ADAS-Cog, uno dei test più utilizzati per misurare l'entità del declino cognitivo e che valuta le proprietà di linguaggio e di memoria. I nostri risultati supportano l'osservazione di una precedente meta-analisi di due studi, in cui è stata osservata una tendenza non statisticamente significativa verso il miglioramento dello score del test ADAS-Cog nel gruppo di soggetti trattati con l'estratto di *Ginkgo biloba* (91). Allo stesso modo, tra i risultati dei diversi sotto-test della batteria del test WAIS, solo quello relativo al disegno con i cubi (*Block Design*), spesso identificato come un test prototipo per valutare

l'abilità visuo-percettiva, ha mostrato un miglioramento dopo trattamento con i polifenoli. Analogamente a quanto osservato per il test ADAS-Cog, anche in questo caso i risultati più significativi sono stati ottenuti con l'estratto di *Ginkgo biloba*. Va tuttavia specificato che tale risultato positivo è determinato da uno soltanto dei tre studi analizzati (92). Pertanto, questa osservazione richiede una conferma tramite ulteriori studi. In ogni caso, l'efficacia del *Ginkgo biloba* può essere attribuita alla presenza nell'estratto di diversi componenti attivi, tra cui diterpeni, ginkgolidi e un certo numero di flavonoidi (93). Queste molecole possono agire su molteplici *target* nel sistema nervoso centrale, contribuendo ad attenuare il declino cognitivo.

Analizzando in modo dettagliato l'impatto dei polifenoli su specifici domini cognitivi, è stato riscontrato un miglioramento significativo nello score del test RAVLT, che valuta l'apprendimento verbale e la memoria, nonostante il numero totale dei partecipanti allo studio fosse limitato. In particolare, i tre studi inclusi nella meta-analisi hanno valutato gli effetti degli isoflavoni della soia e del resveratrolo, riportando effetti positivi in tutti i casi. Questa osservazione è coerente con i risultati di due precedenti meta-analisi, specificamente mirate a studiare l'effetto del resveratrolo e della soia (94, 95). Tuttavia, quest'ultimo studio sugli effetti della soia ha utilizzato un punteggio unico che ha tenuto conto dei risultati di tutti i test neuropsicologici nel loro insieme, mentre nel nostro studio abbiamo valutato gli effetti sui singoli domini cognitivi. D'altra parte, i nostri risultati sul resveratrolo non sono coerenti con quelli di un'altra recente meta-analisi, in cui è stato dimostrato un impatto benefico dello stilbene sul tono dell'umore, piuttosto che sulla memoria e sulle funzioni cognitive (96). Per spiegare

queste discrepanze si possono annoverare i criteri di selezione degli studi (nel nostro caso sono stati inclusi solo pazienti anziani o con MCI) e differenze interindividuali molto elevate riguardo la biodisponibilità del resveratrolo, che possono derivare dalla sua scarsa idrosolubilità, dalla instabilità chimica e dal metabolismo epatico e intestinale (97).

Un altro *score* cognitivo che è risultato migliorato dall'integrazione con polifenoli nella meta-analisi effettuata è stato quello del test TMT-B, che valuta le funzioni esecutive, mentre nessun effetto è stato osservato sui livelli di attenzione, misurati tramite il test TMT-A. In questo caso, l'analisi è stata condotta su più di 3.000 soggetti, aspetto che rende questo risultato particolarmente rilevante da un punto di vista clinico. In questo caso il risultato positivo della meta-analisi è trainato dai dati positivi ottenuti con il resveratrolo. L'efficacia del resveratrolo che si vince dalla nostra meta-analisi è in accordo con l'effetto benefico sulle funzioni cerebrovascolari e cognitive, come dimostrato in un recente studio condotto su donne nel periodo post-menopausa (98).

Il principale limite di questa meta-analisi è legato all'elevato numero di *score* utilizzati nei vari studi per valutare l'impatto dei polifenoli sulle funzioni cognitive. L'analisi dell'effetto sui singoli *score*, ciascuno dei quali riflette un particolare aspetto del dominio cognitivo, ci ha costretto a restringere l'analisi ad un numero limitato di studi rispetto a quelli disponibili in letteratura. Per ovviare a questa critica, così come si verifica in ambito cardiovascolare, è necessario individuare quali tra i *marker* risultino più solidi nella misurazione del miglioramento neurocognitivo, anche al fine di ottemperare alle richieste dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), per gli *health claims* degli

alimenti. A questo proposito manca una precisa indicazione di quale test psicologico sia più appropriato per la valutazione delle funzioni del sistema nervoso centrale (99). Tuttavia, un progetto tuttora in corso mira proprio a rispondere a questa domanda nel contesto della salute neurocognitiva (49).

D'altra parte invece, un punto di forza del nostro lavoro è la selezione rigorosa dei soggetti, che ha escluso pazienti già affetti da demenza, al fine di evidenziare in modo specifico alcuni potenziali effetti positivi dei polifenoli nella prevenzione del declino cognitivo.

In conclusione, i risultati di questa meta-analisi suggeriscono che l'integrazione con polifenoli potrebbe migliorare alcuni indicatori specifici dello stato cognitivo nell'uomo. Inoltre, tra tutti i composti, lo stilbene resveratrolo sembra essere il più attivo. Nel caso dell'estratto di *Ginkgo biloba*, i benefici riportati potrebbero essere attribuiti all'intero fitocomplesso, dove è probabile che sia composti polifenolici che non polifenolici giochino un ruolo attivo.

Considerate le differenze tra gli studi in termini di caratteristiche dei pazienti ed il numero limitato di quelli analizzati, nonché l'incoerenza dei dati di letteratura, si rendono necessarie ulteriori ricerche per verificare se l'assunzione a lungo termine di polifenoli, singolarmente o come miscela, possa rappresentare una promettente strategia per la prevenzione del declino cognitivo nelle malattie legate all'invecchiamento.

4. Discussione

La valutazione globale e obiettiva degli effetti dei polifenoli sulla salute umana presenta diversi punti critici. Uno di questi è l'esistenza di quasi 10.000 polifenoli

con strutture e ruoli fisiologici peculiari, il che rende difficile la comprensione dei loro effetti a breve e lungo termine. Un secondo punto critico riguarda il ruolo recentemente ben delineato del microbiota intestinale nel metabolismo dei polifenoli, che giustifica l'esistenza di differenti metabotipi, i quali possono influenzare in modo differente le funzioni fisiologiche, determinando ampie differenze inter-individuali nella risposta biologica. La terza criticità è legata al fatto che è difficile comparare i dati provenienti da studi osservazionali/epidemiologici con quelli che derivano da *trial* di intervento. Mentre nel primo caso possiamo assumere che l'effetto globale sia il risultato dell'interazione sinergica di più componenti della dieta, nel secondo caso, pur limitando l'interferenza di potenziali fattori confondenti, possiamo andare incontro a scarsa aderenza alla vita reale, dove i polifenoli sono assunti in piccole quantità nell'arco di tutta l'esistenza.

Come suggerito da Mena nel suo recente studio, la ricerca sui polifenoli richiede al più presto un approccio sperimentale rigoroso per svelare il loro potenziale preventivo sullo sviluppo delle malattie (100). Sulla base di questo, la valutazione della quantità di polifenoli effettivamente consumata, degli effettivi metaboliti circolanti, della variabilità inter-individuale e dei *target* cellulari, deve diventare un aspetto cardine da considerarsi in ogni studio. Non appena queste linee guida saranno accettate da tutti i ricercatori, i dati raccolti nel campo dei polifenoli e della salute umana saranno più realistici.

Nella presente revisione, abbiamo valutato criticamente e meta-analizzato solo studi di intervento nei quali era previsto l'utilizzo di integratori alimentari contenenti polifenoli, raccogliendo informazioni promettenti, ma non definitive, sugli effetti

preventivi di alcuni polifenoli nei confronti delle malattie cardiovascolari e del declino cognitivo.

Siamo consapevoli dei limiti di questo studio: la selezione di sperimentazioni che prevedono l'assunzione di integratori alimentari da parte dei soggetti in studio non consente di tener conto dei benefici per la salute derivanti da una dieta naturalmente arricchita di polifenoli, in cui possono comparire gli effetti sinergici di diversi componenti. Analogamente, il consumo di singoli composti polifenolici non può produrre gli stessi benefici osservati negli studi epidemiologici. In più, i dati provenienti da studi sugli integratori alimentari, nei quali l'assunzione di polifenoli è superiore al normale consumo, non possono essere ritenuti realistici in termini di interazione con farmaci o altri componenti della dieta. Inoltre, quando i polifenoli sono assunti sotto forma di formulazioni, dovrebbero essere considerati come nutraceutici ed essere sottoposti ad adeguate analisi di sicurezza alla stregua dei farmaci, specialmente se la loro biodisponibilità e attività biologica vengono incrementate.

5. Conclusioni

Sebbene la maggior parte degli integratori a base di polifenoli presenti sul mercato abbia dimostrato di avere effetti benefici sulla salute basandosi solo su dati *in vitro*, la quantità e la qualità di studi clinici randomizzati condotti in modo rigoroso è notevolmente aumentata negli ultimi anni. Tuttavia, gli effetti a lungo termine devono ancora essere chiariti e gli studi con *endpoint* clinici robusti sono ancora carenti. Per svelare il potenziale ruolo preventivo dei polifenoli nella vita reale sono necessari *in primis* studi volti a caratterizzare la loro farmacocinetica e sicurezza.

Glossario

Alimenti funzionali: alimenti arricchiti, naturalmente o artificialmente, di sostanze aventi funzioni salutistiche al di là delle proprietà nutrizionali.

Alzheimer's Disease Assessment Scale- subscale Cognitive (ADAS-Cog): è un test neuropsicologico utilizzato soprattutto negli studi clinici e costituito da 9 prove che valutano specifiche caratteristiche di efficienza cognitiva sensibili al processo di deterioramento.

Beta amiloide: proteina responsabile della formazione di aggregati insolubili e tossici che si accumulano nelle placche cerebrali tipiche dei soggetti affetti da malattia di Alzheimer.

Dilatazione flusso-mediata (FMD): è definita come la variazione percentuale del diametro dell'arteria brachiale a seguito di iperemia reattiva, indotta tipicamente da un arresto circolatorio di cinque minuti causato dal rigonfiamento del manicotto di uno sfigmomanometro posto in posizione distale rispetto all'arteria, con conseguente rilascio di NO.

Dimetilarginina asimmetrica: biomarcatore di malattia cardiovascolare, i cui livelli sono associati ad eventi acuti e morte. Inibisce la produzione di ossido nitrico, ostacolando di conseguenza la normale omeostasi vascolare.

Endotelina-1: peptide secreto dalle cellule endoteliali e dai macrofagi attivati, dotato di una potente attività vasoconstrictrice. I suoi livelli correlano positivamente con la malattia cardiovascolare.

Fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α): citochina proinfiammatoria, secreta principalmente dai macrofagi, ma anche da altre cellule del sistema immunitario. Svolge un ruolo promuovente la formazione della placca aterosclerotica.

Fitocomplesso: insieme dei costituenti chimici di una pianta, che includono sia i principi attivi che molecole ad attività minore e che concorrono, con ruoli diversi, all'attività biologica della pianta stessa.

Homeostasis Model Assessment-Adiponectin (HOMA-AD): È una versione modificata del tradizionale indice HOMA-IR (vedi sotto), che stima l'insulino-resistenza considerando anche i livelli sierici di adiponectina, aggiungendo quindi una misura indiretta di adiposopatia.

Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR): è un indice che valuta la condizione di insulino resistenza e si calcola con un modello matematico che mette in rapporto le concentrazioni nel sangue di glucosio ed insulina a digiuno.

Interleuchina-1 beta: citochina proinfiammatoria, secreta principalmente dai macrofagi e dalle cellule endoteliali. Come il TNF- α contribuisce allo stato infiammatorio che favorisce l'aterogenesi. Lo studio CANTOS ha dimostrato per la prima volta che la strategia anti-infiammatoria, perseguita tramite anticorpi anti- interleuchina-1 beta, può avere implicazioni cliniche favorevoli nella malattia cardiovascolare.

Metabotipo: è il fenotipo metabolico di un individuo o di una popolazione nel quale sono integrate caratteristiche genetiche e ambientali (dieta, stile di vita, attività microbionica intestinale), e attualmente rappresenta il fondamento della medicina personalizzata. La classificazione degli individui in sottogruppi in base al loro profilo metabolico è definita come metabotipizzazione e questo approccio è stato impiegato per identificare con successo la risposta differenziale agli interventi dietetici.

Meta-analisi: strumento di ricerca il cui scopo è quello di riassumere i dati provenienti da più trial di uno stesso trattamento in un unico risultato cumulativo.

Mild cognitive impairment (MCI): disturbo cognitivo lieve che si manifesta con deficit di memoria, che può coinvolgere seppure in misura minore altre funzioni cognitive, quali il linguaggio, le abilità visuo-spaziali, le funzioni esecutive, le capacità di ragionamento, senza tuttavia interferire significativamente con le attività giornaliere. Tale condizione può progredire verso una probabile malattia di Alzheimer con un tasso di circa il 10% al 15% per anno.

Mini-Mental State Examination (MMSE): è il test neuropsicologico più utilizzato in ambito clinico, costituito da trenta domande, che fanno riferimento a sette aree cognitive differenti, per la valutazione della presenza di deterioramento cognitivo.

Molecole di adesione vascolare: solubile intercellular/vascular cell adhesion molecole 1 (sICAM-1/sVCAM-1). Sono molecole di adesione espresse dalle cellule endoteliali attivate nelle fasi precoci dell'aterogenesi e costituiscono dei biomarcatori di infiammazione, correlati al rischio cardiovascolare.

Nutraceutici: il termine si applica a preparazioni di origine vegetale o animale, che oltre per la nutrizione sono utilizzati anche a scopo preventivo o terapeutico.

Polifenoli: costituiscono una ampia ed eterogenea famiglia di circa 10.000 molecole largamente presenti nel regno vegetale. Tra le molecole di cui si è maggiormente studiata la bioattività ricordiamo la quercetina, appartenente alla classe dei flavonoidi, il resveratrolo, uno stilbene, e le catechine.

Proteina C reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP): la PCR è una proteina infiammatoria di fase acuta. Attraverso la misurazione della hs-PCR si determinano con accuratezza concentrazioni estremamente basse della proteina, indice di un basso grado di infiammazione, che è riconosciuto essere associato al rischio di sviluppare una patologia cardiovascolare.

Rey's auditory verbal learning task (RAVLT): è un test costituito da 7 prove per la valutazione della memoria a breve e a lungo termine tramite la misura della capacità di rievocazione immediata e differita.

Trail-making test (TMT): è un test neuropsicologico per la valutazione di deficit cognitivo, che prende in esame l'attenzione visiva e le funzioni esecutive. Il TMT richiede di unire in ordine crescente con una linea venticinque numeri cerchiati disposti casualmente su di un foglio (TMT-A) e di ordinare venticinque numeri e venticinque lettere cerchiati in ordine crescente e alternato (TNT-B), nel minore tempo possibile.

Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS): è costituito da una batteria di 15 test che valutano le performance mentali, per arrivare non solo a determinare numericamente il quoziente intellettivo dell'individuo, ma per analizzarne il funzionamento dal punto di vista cognitivo.

RIASSUNTO

Numerosi studi hanno dimostrato come un'alimentazione ricca di polifenoli possa avere effetti benefici sullo sviluppo di patologie degenerative, quali l'aterosclerosi e malattie che affliggono il sistema nervoso centrale. Questa attività benefica dei polifenoli è stata associata non solo alle loro proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie, ma anche a meccanismi aggiuntivi quali la capacità di modulare il metabolismo lipidico e la funzionalità del microbiota intestinale. Tuttavia, studi a lungo termine sull'uomo hanno prodotto risultati controversi, rendendo incerta la predizione dell'impatto dei polifenoli sulla salute. Lo scopo di questa revisione è fornire una panoramica e un'analisi critica della letteratura relativa agli effetti dei principali polifenoli di origine alimentare sulle patologie cardiovascolari e neurodegenerative. La meta-analisi che abbiamo condotto, includendo studi clinici randomizzati controllati su soggetti che avevano assunto integratori a base di polifenoli, ha rivelato che, sebbene alcuni polifenoli possano avere un impatto positivo su determinati marker specifici del rischio cardiovascolare e dello stato cognitivo, in letteratura sono presenti molti dati incoerenti. Pertanto, indicazioni precise riguardanti l'utilizzo di queste sostanze per la prevenzione delle malattie cardiovascolari e del declino cognitivo non sono attualmente disponibili. Una volta chiariti alcuni aspetti fondamentali quali la biodisponibilità dei polifenoli e la caratterizzazione della farmacocinetica e della sicurezza delle formulazioni che li contengono, sarà possibile avere un quadro più chiaro del reale potenziale dei polifenoli per la prevenzione delle malattie.

Parole chiave: *Polifenoli, prevenzione, malattia cardiovascolare, malattia neurodegenerativa, meta-analisi.*

Bibliografia

1. Tresserra-Rimbau A, Lamuela-Raventos RM, Moreno JJ. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research, *Biochem. Pharmacol.* 2018; 156: 186-195.
2. Visioli F, Davalos A. Polyphenols and Cardiovascular Disease: A Critical Summary of the Evidence. *Mini-Reviews Med. Chem.* 2012; 11: 1186-1190.
3. Tomé-Carneiro J, Visioli F. Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine.* 2016; 23: 1145-1174.
4. Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015.
5. Dicker D, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality and life expectancy, 1950-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018; 392: 1684-1735.
6. World Health Organization. World Health Statistics 2018: Monitoring Health for the SDGs Sustainable Development Goals. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2018.
7. Mahabir S, Pathak YV. Nutraceuticals and health: Review of human evidence. *Nutraceuticals and Health: Review of Human Evidence.* 2016; 1-366.
8. Liperoti R, Vetrano DL, Bernabei R, G. Onder. Herbal Medications in Cardiovascular Medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017; 69: 1188-1199.
9. Argani H, Ghorbanihaghjo A, Vatankhahan H, et al. The effect of red grape seed extract on serum paraoxonase activity in patients with mild to moderate hyperlipidemia. *Sao Paulo Med. J.* 2016; 134: 234-239.
10. Brüll V, et al. Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: A randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br. J. Nutr.* 2015; 114: 1263-1277.
11. Brüll V, et al. No effects of quercetin from onion skin extract on serum leptin and adiponectin concentrations in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: a randomized double-blinded, placebo-controlled crossover trial. *Eur. J. Nutr.* 2017; 56: 2265-2275.
12. Choi EY, et al. Effect of onion peel extract on endothelial function and endothelial progenitor cells in overweight and obese individuals. *Nutrition.* 2015; 31: 1131-1135.
13. Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, et al. Supplementation of the pure flavonoids epicatechin and quercetin affects some biomarkers of endothelial dysfunction and inflammation in (pre)hypertensive adults: A randomized double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J. Nutr.* 2015; 145: 1459-1463.
14. Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, et al. Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2015; 101: 914-921.
15. Koenig W. Inflammation revisited: Atherosclerosis in the post-CANTOS era. *Eur. Cardiol. Rev.* 2017; 12: 89-91.
16. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* 2010; 31: 435-445.
17. Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* 2003; 41: 753-758.
18. Granato D, et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chem.* 2018; 264: 471-475.
19. Iranshahy M, Iranshahi M, Abtahi SR, Karimi G. The role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in hepatoprotective activity of natural products: A review. *Food Chem. Toxicol.* 2018; 120: 261-276.
20. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 72: 1439-1452.
21. Callcott ET, Thompson K, Oli P, et al. Coloured rice-derived polyphenols reduce lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines ex vivo. *Food Funct.* 2018; 9: 5169-5175.
22. Yu W, Tao M, Zhao Y, et al. 4'-methoxyresveratrol alleviated AGE-induced inflammation via RAGE-mediated NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway. *Molecules.* 2018; 23.
23. Vitale M, et al. Polyphenol intake and cardiovascular risk factors in a population with type 2 diabetes: The TOSCA.IT study. *Clin. Nutr.* 2017; 36: 1686-1692.
24. Medina-Remón A, et al. Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2017; 83: 114-128.
25. Hurtubise J, McLellan K, Durr K, et al. The different facets of dyslipidemia and hyperten-

- sion in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2016; 18.
- 26 Zanotti I, Dall'Asta M, Mena P, et al. Atheroprotective effects of (poly) phenols: A focus on cell cholesterol metabolism. *Food Funct.* 2015; 6: 13-31.
 - 27 Sae-Tan S, Grove KA, Lambert JD. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. *Pharmacol. Res.* 2011; 64: 146-15.
 - 28 Hirsova P, et al. Epigallocatechin gallate enhances biliary cholesterol secretion in healthy rats and lowers plasma and liver cholesterol in ethinylestradiol-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2012; 691: 38-45.
 - 29 Kobayashi M, et al. Epigallocatechin gallate decreases the micellar solubility of cholesterol via specific interaction with phosphatidylcholine. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62: 2881-2890.
 - 30 Dash S, Xiao C, Morgantini C, et al. High-dose resveratrol treatment for 2 weeks inhibits intestinal and hepatic lipoprotein production in overweight/obese men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013; 33: 2895-2901.
 - 31 Azorín-Ortuño M, et al. Effects of long-term consumption of low doses of resveratrol on diet-induced mild hypercholesterolemia in pigs: A transcriptomic approach to disease prevention. *J. Nutr. Biochem.* 2012; 23: 829-837.
 - 32 Yasuda A, Natsume M, Osakabe N, et al. Cacao polyphenols influence the regulation of apolipoprotein in hepg2 and caco2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 1470-1476.
 - 33 Balzer J, et al. Sustained Benefits in Vascular Function Through Flavanol-Containing Cocoa in Medicated Diabetic Patients. A Double-Masked, Randomized, Controlled Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 51: 2141-2149.
 - 34 Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation.* 2002; 106: 1614-1617.
 - 35 Fisher NDL, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J. Hypertens.* 2003; 21: 2281-2286.
 - 36 Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett.* 2003; 555: 597-600.
 - 37 Taubert D. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide. *South. Med. J.* 2008; 101: 49-60.
 - 38 Muñoz-gonzález BI, Cueva C, Jiménez-girón A et al. A Survey of Modulation. *Biomed Res. Int.* 7: 1-9.
 - 39 Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, et al. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases Bifidobacteria in the human gut. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 12815-12820.
 - 40 Muñoz-gonzález I, Cueva C, Jiménez-girón A, et al. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015.
 - 41 Moreno-Indias I, et al. Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food Funct.* 2016; 7: 1775-1787.
 - 42 Cheng H, Jenner AM, Seng C, Kun Y. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* 2006; 157: 876-884.
 - 43 Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Med. Food.* 2000; 121-125.
 - 44 Cannon CP, et al. Ezetimibe added to statin therapy after acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372: 2387-2397.
 - 45 Atteritano M, et al. Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic, postmenopausal women: A two-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 3068-3075.
 - 46 Kawashiri M, Tada H, Nomura A, Yamagishi M. Mendelian randomization: Its impact on cardiovascular disease. *J. Cardiol.* 2018; 72: 307-313.
 - 47 Tall AR. Plasma high density lipoproteins: Therapeutic targeting and links to atherogenic inflammation. *Atherosclerosis.* 2018; 276: 39-43.
 - 48 Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: Two prospective cohort studies. *Eur. Heart J.* 2017; 38: 2478-2486.
 - 49 Martini D, et al. Claimed effects, outcome variables and methods of measurement for health claims proposed under European Community Regulation 1924/2006 in the framework of protection against oxidative damage and cardiovascular health. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2017; 27: 473-503.
 - 50 Jaul E, Barron J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Front. Public Heal.* 2017; 5: 1-7.
 - 51 Chung CG, Lee H, Lee SB. Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018; 75: 3159-3180.
 - 52 Franceschi C, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing Dev.* 2007; 128: 92-105.

53. Niranjana R. Recent advances in the mechanisms of neuroinflammation and their roles in neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 2018; 120: 13-20.
54. Cristani M, Speciale A, Saija A, et al. Circulating Advanced Oxidation Protein Products as Oxidative Stress Biomarkers and Progression Mediators in Pathological Conditions Related to Inflammation and Immune Dysregulation. *Curr. Med. Chem.* 2016; 23: 3862-3882.
55. Daniele S, Giacomelli C, Martini C. Brain ageing and neurodegenerative disease: The role of cellular waste management. *Biochem. Pharmacol.* 2018; 158: 207-216.
56. Gan L, Cookson MR, Petrucelli L, La Spada AR. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nat. Neurosci.* 2018; 21: 1300-1309.
57. Katsuno M, Sahashi K, Iguchi Y, Hashizume A. Preclinical progression of neurodegenerative diseases. *Nagoya J. Med. Sci.* 2018; 80: 289-298.
58. Gaugler J, James B, Johnson T, et al. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2016; 12: 459-509.
59. Bature F, Guinn BA, Pang D, Y. Pappas. Signs and symptoms preceding the diagnosis of Alzheimer's disease: A systematic scoping review of literature from 1937 to 2016. *BMJ Open.* 2017; 7.
60. Janoutová J, Šerý O, Hosák L, Janout V. Is mild cognitive impairment a precursor of Alzheimer's disease? Short review. *Cent. Eur. J. Public Health.* 2015; 23: 365-367.
61. Hadjichrysanthou C, McRae-McKee K, Evans S, et al. Potential factors associated with cognitive improvement of individuals diagnosed with mild cognitive impairment or dementia in longitudinal studies. *J. Alzheimer's Dis.* 2018; 66: 587-600.
62. Espinosa A, et al. A longitudinal follow-up of 550 mild cognitive impairment patients: Evidence for large conversion to dementia rates and detection of major risk factors involved. *J. Alzheimer's Dis.* 2013; 34: 769-780.
63. Cicero AFG, Fogacci F, Banach M. Botanicals and phytochemicals active on cognitive decline: The clinical evidence. *Pharmacol. Res.* 2018; 130: 204-212.
64. Haller S, Montandon ML, Rodriguez C, et al. Impact of coffee, wine, and chocolate consumption on cognitive outcome and MRI parameters in old age. *Nutrients.* 2018; 10: 1-13.
65. Pervin M, Unno K, Ohishi T, et al. Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2018; 23: 1-17.
66. Bell L, Lamport DJ, Butler LT, Williams CM. A review of the cognitive effects observed in humans following acute supplementation with flavonoids, and their associated mechanisms of action. *Nutrients.* 2015; 7: 10290-10306.
67. Radd-Vagenas S, Duffy SL, Naismith SL, et al. Effect of the Mediterranean diet on cognition and brain morphology and function: A systematic review of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 2018; 107: 389-404.
68. Roozbeh M, Kashef N, Ghazanfarpour R, et al. Overview of the Effect of Herbal Medicines and Isoflavones on the Treatment of Cognitive Function. *J. Menopausal Med.* 2018; 24: 113-118.
69. Yang G, Wang Y, Sun J, et al. *Ginkgo biloba* for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015; 16: 520-528.
70. Filosa S, Di Meo F, Crispi S. Polyphenols-gut microbiota interplay and brain neuromodulation. *Neural Regen. Res.* 2018; 13: 2055-2059.
71. Flanagan E, Müller M, Hornberger M, Vauzour D. Impact of Flavonoids on Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Age-Related Cognitive Decline and Neurodegeneration. *Curr. Nutr. Rep.* 2018; 7: 49-57.
72. Espargaró A, et al. Combined *in vitro* Cell-Based/*in Silico* Screening of Naturally Occurring Flavonoids and Phenolic Compounds as Potential Anti-Alzheimer Drugs. *J. Nat. Prod.* 2017; 80: 278-289.
73. Amit T, Avramovich-Tirosh Y, Youdim MBH, Mandel S. Targeting multiple Alzheimer's disease etiologies with multimodal neuroprotective and neurorestorative iron chelators. *FASEB J.* 2008; 22: 1296-1305.
74. Rezaei-Zadeh K, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces β -amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res.* 2008; 1214: 177-187.
75. Li Q, et al. Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing A β 1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience.* 2009; 163: 741-749.
76. Francis ST, Head K, Morris PG, Macdonald IA. The effect of flavanol-rich cocoa on the fMRI response to a cognitive task in healthy young people. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2006; 47: (Suppl. 2): 215-220.
77. Sorond FA, Hurwitz S, Salat DH, et al. Neurovascular coupling, cerebral white matter integrity, and response to cocoa in older people. *Neurology.* 2013; 81: 904-909.

78. Ock KC, Chung SJ, Claycombe KJ, Song WO. Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in U.S. adults. *J. Nutr.* 2008; 138: 753-760.
79. Karlsen A, et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J. Nutr.* 2007; 137: 1951-1954.
80. Freese R, Vaarala O, Turpeinen AM, Mutanen M. No difference in platelet activation of inflammation markers after diets rich of poor in vegetables, berries and apple in healthy subjects. *Eur. J. Nutr.* 2004; 43: 175-182.
81. Widlansky ME, et al. Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005; 38: 499-506.
82. Jabir NR, Khan FR, Tabrez S. Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 2018; 24: 753-762.
83. Schmatz R, et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2009; 610: 42-48.
84. Wang D, et al. Role of intestinal microbiota in the generation of polyphenol-derived phenolic acid mediated attenuation of Alzheimer's disease -amyloid oligomerization. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015; 59: 1025-1040.
85. Heaton RKK, et al. Wisconsin Card Sorting Test Manual: Revised and expanded. *Psychological Reports.* 1993; 76: 623-626 (Online).
86. Auditory SM, Test VL. Auditory and Verbal Learning Test: A Handbook; Western Psychological Services: Los Angeles, CA, USA, 1996.
87. Sánchez-Cubillo I, et al. Construct validity of the Trail Making Test: Role of task-switching, working memory, inhibition/interference control, and visuomotor abilities. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2009; 15: 438450.
88. Rosen WG, Mohs RC, Davis KL. A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry.* 1984; 141: 1356-1364.
89. Folstein PR, Folstein MF, McHugh SE. Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975; 12: 189-198.
90. Wechsler D, WAIS-III: Administration and scoring manual: adult intelligence scale. Psychological Corporation. 1997.
91. Hashiguchi M, Ohta Y, Shimizu M, et al. Meta-analysis of the efficacy and safety of *Ginkgo biloba* extract for the treatment of dementia. *J. Pharm. Heal. Care Sci.* 2015; 1.
92. Santos RF, Galduróz JCF, Barbieri A, et al. Cognitive performance, SPECT, and blood viscosity in elderly non-demented people using *Ginkgo biloba*. *Pharmacopsychiatry.* 2003; 36: 127-133.
93. Ude C, Schubert-Zsilavecz M, Wurglics M. *Ginkgo biloba* extracts: A review of the pharmacokinetics of the active ingredients. *Clin. Pharmacokinet.* 2013; 52: 727-749.
94. Marx W, et al. Effect of resveratrol supplementation on cognitive performance and mood in adults: A systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr. Rev.* 2018; 76: 432-443.
95. Cheng PF, et al. Do soy isoflavones improve cognitive function in postmenopausal women? A meta-analysis. *Menopause.* 2015; 22: 198-206.
96. Farzaei MH, Rahimi R, Nikfar S, Abdollahi M. Effect of resveratrol on cognitive and memory performance and mood: A meta-analysis of 225 patients. *Pharmacol. Res.* 2018; 128: 338-344.
97. Wang P, Sang S. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors.* 2018; 44: 16-25.
98. Evans HM, Howe PRC, Wong RHX. Effects of resveratrol on cognitive performance, mood and cerebrovascular function in post-menopausal women; a 14-week randomised placebo-controlled intervention trial. *Nutrients.* 2017; 9.
99. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Guidance on the scientific requirements for health claims related to functions of the nervous system, including psychological functions. *EFSA J.* 2012; 10: 1-13,
100. Mena P, Del Rio D. Gold Standards for Realistic (Poly)phenol Research. *J. Agric. Food Chem.* 2018; 66: 8221-8223.