



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA, SCIENZE  
DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Dottorato di Ricerca in MEDICINA E SANITÀ PUBBLICA

Curriculum: Medicina interna, scienze dell'invecchiamento e  
nutraceutica – XXXIV ciclo

Titolo della tesi

***“EFFETTI DI UNA MISCELA DI SOSTANZE ANTIOSSIDANTI SULLE  
CAPACITA' COGNITIVE E SUL BENESSERE: BACOPA, LICOPENE,  
ASTAXANTINA, VITAMINA B12.  
LO STUDIO BLAtwelve.”***

SSD - *MEDICINA INTERNA*

Dottorando

*Francesca Crosta*

Coordinatore del corso

Prof. Claudio Ferri

Tutor

Prof. Giovambattista Desideri

*“Alle mie figlie, Anna e Linda”*

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Partecipanti</b>	
<b>3.2 Disegno dello studio</b>	
<b>3.3 Trattamento dei pazienti arruolati</b>	
<b>3.4 Endpoints dello studio</b>	
<b>3.5 Misurazione della pressione arteriosa</b>	
<b>3.6 Analisi di laboratorio</b>	
<b>4. ANALISI STATISTICA.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Calcolo del campione</b>	
<b>4.2 Analisi di efficacia</b>	
<b>4.3 Analisi esplorative</b>	
<b>4.4 Analisi di sicurezza</b>	
<b>5. RISULTATI.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Caratteristiche della popolazione in studio</b>	
<b>5.2 Endpoints primari</b>	
<b>5.3 Endpoints secondari</b>	
<b>5.4 Risultati di sicurezza</b>	
<b>5.5 Aderenza al protocollo di studio</b>	
<b>6. DISCUSSIONE.....</b>	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSIONI.....</b>	<b>48</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>50</b>

## **BREVE SINTESI**

Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha rivolto un crescente interesse alle sostanze antiossidanti, potenzialmente utili nella prevenzione dell'insorgenza e della progressione del deterioramento cognitivo.

Il nostro studio randomizzato, controllato, in doppio cieco, a due bracci, ha valutato gli effetti del consumo giornaliero di una miscela di sostanze antiossidanti sulle funzioni cognitive di anziani sani.

Dopo una settimana di run-in, 80 soggetti di età pari o superiore a 60 anni e senza evidenza di disfunzione cognitiva sono stati assegnati casualmente o a un mix di quattro composti bioattivi (bacopa, licopene, astaxantina e vitamina B12) o a placebo, assunto per via orale una volta al giorno per 8 settimane.

L'obiettivo primario dello studio è stato quello di valutare i cambiamenti nei punteggi del Trail-Making Test (TMT) dal basale fino a 8 settimane dall'inizio del trattamento, analizzato nel seguente ordine gerarchico: TMT-B, TMT-A e TMT-B meno TMT-A.

Il punteggio del TMT-B è aumentato nel gruppo di controllo (+3,46 secondi) e diminuito nel gruppo attivo (-17,63 secondi). La

differenza di trattamento è stata di  $-21,01$  secondi a favore del gruppo attivo (IC 95% da  $-26,80$  a  $-15,2$  secondi,  $p < 0,0001$ ).

La diminuzione del TMT-A è stata significativamente più alta nel gruppo attivo ( $-6,86$  secondi) rispetto al gruppo di controllo ( $-0,37$  secondi).

Il TMT-B meno il TMT-A è aumentato nel gruppo di controllo ( $+3,84$  secondi) ed è diminuito nel gruppo attivo ( $-10,46$  s). Anche l'aumento del punteggio nel test di fluenza verbale per lettera (VFT) è stato significativamente più alto nel gruppo attivo con raggiungimento della significatività statistica ( $+5,28$  vs  $+1,07$  parole;  $p < 0,001$ ).

I nostri risultati dimostrano come l'integrazione alimentare regolare con bacopa, licopene, astaxantina e vitamina B12 possa rappresentare un approccio dietetico efficace al fine di contrastare l'insorgenza di disfunzioni cognitive associate all'invecchiamento cerebrale.

## 1. INTRODUZIONE

Lo stress ossidativo a lungo termine è considerato uno dei principali fattori che favorisce il declino delle funzioni cognitive, che spesso si osserva con l'invecchiamento [1].

Lo stress ossidativo, secondario alla generazione di un'elevata quantità di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) derivante da normali processi metabolici, viene normalmente contrastato da sistemi antiossidanti endogeni.

Secondo la teoria dei radicali liberi, introdotta per la prima volta nel 1956 da Denham Harman, l'invecchiamento può essere considerato come un progressivo ed inevitabile processo parzialmente correlato all'accumulo di danno ossidativo a livello biomolecolare.

In accordo con questa teoria, il danno ossidativo è dovuto ad una perturbazione cellulare secondaria ad un disequilibrio tra sistema pro-ossidante ed antiossidante a favore del primo.

I radicali liberi sono specie chimiche altamente reattive in virtù della presenza di un elettrone spaiato; questa peculiarità chimica conferisce loro un'elevata instabilità e, di conseguenza, la loro capacità di reagire rapidamente con altre molecole al fine di raggiungere un livello maggiore di stabilità.

Il radicale libero, infatti, durante la sua breve vita, è spinto a catturare un atomo di idrogeno da altre molecole determinando una reazione a catena che finisce per alterare irreversibilmente la struttura chimica delle componenti cellulari con cui viene a contatto.

La maggior parte dei radicali liberi che danneggia i sistemi biologici è rappresentata dai radicali liberi dell'ossigeno, generalmente conosciuti come “specie reattive dell'ossigeno” o ROS.

È stato osservato che le ROS possono avere sia un effetto benefico che dannoso; gli effetti benefici, che si esplicano a livelli di concentrazione bassi, includono, per esempio, la difesa contro gli agenti infettivi e funzioni relative al meccanismo di segnalazione cellulare. Al contrario, ad alte concentrazioni, le ROS possono indurre un danno a carico di strutture cellulari tra cui lipidi di membrana, proteine e acidi nucleici, innescando così una condizione di “stress ossidativo”.

Il principale bersaglio delle ROS è rappresentato dalla componente fosfolipidica delle membrane e nello specifico gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), i quali subiscono un processo a catena noto come perossidazione lipidica, che comporta la loro trasformazione in idroperossidi lipidici e composti aldeidici secondari, come il 4-

idrossinonale (4HNE), la malondialdeide (MDA) e il 2-propenale (acroleina).

Altri markers di perossidazione lipidica sono rappresentati dagli isoprostani, che includono gli F2-isoprostani (F2-isoPs) e gli F4-neuroprostani.

Le conseguenze della perossidazione lipidica comprendono:

- la perdita di grassi polinsaturi con conseguente diminuzione della fluidità di membrana ed alterazione della sua permeabilità;
- la modificazione dell'interazione fra lipidi e proteine associate alle membrane con conseguente alterazione delle attività enzimatiche e del trasporto ionico.

L'alterazione dell'integrità della membrana plasmatica e il conseguente aumento della permeabilità agli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  possono portare alla distruzione irreversibile della cellula.

L'organismo ha sviluppato, quindi, dei meccanismi di protezione contro lo stress ossidativo che, in condizioni normali, sono molto efficaci.

Gli antiossidanti sono dei veri e propri sistemi di protezione contro i radicali liberi e sono distinti in antiossidanti non enzimatici ed antiossidanti enzimatici.

I primi includono sostanze a basso peso molecolare ed agiscono come “scavengers” (spazzini), e possono essere di derivazione endogena o esogena (introdotti con la dieta).

Gli antiossidanti enzimatici sono composti prodotti dall'organismo per difendersi dall'attacco dei radicali liberi; fra questi, figurano le catalasi, la glutazione perossidasi e la superossidodismutas

Gli antiossidanti non enzimatici includono diversi fattori tra cui l'acido urico, il glutatione, l'acido lipoico, la bilirubina, l'acido ascorbico, il beta-carotene e il tocoferolo.

Tuttavia, in alcune condizioni l'equilibrio ossidante/antiossidante può essere perturbato con conseguente aumento della produzione di specie reattive di ossigeno e/o diminuzione della capacità endogena di contrastarle.

Il tessuto cerebrale è altamente sensibile allo stress ossidativo per la sua elevata richiesta di ossigeno e per la sua relativa carenza di sistemi antiossidanti. Inoltre, esso contiene alte concentrazioni di

acidi grassi polinsaturi (PUFA), che lo rendono più vulnerabile ai danni ossidativi.

L'alterazione della funzione mitocondriale, la deposizione di peptidi di  $\beta$ -amiloide e la presenza di ioni metallici non legati rappresentano la più studiata fonte di stress ossidativo a livello cerebrale [2,3].

A seconda delle biomolecole colpite, lo stress ossidativo può promuovere la perossidazione di proteine, di lipidi e/o di acidi nucleici favorendo in tal modo l'inizio o la progressione del declino cognitivo in corso di invecchiamento.

Negli ultimi anni la letteratura scientifica ha rivolto un crescente interesse a sostanze con note proprietà antinfiammatorie ed antiossidanti, quali carotenoidi e flavonoidi, il cui apporto regolare con la dieta sembra esercitare funzioni protettive contro l'insorgenza e la progressione della disfunzione cognitiva, attraverso il mantenimento e/o il ripristino dell'equilibrio fisiologico tra produzione ed eliminazione dei radicali liberi [4-6].

Studi epidemiologici hanno dimostrato come l'apporto regolare di flavonoidi si associ, in corso d'invecchiamento fisiologico, a migliori performance cognitive e tale effetto sembrerebbe essere dose-dipendente [7-9]. Trials clinici randomizzati controllati hanno,

inoltre, evidenziato come l'assunzione giornaliera di nutridrink ricchi in flavonoidi del cacao determini un miglioramento delle performance cognitive sia negli anziani sani che in quelli con iniziale decadimento cognitivo [10,11]. Gli effetti benefici dei composti polifenolici sono stati attribuiti alla loro capacità di esercitare un'azione antiossidante, di neuroprotezione, di promozione dell'attività neuronale e di miglioramento del profilo metabolico e di salute vascolare cerebrale [12,13].

Studi cross-sectional e studi di popolazione hanno mostrato come l'assunzione di elevate concentrazioni di carotenoidi si associ a migliori performance cognitive in soggetti sani [14-16].

Studi minori hanno, inoltre, osservato un'associazione positiva tra carotenoidi xantofille e funzioni cognitive, quali memoria, funzioni esecutive e linguaggio [17,18].

Recenti studi sperimentali, condotti su soggetti sani, hanno dimostrato un miglioramento in diversi domini cognitivi, quali memoria episodica [19], attenzione [20] e velocità di elaborazione [21], secondario ad integrazione alimentare con carotenoidi.

Sulla base di queste evidenze, una recente metanalisi di nove studi ha evidenziato come un più alto consumo di frutta e verdura si associ

ad un rischio significativamente più basso di sviluppare decadimento cognitivo e demenza [22].

Inoltre, schemi dietetici ricchi in alimenti con proprietà antinfiammatorie e antiossidanti, come la dieta Mediterranea, e diete in grado di migliorare i profili pressori (DASH) sono stati associati a migliori performance cognitive [23].

La frutta e le verdure contengono numerose sostanze bioattive ad azione antiossidante e antinfiammatoria in grado di promuovere un miglioramento delle funzioni cognitive.

In considerazione dei diversi effetti biologici dei nutrienti contenuti nel cibo, è ipotizzabile pensare che una miscela di sostanze bioattive con nota azione antiossidante e in grado di influenzare positivamente le funzioni cognitive possa essere più efficace dell'attività di un singolo antiossidante [24,25]. A tale proposito, sono stati evidenziati effetti biologici sinergici tra alcuni carotenoidi ed altre sostanze ad azione antiossidante, con risvolti positivi sulle funzioni cognitive di soggetti anziani.

Il licopene, un carotenoide non polare liposolubile, presente nei pomodori e nei frutti rossi (anguria, pompelmo rosa e guava), eserciterebbe un'azione protettiva sulle funzioni cognitive [26].

Studi in vitro hanno dimostrato che il licopene protegge dalla morte neuronale indotta da diversi composti neurotossici, tra cui 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+), metilmercurio,  $\beta$ -amiloide, trimetiltina e 6-idrossidopamina [27,28]. Inoltre, esperimenti in vivo su modelli murini hanno evidenziato come il licopene prevenga le lesioni cerebrali causate da ischemia focale o globale da riperfusione [29] e riduca la disfunzione cognitiva indotta da colchicina e rotenone [30]. Uno studio osservazionale ha documentato come i soggetti di sesso maschile nel quartile più alto di concentrazioni sieriche di licopene presentino un rischio ridotto di ictus ischemico del 59% e del 55% rispetto a quelli nel quartile più basso [31].

L'astaxantina è una xantofilla, cioè un carotenoide polare, con proprietà antiossidanti ed antiinfiammatorie dovute alla sua composizione chimica. In diversi studi sperimentali, questa sostanza ha mostrato una varietà di effetti benefici cerebrali [32,33].

Bacopa monnieri è un'erba molto studiata per le sue molteplici proprietà fitoterapiche [34-36]. Il suo estratto di etanolo contiene una miscela di saponine triterpeni indicate come bacosidi A e B con note proprietà antiossidanti [37]. Studi in vitro hanno dimostrato che bacopa monnieri inibisce la formazione di radicali liberi e danni a

carico del DNA in maniera dose-dipendente [38,39]. Studi di popolazione hanno evidenziato un miglioramento della cognizione negli anziani e nei pazienti con disturbi neurodegenerativi.

In un recente studio randomizzato controllato di breve durata (6 settimane) condotto su adulti sani sono stati evidenziati migliori punteggi nei test cognitivi in coloro che assumevano bacopa monnieri rispetto al placebo [40]. Inoltre, questa sostanza si è dimostrata in grado di migliorare alcune funzioni cognitive (orientamento, attenzione, linguaggio) a distanza di 6 mesi anche in soggetti con demenza di Alzheimer.

La vitamina B12, chiamata anche cobalamina, è una vitamina idrosolubile che svolge un ruolo fondamentale nel normale funzionamento del sistema nervoso e nella formazione di globuli rossi [41].

Livelli sierici di vitamina B12 inferiori al range di normalità (<250 pmol/L) sono stati associati a malattia di Alzheimer, a demenza vascolare e a malattia di Parkinson; mentre alcune evidenze scientifiche suggeriscono che la somministrazione di vitamina B12 potrebbe essere utile nel preservare le funzioni cognitive [42].

Un trial randomizzato controllato verso placebo condotto su donne di diversa età ha dimostrato che la supplementazione per un breve periodo di vitamina B12 ha effetti positivi sulla memoria [43].

Azioni sinergiche sono state già evidenziate nelle combinazioni tra beta-carotene/astaxantina, e astanzatina/licopene nel contrastare la perossidazione lipidica [44,45].

Inoltre, è stato dimostrato che una supplementazione dietetica composta da bacopa monnieri, astaxantina, fosfatidilserina e vitamina E determina un significativo miglioramento della memoria e delle performance cognitive in genere [46].

Studi in vitro hanno, infine, evidenziato come la combinazione di questi quattro composti sia in grado di contrastare l'effetto deleterio del perossido di idrogeno sulle cellule nervose differenziate, attraverso il potenziamento della vitalità cellulare e delle proteine coinvolte nei meccanismi di neuroprotezione [47].

## **2. SCOPO DELLO STUDIO**

Sulla base di queste evidenze scientifiche, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare se un integratore alimentare

contenente antiossidanti, quali bacopa, licopene, astaxantina e vitamina B12, somministrato per 8 settimane consecutive, possa influenzare positivamente le funzioni cognitive e lo stato di benessere psico-fisico in un campione di soggetti anziani cognitivamente integri.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### ***3.1 Partecipanti***

80 soggetti, di cui 55 donne e 25 uomini, di età  $\geq 60$  anni (età media 61.9 anni) sono stati estratti in maniera casuale da una lista di 160 soggetti potenzialmente reclutabili, valutati dai medici di base dei nostri distretti sanitari, sulla base dei seguenti criteri di esclusione:

- condizioni mediche coesistenti clinicamente significative (patologie cardiovascolari, eventi cerebrovascolari, demenza definita sulla base di un punteggio al MMSE  $< 27$  ed altri disordini neurologici, patologie tiroidee ed infiammatorie);
- Geriatric Depression Scale  $< 11$ ;
- abitudine tabagica;
- uso abituale di sostanze ad azione antiossidante (vitamine C ed E);

- consumo abituale di cioccolato o di prodotti contenenti flavonoidi del cacao (assunzione giornaliera di qualsiasi entità);
- trattamento con medicine note per le loro proprietà antiossidanti (statine e glitazoni) o per la loro capacità di interferire con le funzioni cognitive (incluse benzodiazepine ed antidepressivi);
- storia di ipersensibilità a qualsiasi componente presente nel prodotto in studio;
- soggetti che abbiano partecipato nei tre mesi precedenti a trials clinici o che sono attualmente arruolati.

Ad ogni partecipante è stato richiesto di firmare un consenso informato di partecipazione allo studio. 12 soggetti, tra quelli ritenuti eleggibili, hanno rifiutato di prendere parte alla sperimentazione clinica.

### ***3.2 Disegno dello studio***

Al fine di indagare l'impatto del consumo regolare di questo nuovo supplemento dietetico, composto da quattro sostanze bioattive, sulle funzioni cognitive e sul benessere di soggetti anziani non dementi,

abbiamo condotto uno studio randomizzato controllato in doppio cieco a bracci paralleli della durata di 8 settimane.

Tutti i partecipanti, una settimana prima della randomizzazione, sono stati sottoposti a visita dietologica, al fine di valutare le abitudini alimentari e, quindi, di correggere eventuali deficit nutrizionali, in modo tale che la dieta fosse relativamente standardizzata.

Tutti i pazienti arruolati sono stati, inoltre, incoraggiati a continuare la loro consueta attività fisica durante tutto il periodo di studio.

Dopo una settimana di run-in, i partecipanti sono stati assegnati in maniera randomizzata o all'assunzione delle quattro sostanze bioattive (astaxantina 160 mg, licopene 100 mg, bacopa monnieri 80 mg, cianocobalamina 6 mg) o al placebo, assunti entrambi sotto forma di compressa, una volta al giorno per 8 settimane (Tabella 1).

La durata dello studio di 8 settimane è stata ritenuta sufficiente per valutare gli eventuali effetti del prodotto sulle funzioni cognitive, sulla base di precedenti evidenze cliniche.

Ad ogni soggetto arruolato è stato assegnato un codice di screening composto da cinque numeri indicanti il numero del centro (e.g. 01) e a seguire un numero progressivo: ad esempio, al primo paziente è

stato assegnato il codice 01-001, al secondo paziente arruolato 01-002 e così via.

Tutti i soggetti esaminati hanno ricevuto un codice indipendentemente dal fatto che siano stati o meno randomizzati.

Se un paziente interrompeva lo studio, il suo codice veniva assegnato ad un nuovo soggetto.

Una volta che l'eleggibilità è stata definita, al paziente veniva assegnato un trattamento tramite delle buste di randomizzazione.

Il centro disponeva di buste sigillate numerate in senso progressivo e contenenti il kit di trattamento da assegnare al soggetto. La prima busta veniva indicata con la sigla R-001,

L'investigatore aveva il compito di aprire la prima busta in ordine progressivo.

Tutti i partecipanti sono stati invitati, nelle successive visite di controllo, a riconsegnare le scatole contenenti i blister, al fine di controllare la compliance. Quest'ultima è stata calcolata sotto forma di percentuale di compresse effettivamente assunte dal soggetto rispetto al numero di compresse che dovesse assumere da protocollo.

Lo studio è stato registrato presso [CLINICALTRIALS.GOV](https://clinicaltrials.gov) ID:NCT03825042.

## Tabella 1. Composizione dei prodotti in studio

### *Integratore alimentare*

Average amounts of characterizing ingredients	Quantity (mg/dose)	% NRVs
Astaxanthin	160.000	15.610
Lycopene	100.000	9.756
Bacopa (Bacopa monnieri (L.) Pernel) aerial part e.s. tit. 50% bacosides	80.000	7.805
Cyanocobalamin (vitamin B12)	6.000	0.585
Microcrystalline Cellulose	619.434	60.433
Coating agent: hydroxypropylmethylcellulose	15.819	1.543
Antiagglomerating agents: crosslinked sodium carboxymethylcellulose	15.000	1.463
Antiagglomerating agents: polyethylene glycol	8.500	0.829
Antiagglomerating agents: magnesium vegetable stearate	8.000	0.780
Antiagglomerating agents: silicon dioxide	6.000	0.585
Dye: titanium dioxide	3.651	0.356
Antiagglomerating agent: vegetable stearic acid	2.434	0.237
Dye: oxide of iron (red)	0.150	0.015
Dry: Patent blue V	0.013	0.001
<b>Total</b>	<b>1025.000</b>	<b>100.000</b>

### *Placebo*

Average amounts of characterizing ingredients	Quantity (mg/dose)	% NRVs
Microcrystalline Cellulose	994.434	97.018
Coating agent: hydroxypropylmethylcellulose	15.819	1.543
Antiagglomerating agents: magnesium vegetable stearate	5.000	0.488
Dye: titanium dioxide	3.651	0.356
Antiagglomerating agents: silicon dioxide	3.000	0.293
Antiagglomerating agent: vegetable stearic acid	2.434	0.237
Antiagglomerating agents: polyethylene glycol	0.500	0.049
Dye: oxide of iron (red)	0.150	0.015
Dry: Patent blue V	0.013	0.001
<b>Total</b>	<b>1025.000</b>	<b>100.000</b>

### *3.3 Trattamento dei pazienti arruolati*

Non sono state riportate differenze percettibili nell'aspetto e nella palatabilità tra l'integratore alimentare e le compresse di placebo.

Le compresse sono state racchiuse in blisters all'interno di scatole.

Ogni scatola includeva a sua volta tre blisters, ognuno contenente 15 compresse (Figura 1). Ciascun paziente ha ricevuto due scatole nel

corso dello studio, denominate scatola 1 e scatola 2, che coprivano l'intero periodo di studio. Ad ogni visita sono state dispensate un numero sufficiente di compresse (1 compressa/die) fino alla visita successiva. Il numero di compresse fornito al paziente è stato in eccesso rispetto all'intervallo dei giorni tra le due visite (45 compresse), rispettando l'utilizzo ipotetico del paziente (28-31 compresse  $\pm$  3 giorni ad ogni fase). Ogni kit che il paziente ha ricevuto è stato identificato tramite tre numeri digitali e due numeri 1 e 2 che identificavano la prima o la seconda scatola in utilizzo (ad es. trattamento 015-1 e trattamento 015-2 etc.). I kit sono stati assegnati a ciascun paziente tramite randomizzazione.

**Figura 1. Packaging**



### ***3.4 Endpoints dello studio***

L'obiettivo primario è stato quello di valutare le variazioni del punteggio del Trail Making Test (TMT) dal basale a 8 settimane di trattamento, analizzato secondo il seguente ordine gerarchico: TMT-B, TMT-A e TMT B-A.

Gli obiettivi secondari dello studio sono consistiti nel valutare, al basale e a 8 settimane di trattamento, le differenze nelle performance ai seguenti test cognitivi standardizzati e validati:

- Test di Fluenza Verbale (VFT -Verbal Fluency Test)
- Montreal Cognitive Assessment (MoCA)
- Mini Mental State Examination (MMSE)
- Rey Auditory Verbal Learning Test (AVLT)

Il Trail Making Test (TMT; Army Individual Test Battery, 1944) è tra i più comuni test neuropsicologici utilizzati nella pratica clinica, in quanto considerato uno dei test più sensibili nell'identificare alterazioni a carico delle funzioni cognitive sottocorticali.

Il TMT si compone di due parti. La parte A è una prova visiva a tempo, dove ai partecipanti viene richiesto di connettere con delle linee continue in ordine crescente 25 cerchi numerati da 1 a 25, il più

velocemente possibile. Il test, anche se non è stato completato, si considera terminato dopo 5 minuti.

Nella parte B, ai partecipanti viene richiesto di unire i cerchi contenenti numeri (da 1 a 13) o lettere (dalla A alla L) in un ordine alfa/numerico crescente ed alternato. Anche se non completo, il test si considera terminato dopo 10 minuti.

La flessibilità cognitiva (set-shifting) richiesta nel manipolare più stimoli contemporaneamente riflette la funzione esecutiva, d'altro canto però anche altre abilità cognitive sottocorticali, come la velocità psicomotoria e la capacità visuo-spaziale, sono richieste per completare con successo il test.

Il punteggio del TMT B-A, calcolato come differenza tra il tempo impiegato per il TMT-B e quello impiegato per il TMT-A, è considerato una misura di flessibilità cognitiva relativamente indipendente dalla destrezza manuale.

Il VFT è un breve test per valutare il linguaggio ed il set-shifting. Ai partecipanti viene dato un minuto di tempo per produrre quante più parole possibili o all'interno di una categoria semantica (fluenza verbale per categoria) o indicando la lettera iniziale (fluenza verbale

per lettera). Il punteggio per ogni prova è stabilito dal numero di parole corrette fornite all'esaminatore.

Il MoCA valuta una più ampia matrice di domini cognitivi (per es. memoria, calcolo, funzioni attentive/esecutive, abilità visuo-spaziali e linguistiche) ed è stato dimostrato essere in grado di rilevare il deterioramento cognitivo con punteggio che varia tra 0 e 30.

Il MMSE è uno strumento di screening molto utilizzato per il deterioramento cognitivo e valuta cinque aree funzioni cognitive, comprendenti l'orientamento, l'attenzione, il calcolo, la rievocazione e il linguaggio, con un punteggio che varia da 0 a 30.

L'AVLT è un test neuropsicologico costruito per valutare la natura e la severità dei disturbi mnestici e per tenere traccia delle modifiche della funzione mnestica. L'esaminatore legge ad alta voce 15 parole al ritmo di una parola al secondo. Al partecipante viene, quindi, chiesto di ripetere tutte le parole della lista che riesce a ricordare, indipendentemente dall'ordine con cui sono state lette dall'esaminatore. Questa procedura viene effettuata per un totale di cinque volte. Dopo 15 minuti, al partecipante viene chiesto di nuovo di ricordare quante più parole possibili di quelle presenti nella lista senza però che ci sia una ulteriore riletture delle stesse.

Il punteggio per ogni prova deriva dal numero di parole correttamente ricordate che vengono tra di loro sommate solo nel Test di Rey immediato.

Il benessere psico-fisico è stato indagato tramite il Profile of Mood Stated (POMS); il benessere psicologico tramite il Questionario sul Benessere generale tramite il General Health Questionnaire GHQ-12 e la soddisfazione sessuale tramite il New Sexual Satisfaction Scale (NSSS).

Il POMS è uno strumento ampiamente utilizzato per valutare l'umore. I punteggi più alti riflettono un peggioramento dell'umore, ad eccezione della sotto-scala del “vigore”, dove i punteggi più alti riflettono un miglioramento dell'umore.

Tenendo conto delle due caratteristiche del POMS, che misurano rispettivamente un effetto negativo e un effetto positivo, i dati raccolti con il questionario sono stati analizzati sia come punteggio globale che separatamente considerando una Positive Affect Scale (PAS-POMS, 48 elementi, con un punteggio che varia da 0 a 192) e una Negative Affect Scale (NAS-POMS, 10 elementi, con un punteggio che varia da 0 a 40).

Il GHQ-12 è uno strumento adatto per misurare il benessere psicologico. È stato validato come affidabile indicatore unidimensionale per l'analisi della severità della morbidità psicologica.

L'NSSS è una misura composita di 20 elementi, che valuta la soddisfazione sessuale, basandosi su cinque dimensioni, comprese le sensazioni sessuali, la sensibilizzazione sessuale, l'attenzione verso il partner, lo scambio sessuale, la vicinanza emotiva e l'attività sessuale.

Tra gli obiettivi secondari dello studio rientrano anche le variazioni al basale e a 4 e 8 settimane di trattamento dei seguenti parametri metabolici:

- glucosio (intervallo normale 60-100 mg/dL)
- insulina (intervallo normale 2.7-10.4 mcUI/mL)
- HOMA-IR (derivato da glucosio e insulina)
- colesterolo totale (intervallo normale 150-200 mg/dL)
- colesterolo LDL (intervallo normale 40-130 mg/dL)
- colesterolo HDL (intervallo normale 35-90 mg/dL)
- trigliceridi (intervallo normale 60-170 mg/dL)
- acido urico (intervallo normale 3.5 – 7.0 mg/dL).

Infine, è stata anche analizzata al basale e a 4 e 8 settimane di trattamento la variazione dei seguenti marcatori plasmatici dello stress ossidativo:

- 8 iso-Prostaglandina F2alpha (nessun intervallo normale prestabilito)
- malondialdeide (nessun intervallo normale prestabilito)

### ***3.5 Misurazione Della Pressione Arteriosa***

Prima di sottoporre il soggetto arruolato a test cognitivi, si è proceduto a misurare al mattino la pressione arteriosa sisto-diastolica a livello del braccio non dominante utilizzando un validato strumento oscillometrico dotato di bracciali di taglia appropriata (Omron 705 CP; Omron Matsusaka).

Tale misurazione è stata effettuata dallo staff ed in cieco rispetto al protocollo di studio.

Ad ogni visita, ciascun partecipante allo studio è stato sottoposto, dopo 15 minuti di riposo in posizione seduta, a 3 successive misurazioni della pressione arteriosa (a distanza di 3 minuti l'una dall'altra).

Ai fini dell'analisi statistica è stata presa in considerazione la media delle misurazioni registrate.

### ***3.6 Analisi di Laboratorio***

Entro 24 ore dall'esecuzione dei test neuropsicologici, i partecipanti allo studio sono stati sottoposti a prelievo del sangue a digiuno, al fine di determinare i livelli di glicemia ed insulinemia, e il profilo lipidico. L'indice HOMA-IR (insulinemia (mU/L) x glicemia (mmol/L)/22.5) è stato calcolato come indice di resistenza insulinica.

I livelli sierici di 8-isoprostano e malondialdeide sono stati misurati attraverso 8 Isoprostano ELISA kit (ab2338537, Abcam). L'assorbimento è stato valutato da uno spettrofotometro a 450 nm utilizzando un lettore per micropiastre (Bio-Rad Hercules, CA, USA).

### ***3.7 Flow chart dello studio***

Lo studio ha avuto una durata di due mesi durante i quali ogni paziente arruolato è stato sottoposto a 4 visite che si sono svolte come di seguito descritto.

*VISITA 1* (screening, - 7 giorni dalla Visita 2)

I pazienti sono stati sottoposti alle valutazioni di screening per definirne l'eleggibilità allo studio. I pazienti che hanno soddisfatto tutti i criteri di inclusione e che non rientravano in nessuno dei criteri di esclusione, sono stati ritenuti idonei allo studio e sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni:

- 1) raccolta dell'anamnesi clinica e farmacologica;
- 2) esame obiettivo completo comprendente anche la rilevazione dei parametri antropometrici (altezza, peso, circonferenza della vita);
- 3) misurazione della pressione arteriosa
- 4) visita dietologica

*VISITA 2* (randomizzazione/basale, 7 giorni dopo la V1)

I soggetti arruolati nello studio sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni:

- 1) aggiornamento dell'anamnesi farmacologica
- 2) esame clinico completo
- 3) misurazione della pressione arteriosa
- 4) valutazione neuropsicologica (TMT, VFT, MoCA, MMSE, AVLT)

- 5) valutazione degli stati d'animo (POMS)
- 6) valutazione della qualità di vita (GHQ12)
- 7) valutazione della soddisfazione sessuale (NSSS)
- 8) raccolta dei campioni ematici

I soggetti sono stati assegnati in modo random ai due gruppi paralleli con una ratio di 1:1 e sono stati trattati con un mix di bacopa, licopene, astaxantina e vitamina B12 (circa 1025,00 mg/die) o con placebo (1025,00 mg/die) per due mesi.

Durante la Visita 2 è stato consegnato al soggetto un numero di compresse sufficiente a coprire il trattamento per un mese (45 compresse).

*VISITA 3* (settimana 4, fase di trattamento,  $30 \pm 3$  giorni dopo V2)

I soggetti sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni:

- 1) aggiornamento dell'anamnesi farmacologica
- 2) esame clinico completo
- 3) misurazione della pressione arteriosa
- 4) raccolta dei campioni ematici

Durante la visita sono stati verificati e valutati eventuali eventi avversi ed è stato, inoltre, eseguito un controllo del prodotto ritirato e

verificata la corretta assunzione dello stesso durante il primo mese di terapia.

Durante la Visita 3 è stata consegnata al soggetto una nuova scatola di prodotto contenente 45 compresse.

*VISITA 4* (Settimana 8, visita finale,  $30 \pm 3$  giorni dopo V3)

I soggetti sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni:

- 1) aggiornamento dell'anamnesi farmacologica
- 2) esame clinico completo
- 3) misurazione della pressione arteriosa
- 4) valutazione neuropsicologica (TMT, VFT, MoCA, MMSE, AVLT)
- 5) valutazione degli stati d'animo (POMS)
- 6) valutazione della qualità di vita (GHQ12)
- 7) valutazione della soddisfazione sessuale (NSSS)
- 8) raccolta dei campioni ematici

Durante la visita 4 sono stati verificati e valutati eventuali eventi avversi ed è stata, inoltre, controllata la compliance al trattamento che è stato ritirato.

## 4. ANALISI STATISTICA

### *4.1 Calcolo del campione*

Lo studio è stato basato su un campione stimato di 68 soggetti, con un rapporto di 1:1 tra i due gruppi di trattamento.

Tale campione è stato calcolato per essere adeguato ad ottenere una potenza del 90% e per rilevare un grande effect size ( $f=0.40$ ) tra trattamento e controllo usando un modello ANCOVA con una covariata al baseline e un  $\alpha$  di 0.05 (G\*power versione 3.1.9.2). Considerando un possibile tasso di abbandono (dropout) del 15%, sono stati arruolati 80 soggetti.

Le tre variabili primarie (le variazioni nei punteggi di TMT-B, TMT-A e TMT B-A) sono state analizzate secondo un ordine gerarchico e pertanto non è stato necessario un aggiustamento del calcolo del campione.

Tutti i soggetti randomizzati che hanno ricevuto almeno una dose di trattamento e hanno avuto almeno una valutazione di efficacia post-randomizzazione, sono stati inclusi nella popolazione intention to-treat (ITT) per l'analisi dell'efficacia. Tutti i soggetti randomizzati e senza deviazioni al protocollo che interessino l'endpoint primario, sono stati inclusi nella analisi per protocol (PP).

Tutti i soggetti randomizzati che hanno ricevuto almeno una dose di trattamento sono stati inclusi nell'analisi di sicurezza.

#### ***4.2 Analisi dell'efficacia***

Le variabili primarie (variazioni dei punteggi di TMT-B, TMT-A e TMT B-A), sono state analizzate secondo un ordine gerarchico, utilizzando un modello ANCOVA con il gruppo di trattamento (effetto principale) e i valori al baseline come covariate.

Tutte le altre variabili continue (variazioni dei punteggi dei test, variazioni dei parametri metabolici, variazioni dei livelli circolanti di 8-iso-Prostaglandina F2alpha e malondialdeide) sono state analizzate usando un modello ANCOVA con il gruppo di trattamento (effetto principale) e i valori al baseline come covariate.

Come covariata addizionale per testare l'omogeneità dei coefficienti di regressione, il termine di interazione trattamento\*baseline è stato incluso nel modello e rimosso se non significativo.

Le variabili categoriche (genere, eventuali fattori di rischio cardiovascolari o trattamenti farmacologici) sono state analizzate usando il test del Chi-Quadro o se necessario il test esatto di Fisher.

Il livello di significatività dei test statistici è stato fissato a 0.05.

Valori mancanti non sono stati imputati. Non è stata prevista alcuna analisi intermedia. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando SAS 9.4 per Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

#### ***4.3 Analisi esplorative***

La correlazione di Pearson è stata utilizzata per valutare le correlazioni tra variazioni dei punteggi cognitivi (TMT, VFT, MoCA, MMSE, AVLT) e variazioni della pressione arteriosa e dei parametri metabolici, compresi gli indici di stress ossidativo.

La correlazione non parametrica di Spearman è stata anche applicata quando una o entrambe le variabili non sono state considerate distribuite normalmente e ad intervallo (ma sono considerate ordinali).

Al fine di valutare e quantificare l'effetto del tempo (cioè 8 settimane dopo l'assunzione del trattamento) nella variazione dell'endpoint primario, è stata anche implementata un'analisi della varianza a due vie (trattamento\*tempo) con il tempo come misura ripetuta.

#### ***4.4 Analisi della sicurezza***

Gli eventi avversi sono stati ricapitolati e confrontati tra i due gruppi di trattamento. La tollerabilità del prodotto in studio è stata studiata e confrontata tra i gruppi di trattamento.

### **5. RISULTATI**

#### ***5.1 Caratteristiche generali della popolazione in studio***

La popolazione oggetto di studio era costituita da 80 soggetti (25 maschi, 6 femmine) di età compresa fra i 60 e i 66 anni, cognitivamente integra e non affetta da depressione (Tabella 2). Tutte le variabili valutate al baseline sono risultate simili nei due gruppi, ad indicare un'adeguata procedura di randomizzazione.

**Tabella 2. Caratteristiche generali della popolazione in studio**

	Placebo (n = 40)	Active (n = 40)	p Value
Gender (m/f)	13/27	12/28	0.809
Age (years)	62.05 (1.55)	61.88 (1.36)	0.593
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.48 (2.03)	27.23 (2.49)	0.145
SBP (mmHg)	129.62 (10.0)	131.55 (7.41)	0.329
DBP (mmHg)	83.28 (7.12)	83.45 (5.51)	0.902
TC (mg/dL)	203.93 (42.15)	202.35 (39.74)	0.864
LDL-C (mg/dL)	134.85 (38.40)	130.33 (35.22)	0.584
HDL-C (mg/dL)	54.40 (11.02)	55.48 (14.13)	0.705
TG (mg/dL)	115.18 (56.30)	120.25 (70.31)	0.722
Glucose (mg/dL)	85.08 (16.58)	83.05 (13.46)	0.550
Insulin (mU/L)	10.70 (8.23)	8.60 (4.09)	0.153
HOMA-IR	2.27 (1.90)	1.80 (0.95)	0.162
Uricacid (mg/dL)	4.93 (1.12)	4.79 (1.48)	0.616
MDA (pmol/mL)	91.30 (52.31)	85.44 (38.59)	0.570
8-isoprostanes (pg/mL)	160.44 (162.18)	147.60 (151.79)	0.716
MMSE	28.67 (0.57)	28.64 (0.51)	0.831
TMT-B (s)	54.64 (21.30)	56.97 (25.37)	0.794
TMT-A (s)	24.20 (7.37)	25.17 (10.53)	0.814
TMT-B minus TMT-A (s)	30.44 (17.96)	31.80 (22.32)	0.799
MOCA	25.18 (1.82)	25.50 (1.83)	0.428
GDS	1.93 (1.19)	1.83 (1.28)	0.718

BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; TC: total cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides; HOMA-IR: homeostasis model assessment–insulin resistance; MMSE: mini mental state examination; TMT: trail making test; MOCA: Montreal cognitive assessment; GDS: geriatric depression scale. Data are presented as means (SD).

## 5.2 Endpoint primari

Le differenze nelle variazioni dei tre endpoint primari tra i due gruppi, dal basale a 8 settimane di trattamento, sono risultate statisticamente significative ( $p < 0,001$ ) a favore del gruppo attivo (gruppo I).

Il punteggio del TMT-B, espresso in secondi, è aumentato nel gruppo di controllo (+3,46 s) ed è diminuito nel gruppo attivo (circa 17.63 s) (Tabella 3).

La differenza di trattamento è stata di 21,01 s a favore del gruppo attivo (95% C.I. da - 26.80 a - 15.2,  $p < 0.0001$ ) (Figura 2).

La diminuzione del punteggio del TMT-A è stata significativamente più alta nel gruppo attivo (6,86 s) rispetto al gruppo di controllo (0,37 s) (Tabella 3).

La differenza di trattamento è stata di - 6,08 s a favore del gruppo attivo (95% C.I. da 8,54 a 3,61,  $p < 0,0001$ ) (Figura 2).

La differenza tra punteggio al TMT-B e quello ottenuto al TMT-A è aumentata nel gruppo di controllo (+3,84 s) ed è diminuita nel gruppo attivo (- 10.46 s) (Tabella 3).

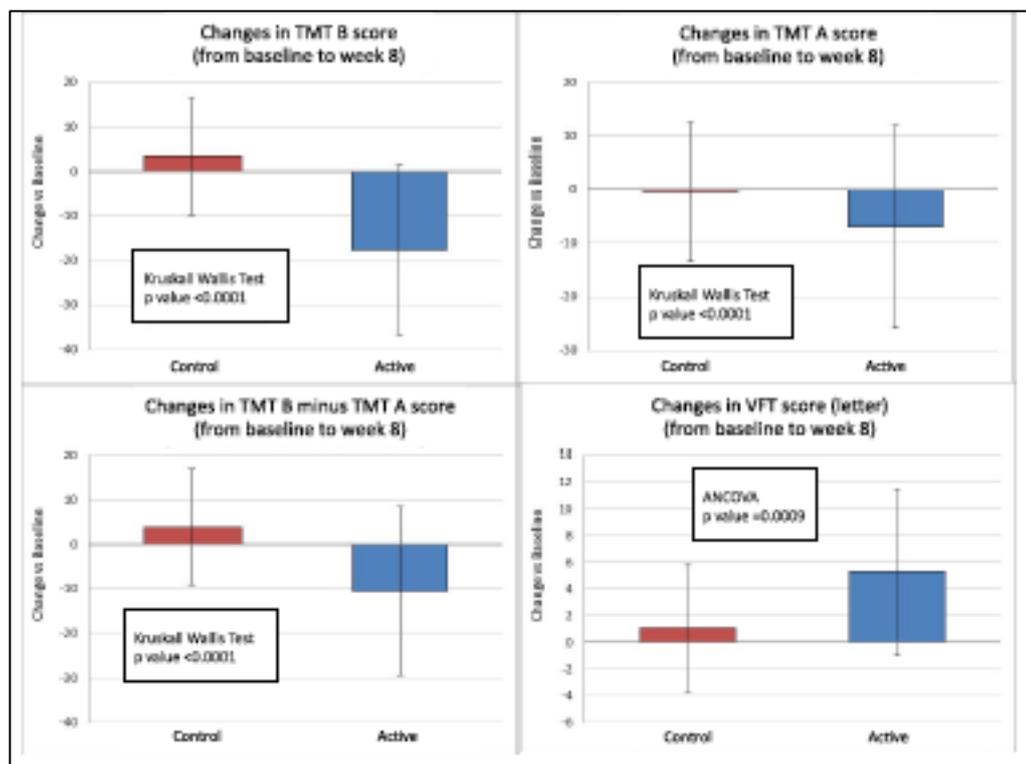
La differenza di trattamento è stata di 14,56 s a favore del gruppo attivo (95% C.I. da 20.02 a - 9.11,  $p < 0.0001$ ) (Figura 2).

**Tabella 3. Variazioni dei punteggi dei test neuropsicologici durante il periodo di studio vs baseline (ITT population)**

	Placebo (n = 40) Week 8	Active (n = 38) Week 8	p Value
TMT B (s)	3.46 (13.08)	-17.63 (18.93)	<0.0001
TMT A (s)	-0.37 (5.31)	-6.86 (10.00)	<0.0001
TMT B-A (s)	3.84 (11.65)	-10.46 (16.62)	<0.0001
VFT letter (n)	1.07 (4.80)	5.28 (6.25)	0.0009
VFT category (n)	0.46 (1.79)	0.74 (1.67)	0.4915
AVL (n)	-0.13 (49.02)	-4.87 (43.09)	0.750
Delayed AVL (n)	4.60 (11.42)	4.38 (12.84)	0.591
MOCA	0.55 (2.59)	1.13 (2.17)	0.150
MMSE	0.03 (0.16)	0.03 (0.16)	0.907

TMTB: trail making test B; TMTA: trail making test A; TMT B-A: trail making test B minus trail making test A; VFT verbal fluency test; AVL: auditory verbal learning; MOCA: Montreal cognitive assessment; MMSE: mini mental state examination.

**Figura 2. Variazioni nei punteggi del TMT B, TMT A, TMT B meno TMT A e VFT dal baseline a 8 settimane nel gruppo di trattamento attivo (n=38) e nel gruppo placebo (n=40)**



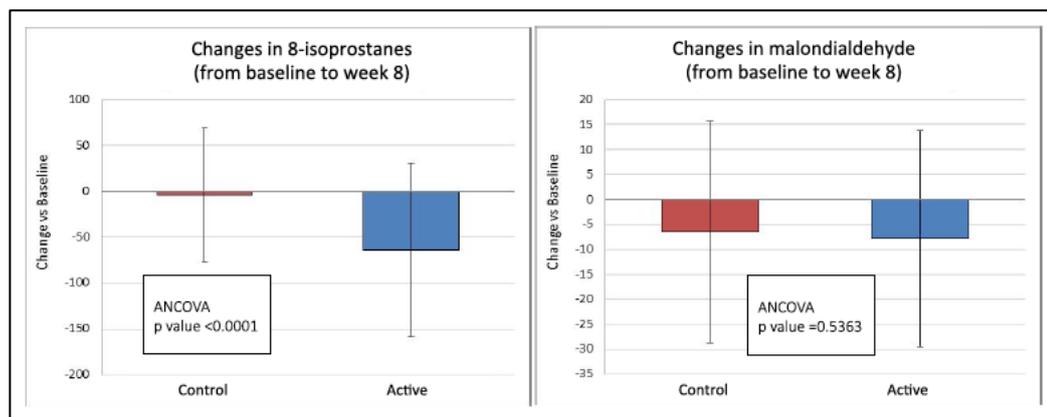
### 5.3 Endpoint secondari

Il punteggio nel test di fluidità verbale per lettera (VFT) è stato significativamente più alto nel gruppo attivo con raggiungimento della significatività statistica (+5,28 vs. +1,07 parole;  $p < 0,001$ ) (Tabella 3). La differenza di trattamento è stata di +4,33 parole corrette a favore del gruppo attivo (95% C.I. +1,83/+6,82,  $p = 0,0009$ ) (Figura 2).

Non sono state rilevate altre differenze statisticamente significative negli altri test neuropsicologici eseguiti (Tabella 3).

Una differenza sorprendente e statisticamente significativa tra i due gruppi è stata osservata nelle variazioni dei livelli di 8-isoprostano tra il basale e la quarta settimana e tra il basale e l'ottava settimana di trattamento. La diminuzione è stata di - 9,82 e - 4,14 pg/mL alla quarta settimana e all'ottava settimana rispettivamente nel gruppo di controllo, e di - 57,08 e - 63,65 pg/ml nel gruppo attivo ( $p < 0,001$ ). La differenza di trattamento è stata di - 65,31 pg/mL a favore del gruppo attivo (IC 95% da 91,72 a 38,8,  $p < 0,0001$ ) (Figura 3).

**Figura 3. Variazioni nei livelli circolanti di 8-isoprostano e di malondialdeide dal baseline a 8 settimane di trattamento attivo (n=38) vs placebo**



Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra i due gruppi per ciò che concerne i punteggi ottenuti nei test di valutazione del benessere psico-fisico.

Una differenza statisticamente significativa è stata, invece, osservata nelle variazioni dei livelli plasmatici di malondialdeide tra il basale e la quarta settimana: il livello medio di malondialdeide plasmatica è diminuito di 5,22 e 10,91 pmol/mL rispettivamente, nel gruppo di controllo e nel gruppo attivo ( $p < 0,05$ ).

Questa differenza non era più evidente all'ottava settimana (-2,67 pmol/mL a favore del gruppo attivo, 95% CI -11,22/-5,89,  $p = 0,5363$ ) (Figura 3).

È stata osservata, infine, una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi per ciò che concerne le variazioni nelle concentrazioni ematiche di insulina dal basale a 8 settimane di trattamento: -2,31 contro +0,70 rispettivamente, nel placebo e nel gruppo attivo ( $p < 0,05$ ) (Tabella 4).

In particolare, questo risultato è stato probabilmente guidato dall'enorme riduzione dei livelli plasmatici di insulina (-25,3 UI/L) in un paziente sotto placebo. Lo stesso comportamento è stato

osservato per HOMA-IR, ma la differenza non è risultata statisticamente significativa.

Non è stata rilevata nessuna differenza statisticamente significativa negli altri parametri metabolici registrati tra il baseline e le successive visite di controllo.

**Tabella 4. Variazioni nei parametri metabolici durante il periodo di studio vs. baseline (ITT population)**

Table 3. Changes of metabolic parameters during the study period vs. baseline (ITT population).						
	Placebo (n = 40) Week 4	Active (n = 38) Week 4	p Value	Placebo (n = 40) Week 8	Active (n = 38) Week 8	p Value
SBP (mmHg)	0.52 (2.46)	0.13 (2.65)	0.745	0.54 (2.08)	1.18 (2.45)	0.108
DBP (mmHg)	0.42 (2.14)	-0.49 (2.72)	0.122	0.33 (2.32)	0.03 (2.72)	0.719
TC (mg/dL)	0.70 (29.50)	1.77 (28.14)	0.864	-0.18 (31.51)	3.95 (30.36)	0.563
LDL-C (mg/dL)	0.15 (29.11)	2.31 (23.13)	0.965	-1.38 (31.30)	5.03 (26.07)	0.432
HDL-C (mg/dL)	-1.15 (8.13)	0.10 (9.79)	0.349	2.13 (9.67)	2.08 (11.54)	0.819
TG (mg/dL)	3.20 (47.41)	-6.26 (49.30)	0.435	-0.13 (49.02)	-4.87 (43.09)	0.750
Glucose (mg/dL)	3.10 (10.81)	7.03 (12.16)	0.164	4.60 (11.42)	4.38 (12.84)	0.591
Insulin (mU/L)	-1.57 (5.41)	0.99 (5.42)	0.116	-2.31 (6.50)	0.70 (3.51)	0.036
HOMA-IR	-0.27 (1.19)	0.32 (1.23)	0.095	-0.41 (1.56)	0.25 (0.90)	0.080
Uric acid (mg/dL)	0.07 (0.89)	0.22 (0.76)	0.530	-0.06 (1.13)	0.01 (0.99)	0.915

SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; TC: total cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides; HOMA-IR: homeostasis model assessment-insulin resistance. Data are presented as means (SD).

#### 5.4 Risultati di sicurezza

Durante il periodo di studio sono stati osservati soltanto due eventi avversi, entrambi nel gruppo attivo. Il primo dei due soggetti ha manifestato una riacutizzazione di sinusite. L'evento non è stato

ritenuto severo; nessun intervento è stato messo in atto sul trattamento in essere, e la sintomatologia si è risolta in due giorni.

Il secondo soggetto ha, invece, presentato un'epatite acuta virale di tipo E. L'evento registrato è stato ovviamente di grado severo, ma non è stata evidenziata alcuna connessione con il trattamento in via di sperimentazione. Quest'ultimo è stato, comunque, sospeso, e l'infezione virale risolta in otto giorni di ospedalizzazione.

### ***5.5 Aderenza al protocollo di studio***

Due soggetti, entrambi del gruppo attivo, hanno abbandonato prematuramente lo studio; un soggetto non ha potuto partecipare alle visite programmate dopo la randomizzazione e, quindi, ha revocato il consenso allo studio, ma ha accettato di effettuare la visita di fine studio; un altro soggetto ha presentato, quale evento acuto, un'epatite di tipo E, e di conseguenza, ha interrotto definitivamente il trattamento dopo 4 settimane dalla randomizzazione.

La compliance al trattamento è stata del 100% per quasi tutti i soggetti, ad eccezione di un paziente che non ha riportato né le compresse inutilizzate né le scatole vuote alla quarta settimana, e di un altro che ha dimenticato di assumere una compressa.

#### **4. DISCUSSIONE**

Questo studio fornisce prove incoraggianti sul fatto che il consumo quotidiano di un mix di sostanze antiossidanti, quali bacopa, licopene, astaxantina e vitamina B12, per un periodo di otto settimane, possa influenzare favorevolmente le funzioni cognitive di soggetti anziani sani.

In effetti, le performance cognitive, dopo il consumo regolare di miscela antiossidante, sono migliorate nei soggetti arruolati senza evidenza di effetti avversi rilevanti.

Questo è il primo studio controllato rivolto ad anziani cognitivamente integri con l'obiettivo di rilevare miglioramenti nelle prestazioni cognitive.

La regolare inclusione nella dieta del mix di antiossidanti ha, inoltre, favorito una significativa riduzione dei livelli plasmatici di alcuni markers di stress ossidativo.

Lo stress ossidativo a lungo termine sembra essere un fattore importante nell'eziopatogenesi del declino cognitivo [1,48] e può essere contrastato attraverso la dieta e l'assunzione di integratori a base di sostanze antiossidanti [49]. L'utilizzo di queste ultime, quale potenziale strategia d'intervento per la prevenzione e/o il trattamento

dei disturbi cognitivi e della demenza, è stato oggetto d'interesse della letteratura scientifica per molti anni [10,11,50–52]. Nonostante ciò, dati epidemiologici sul consumo di vitamine antiossidanti e cognizione non hanno mostrato risultati uniformi. Alcuni grandi studi osservazionali hanno riportato che un'assunzione elevata o livelli plasmatici elevati di antiossidanti erano associati a migliori prestazioni cognitive [25,53-58] e ad un ridotto rischio di sviluppare malattia di Alzheimer e demenza per tutte le cause [59-62].

Tuttavia, altri studi randomizzati non hanno confermato tale ruolo neuroprotettivo [63-67].

Nello studio PREADViSE (prevenzione della malattia di Alzheimer attraverso vitamina E e selenio), né la vitamina E né il selenio hanno avuto un effetto significativo in termine di prevenzione sull'incidenza della demenza [68]. Allo stesso modo, il Physicians' Health Study II non ha dimostrato un'influenza significativa della supplementazione a breve termine di beta-carotene sulle prestazioni cognitive [69].

Il presente studio fornisce dati interessanti circa il miglioramento di alcuni aspetti delle performance cognitive in anziani sani a seguito del consumo regolare di una miscela di antiossidanti.

I benefici includono un potenziamento nella velocità di elaborazione verbale, nelle funzioni esecutive e nella memoria di lavoro, come indicato da migliori performance al TMT A, TMT B, TMT B meno TMT A e al VFT: una batteria di test neuropsicologici comunemente utilizzata per la valutazione delle funzioni esecutive.

A questo proposito, il declino cognitivo legato all'età inficia prevalentemente i processi esecutivi, tra cui la velocità di elaborazione, la memoria di lavoro, l'inibizione e il controllo cognitivo [70,71]. Questi risultati potrebbero suggerire una particolare sensibilità di questo sottoinsieme di funzioni cognitive al danno prodotto dallo stress ossidativo.

Il nostro studio fornisce, quindi, un'interessante evidenza, e cioè che l'inclusione nella dieta di un mix contenente bacopa, licopene, astaxantina e vitamina B12 possa essere efficace nel migliorare il declino cognitivo legato all'età.

Ciò che non è chiaro è, tuttavia, come il consumo giornaliero degli antiossidanti somministrati nel nostro studio possa contribuire agli effetti cognitivi osservati. Alcuni studi pubblicati in precedenza hanno mostrato come l'assunzione di antiossidanti possa contrastare

la disfunzione endoteliale, con conseguente miglioramento del flusso ematico cerebrale [52].

Una possibile spiegazione sarebbe, quindi, che i miglioramenti indotti dal mix di antiossidanti sulle prestazioni cognitive siano dovuti ad un'influenza favorevole sulla funzione endoteliale, con aumento del flusso ematico cerebrale [52].

Inoltre, è stato dimostrato in studi in vitro che gli antiossidanti svolgano un'azione neuroprotettiva diretta contrastando la citotossicità del perossido d'idrogeno sulle cellule neuronali differenziate [47], up-regolando l'espressione di pathways neurotrofici e down-regolando le vie responsabili della morte neuronale [47].

Il trattamento oggetto del nostro studio sarebbe in grado, quindi, di ripristinare nelle cellule neuronali il corretto equilibrio ossidativo, up-regolando gli enzimi scavenger delle specie reattive dell'ossigeno e riducendo la promozione della morte cellulare. A tal proposito si deve considerare che la neurodegenerazione, e cioè una compromissione del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), si verifica parallelamente al declino cognitivo e alla diminuzione della plasticità sinaptica e della perdita della memoria.

In questo contesto, è importante sottolineare che il mix di antiossidanti si è dimostrato, in esperimenti in vitro, in grado di aumentare il BDNF, nonché le proteine coinvolte nella plasticità sinaptica e nel mantenimento della morfologia sinaptica [47].

Un'altra interessante evidenza del nostro studio è rappresentata dalla significativa riduzione dei livelli plasmatici di 8-isoprostano dopo il consumo del mix di antiossidanti. L'8-isoprostano è generato dal metabolismo dell'acido arachidonico attraverso un processo non enzimatico di perossidazione dei lipidi di membrana e delle lipoproteine per opera dei radicali liberi dell'ossigeno, rappresentando così un marcatore consolidato di stress ossidativo [72]. I prodotti di perossidazione lipidica sono, a loro volta, in grado di promuovere vasocostrizione sostenuta [72], attivazione piastrinica [73] e infiammazione vascolare [74]. Tali meccanismi potrebbero svolgere un ruolo nel ridurre la perfusione cerebrale.

Aumentate concentrazioni di isoprostani sono state riscontrate nel plasma, nelle urine e nel liquido cerebrospinale di pazienti con malattia di Alzheimer e, in misura minore, in soggetti con lieve deterioramento cognitivo, suggerendo una correlazione diretta tra equilibrio ossidante/antiossidante e gravità della disfunzione

cognitiva [75]. A questo proposito, Galasko et al. [76] hanno dimostrato una significativa riduzione dei livelli di 8-isoprostano nel liquido cerebrospinale dopo 16 settimane di somministrazione di antiossidanti in soggetti con probabile malattia di Alzheimer.

Inoltre, è stato dimostrato che la riduzione dei livelli plasmatici di 8-isoprostani contribuisce al miglioramento delle funzioni cognitive nei pazienti con decadimento cognitivo lieve dopo 8 settimane di integrazione con flavanoidi del cacao [10]. Pertanto, la riduzione dei livelli circolanti di 8-isoprostano potrebbe aver contribuito al miglioramento delle prestazioni cognitive osservate.

La potenziale rilevanza clinica dei nostri risultati richiede, però, alcune considerazioni. Primo, non possiamo escludere del tutto la possibilità che altri elementi dietetici possano aver influenzato i nostri risultati, poiché non è stata eseguita una valutazione dietetica. Tuttavia, tutti i partecipanti allo studio erano stati istruiti a mantenere il loro abituale stile di vita, compresa l'assunzione di frutta e verdura, e ad evitare qualsiasi integratore alimentare. Pertanto, siamo fiduciosi che questo potenziale effetto confondente non abbia avuto un ruolo importante nell'interpretazione dei nostri dati. Inoltre, a causa del disegno dello studio, è stato difficile determinare se ci

fosse o meno sinergia tra i quattro componenti testati nella miscela antiossidante, o se gli effetti fossero dovuti più ad a uno dei quattro composti bioattivi. Tuttavia, lo studio esplorativo in vitro ha dimostrato un'azione sinergica dei quattro composti bioattivi nella protezione delle cellule neuronali differenziate dagli effetti citotossici di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumentando così la vitalità cellulare e le proteine coinvolte nelle vie di neuroprotezione e di apoptosi cellulare [47]. Sebbene i risultati in vitro non possano essere tradotti direttamente in vivo, l'esistenza di un effetto sinergico anche in vivo sembra essere molto plausibile.

## **7. CONCLUSIONI**

I risultati del nostro studio indicano che l'assunzione regolare di una miscela antiossidante contenente bacopa, licopene, astaxantina e vitamina B12 possa migliorare alcuni aspetti delle performance cognitive in soggetti anziani sani. Questi risultati forniscono prove incoraggianti di come la regolare integrazione alimentare con bacopa, licopene, astaxantina e vitamina B12 possa costituire un approccio dietetico efficace per contrastare i cambiamenti cognitivi associati all'invecchiamento cerebrale.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Praticò, D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: Lights and shadows. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1147, 70–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Reddy, P.H.; Beal, M.F. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res.* 2005, 49, 618–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mattson, M.P. Pathways towards and a way from Alzheimer's disease. *Nature* 2004, 430, 631–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rao, A.V.; Balachandran, B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr. Neurosci.* 2002, 5, 291–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Deschamps, V.; Barberger-Gateau, P.; Peuchant, E.; Orgogozo, J.M. Nutritional factors in cerebral aging and dementia: Epidemiological arguments for a role of oxidative stress. *Neuroepidemiology* 2001, 20, 7–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Engelhart, M.; Geerlings, M.I.; Ruitenberg, A.; Van Swieten, J.C.; Hofman, A.; Witteman, J.C.; Breteler, M.M. Diet and risk of dementia: Does fat matter?: The Rotterdam Study. *Neurology* 2002, 59, 1915–1921. [[CrossRef](#)]
7. Crichton, G.E.; Elias, M.F.; Alkerwi, A. Chocolate intake is associated with better cognitive function: The Maine-Syracuse Longitudinal Study. *Appetite* 2016, 100, 126–132. [[CrossRef](#)]
8. Nurk, E.; Refsum, H.; Drevon, C.A.; Tell, G.S.; Nygaard, H.A.; Engedal, K.; Smith, A.D. Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance. *J. Nutr.* 2009, 139, 120–127. [[CrossRef](#)]

9. Socci, V.; Tempesta, D.; Desideri, G.; De Gennaro, L.; Ferrara, M. Enhancing human cognition with cocoa flavonoids. *Front. Nutr.* 2017, 19. [[CrossRef](#)]
10. Desideri, G.; Kwik-Urbe, C.; Grassi, D.; Necozone, S.; Ghiadoni, L.; Mastroiacovo, D.; Raffaele, A.; Ferri, L.; Bocale, R.; Lechiara, M.C.; et al. Benefits in cognitive function, blood pressure, and insulin resistance through cocoa flavanol consumption in elderly subjects with mild cognitive impairment: The Cocoa, Cognition, and Aging (CoCoA) study. *Hypertension* 2012, 60, 794–801. [[CrossRef](#)]
11. Mastroiacovo, D.; Kwik-Urbe, C.; Grassi, D.; Necozone, S.; Raffaele, A.; Pistacchio, L.; Righetti, R.; Bocale, R.; Lechiara, M.C.; Marini, C.; et al. Cocoa flavanol consumption improves cognitive function, blood pressure control, and metabolic profile in elderly subjects: The Cocoa, Cognition, and Aging (CoCoA) Study—a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2015, 101, 538–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20, 933–956. [[CrossRef](#)]
13. Spencer, J.P. Food for thought: The role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. *Proc. Nutr. Soc.* 2008, 67, 238–252. [[CrossRef](#)]
14. Feeney, J.; O’Leary, N.; Moran, R.; O’Halloran, A.M.; Nolan, J.M.; Beatty, S.; Young, I.S.; Kenny, R.A. Plasma lutein and zeaxanthin are associated with better cognitive function across multiple domains in a large population-based sample of older adults: Findings from the Irish longitudinal study on aging. *J. Gerontol. A*

- Biol. Sci. Med. Sci. 2017, 72, 1431–1436. [[CrossRef](#)]
15. Johnson, E.J.; Vishwanathan, R.; Johnson, M.A.; Hausman, D.B.; Davey, A.; Scott, T.M.; Green, R.C.; Miller, L.S.; Gearing, M.; Woodard, J.; et al. Relationship between serum and brain carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, and retinol concentrations and cognitive performance in the oldest old from the georgia centenarian study. *J. Aging Res.* 2013, 951786. [[CrossRef](#)]
16. Christensen, K.; Gleason, C.E.; Mares, J.A. Dietary carotenoids and cognitive function among US adults, NHANES 2011–2014. *Nutr. Neurosci.* 2020, 23, 554–562. [[CrossRef](#)]
17. Cannavale, C.N.; Hassevoort, K.M.; Edwards, C.G.; Thompson, S.V.; Burd, N.A.; Holscher, H.D.; Erdman, J.W., Jr.; Cohen, N.J.; Khan, N.A. Serum lutein is related to relational memory performance. *Nutrients* 2019, 11, 768. [[CrossRef](#)]
18. Zamroziewicz, M.K.; Paul, E.J.; Zwilling, C.E.; Johnson, E.J.; Kuchan, M.J.; Cohen, N.J.; Barbey, A.K. Parahippocampal cortex mediates the relationship between lutein and crystallized intelligence in healthy, older adults. *Front. Aging Neurosci.* 2016, 8, 297. [[CrossRef](#)]
19. Power, R.; Coen, R.F.; Beatty, S.; Mulcahy, R.; Moran, R.; Stack, J.; Howard, A.N.; Nolan, J.M. Supplemental retinal carotenoids enhance memory in healthy individuals with low levels of macular pigment in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Alzheimers Dis.* 2018, 61, 947–961. [[CrossRef](#)]
20. Hammond, B.R., Jr.; Miller, L.S.; Bello, M.O.; Lindbergh, C.A.; Mewborn, C.; Renzi-Hammond, L.M. Effects of lutein/zeaxanthin

- supplementation on the cognitive function of community dwelling older adults: A randomized, double-masked, placebocontrolled trial. *Front. Aging Neurosci.* 2017, 9, 254. [[CrossRef](#)]
21. Bovier, E.R.; Hammond, B.R. A randomized placebo-controlled study on the effects of lutein and zeaxanthin on visual processing speed in young healthy subjects. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015, 572, 54–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Jiang, X.; Huang, J.; Song, D.; Deng, R.; Wei, J.; Zhang, Z. Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of cognitive impairment and dementia: Meta-Analysis. *Front. Aging Neurosci.* 2017, 9, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. McGrattan, A.M.; McGuinness, B.; McKinley, M.C.; Kee, F.; Passmore, P.; Woodside, J.V.; McEvoy, C.T. Diet and inflammation in cognitive ageing and Alzheimer’s disease. *Curr. Nutr. Rep.* 2019, 8, 53–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Beydoun, M.A.; Canas, J.A.; Fanelli-Kuczmariski, M.T.; Maldonado, A.I.; Shaked, D.; Kivimaki, M.; Evans, M.K.; Zonderman, A.B. Association of antioxidant vitamins A, C, E and carotenoids with cognitive performance over time: A cohort study of middle-aged adults. *Nutrients* 2020, 12, 3558. [[CrossRef](#)]
25. Yasuno, F.; Tanimukai, S.; Sasaki, M.; Ikejima, C.; Yamashita, F.; Kodama, C.; Mizukami, K.; Asada, T. Combination of antioxidant supplements improved cognitive function in the elderly. *J. Alzheimers Dis.* 2012, 32, 895–903. [[CrossRef](#)]
26. Crowe-White, K.M.; Phillips, T.A.; Ellis, A.C. Lycopene and cognitive function. *J. Nutr. Sci.* 2019, 8, e20. [[CrossRef](#)]
27. Di Matteo, V.; Pierucci, M.; Di Giovanni, G.; Dragani, L.K.;

- Murzilli, S.; Poggi, A.; Esposito, E. Intake of tomato-enriched diet protects from 6-hydroxydopamine-induced degeneration of rat nigral dopaminergic neurons. *J. Neural Transm. Suppl.* 2009, 73, 333–341.
28. Yi, F.; He, X.; Wang, D. Lycopene protects against MPP(+)-induced cytotoxicity by maintaining mitochondrial function in SH-SY5Y cells. *Neurochem. Res.* 2013, 38, 1747–1757. [[CrossRef](#)]
29. Fujita, K.; Yoshimoto, N.; Kato, T.; Imada, H.; Matsumoto, G.; Inakuma, T.; Nagata, Y.; Miyachi, E. Lycopene inhibits ischemia/reperfusion-induced neuronal apoptosis in gerbil hippocampal tissue. *Neurochem. Res.* 2013, 38, 461–469. [[CrossRef](#)]
30. Kaur, H.; Chauhan, S.; Sandhir, R. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 2011, 36, 1435–1443. [[CrossRef](#)]
31. Karppi, J.; Laukkanen, J.A.; Sivenius, J.; Ronkainen, K.; Kurl, S. Serum lycopene decreases the risk of stroke in men: A populationbased follow-up study. *Neurology* 2012, 79, 1540–1547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kidd, P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Altern. Med. Rev.* 2011, 16, 355–356. [[PubMed](#)]
33. Lim, S.Y.; Kim, E.J.; Kim, A.; Lee, H.J.; Choi, H.J.; Yang, S.J. Nutritional factors affecting mental health. *Clin. Nutr. Res.* 2016, 5, 143–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chatterji, N.; Rastogi, R.P.; Dhar, M.L. Chemical examination of *Bacopa munniera* Wettst.: Part I—Isolation of chemical constituents. *Indian J. Chem.* 1963, 1, 212–215.

35. Chatterji, N.; Rastogi, R.P.; Dhar, M.L. Chemical examination of *Bacopa monniera* Wettst: Part II—Isolation of chemical constituents. *Indian J. Chem.* 1965, 3, 24–29.
36. Aguiar, S.; Borowski, T. Neuropharmacological review of the nootropic herb *Bacopa monnieri*. *Rejuvenation Res.* 2013, 16, 313–326. [[CrossRef](#)]
37. Russo, A.; Izzo, A.A.; Borrelli, F.; Renis, M.; Vanella, A. Free radical scavenging capacity and protective effect of *Bacopa monniera* L. on DNA damage. *Phytother. Res.* 2003, 17, 870–875. [[CrossRef](#)]
38. Stough, C.; Scholey, A.; Cropley, V.; Wesnes, K.; Zangara, A.; Pase, M.; Savage, K.; Nolidin, K.; Lomas, J.; Downey, L. Examining the cognitive effects of a special extract of *Bacopa monniera* (CDRI08: Keenmnd): A review of ten years of research at Swinburne University. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2013, 16, 254–258. [[CrossRef](#)]
39. Kumar, N.; Abichandani, L.G.; Thawani, V.; Gharpure, K.J.; Naidu, M.U.; Venkat Ramana, G. Efficacy of Standardized extract of *Bacopa monnieri* (Bacognize®) on cognitive functions of medical students: A six-week, randomized placebo-controlled trial. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2016, 4103423. [[CrossRef](#)]
40. Goswami, S.; Saoji, A.; Kumar, N.; Thawani, V.; Tiwari, M.; Thawani, M. Effect of *Bacopa monnieri* on cognitive functions in Alzheimer's disease patients. *Int. J. Collab. Res. Intern. Med. Public Health* 2011, 3, 285–293.
41. Aisen, P.S.; Schneider, L.S.; Sano, M.; Diaz-Arrastia, R.; van Dyck, C.H.; Weiner, M.F.; Bottiglieri, T.; Jin, S.; Stokes, K.T.; Thomas, R.G.; et al. Alzheimer disease cooperative study. High-

- Dose B vitamin supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: A randomized controlled trial. *JAMA* 2008, 300, 1774–1783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Moore, E.; Mander, A.; Ames, D.; Carne, R.; Sanders, K.; Watters, D. Cognitive impairment and vitamin B12: A review. *Int. Psychogeriatr.* 2012, 24, 541–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Bryan, J.; Calvaresi, E.; Hughes, D. Short-Term folate, vitamin B-12 or vitamin B-6 supplementation slightly affects memory performance but not mood in women of various ages. *J. Nutr.* 2002, 132, 1345–1356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Liang, J.; Tian, Y.X.; Yang, F.; Zhang, J.P.; Skibsted, L.H. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chem.* 2009, 115, 1437–1442. [[CrossRef](#)]
45. Shi, J.; Qu, Q.; Kakuda, Y.; Xue, S.J.; Jiang, Y.; Koide, S.; Shim, Y.Y. Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *J. Food Compos. Anal.* 2007, 20, 603–608. [[CrossRef](#)]
46. Zanotta, D.; Puricelli, S.; Bonoldi, G. Cognitive effects of a dietary supplement made from extract of *Bacopa monnieri*, astaxanthin, phosphatidylserine, and vitamin E in subjects with mild cognitive impairment: A noncomparative, exploratory clinical study. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2014, 10, 225–230. [[CrossRef](#)]
47. Castelli, V.; Melani, F.; Ferri, C.; d'Angelo, M.; Catanesi, M.; Grassi, D.; Benedetti, E.; Giordano, A.; Cimini, A.; Desideri, G. Neuroprotective activities of bacopa, lycopene, astaxanthin, and

- vitamin B12 combination on oxidative stress-dependent neuronal death. *J. Cell. Biochem.* 2020, 121, 4862–4869. [[CrossRef](#)]
48. Rinaldi, P.; Polidori, M.C.; Metastasio, A.; Mariani, E.; Mattioli, P.; Cherubini, A.; Catani, M.; Cecchetti, R.; Senin, U.; Mecocci, P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2003, 24, 915–919. [[CrossRef](#)]
49. Viña, J.; Lloret, A.; Ortí, R.; Alonso, D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: Prevention of oxidative stress. *Mol. Asp. Med.* 2004, 25, 117–123. [[CrossRef](#)]
50. Tadokoro, K.; Ohta, Y.; Inufusa, H.; Loon, A.F.N.; Abe, K. Prevention of cognitive decline in Alzheimer's disease by novel antioxidative supplements. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1974. [[CrossRef](#)]
51. Grassi, D.; Ferri, C.; Desideri, G. Brain protection and cognitive function: Cocoa flavonoids as nutraceuticals. *Curr. Pharm. Des.* 2016, 22, 145–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Grassi, D.; Socci, V.; Tempesta, D.; Ferri, C.; De Gennaro, L.; Desideri, G.; Ferrara, M. Flavanol-Rich chocolate acutely improves arterial function and working memory performance counteracting the effects of sleep deprivation in healthy individuals. *J. Hypertens.* 2016, 34, 1298–1308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Jama, J.W.; Launer, L.J.; Witteman, J.C.M.; den Breeijen, J.H.; Breteler, M.M.; Grobbee, D.E.; Hofman, A. Dietary antioxidants and cognitive function in a population-based sample of older persons. *Am. J. Epidemiol.* 1996, 144, 275–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Masaki, K.H.; Losonczy, K.G.; Izmirlian, G.; Foley, D.J.; Ross,

- G.W.; Petrovitch, H.; Havlik, R.; White, L.R. Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology* 2000, 54, 1265–1272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kalmijn, S.; Feskens, E.J.M.; Launer, L.J.; Kromhout, D. Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am. J. Epidemiol.* 1997, 145, 33–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Morris, M.C.; Evans, D.A.; Bienias, J.L.; Tangney, C.C.; Wilson, R.S. Vitamin E and cognitive decline in older persons. *Arch. Neurol.* 2002, 59, 1125–1132. [[CrossRef](#)]
57. Berr, C.; Balansard, B.; Arnaud, J.; Roussel, A.M.; Alperovitch, A. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: The EVA study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2000, 48, 1285–1291. [[CrossRef](#)]
58. Grodstein, F.; Chen, J.; Willett, W.C. High-Dose antioxidant supplements and cognitive function in community-dwelling elderly women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 77, 975–984. [[CrossRef](#)]
59. Basambombo, L.L.; Carmichael, P.H.; Côté, S.; Laurin, D. Use of vitamin E and C supplements for the prevention of cognitive decline. *Ann. Pharmacother.* 2017, 51, 118–124. [[CrossRef](#)]
60. Zandi, P.P.; Anthony, J.C.; Khachaturian, A.S.; Stone, S.V.; Gustafson, D.; Tschanz, J.T.; Norton, M.C.; Welsh-Bohmer, K.A.; Breitner, J.C. Cache county study group. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: The Cache County Study. *Arch. Neurol.* 2004, 61, 82–88. [[CrossRef](#)]
61. Devore, E.E.; Grodstein, F.; van Rooij, F.J.; Hofman, A.; Stampfer, M.J.; Witteman, J.C.; Breteler, M.M. Dietary antioxidants

and long-term risk of dementia. *Arch. Neurol.* 2010, 67, 819–825.

[[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Engelhart, M.J.; Geerlings, M.I.; Ruitenberg, A.; van Swieten, J.C.; Hofman, A.; Witteman, J.C.; Breteler, M.M. Dietary Intake of antioxidants and risk of Alzheimer Disease. *JAMA* 2002, 287, 3223–3229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Heart Protection Study Collaborative Group. RC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002, 360, 23–33. [[CrossRef](#)]

64. Petersen, R.C.; Thomas, R.G.; Grundman, M.; Bennett, D.; Doody, R.; Ferris, S.; Galasko, D.; Jin, S.; Kaye, J.; Levey, A.; et al. Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 2379–2388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Yaffe, K.; Clemons, T.E.; McBee, W.L.; Lindblad, A.S.; Age-Related Eye Disease Study Research Group. Impact of antioxidants, zinc and copper on cognition in the elderly: A randomized controlled trial. *Neurology* 2004, 63, 1705–1707. [[PubMed](#)]

66. Kang, J.H.; Cook, N.; Manson, J.E.; Buring, J.E.; Grodstein, F. A randomized trial of vitamin E supplementation and cognitive function in women. *Arch. Intern. Med.* 2006, 166, 2462–2468. [[CrossRef](#)]

67. Luchsinger, J.A.; Tang, M.X.; Shea, S.; Mayeux, R. Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 2003, 60, 203–208. [[CrossRef](#)]

68. Kryscio, R.J.; Abner, E.L.; Caban-Holt, A.; Lovell, M.;

- Goodman, P.; Darke, A.K.; Yee, M.; Crowley, J.; Schmitt, F.A. Association of antioxidant supplement use and dementia in the prevention of Alzheimer's disease by vitamin E and Selenium trial (PREADViSE). *JAMA Neurol.* 2017, 74, 567–573. [[CrossRef](#)]
69. Grodstein, F.; Kang, J.H.; Glynn, R.J.; Cook, N.R.; Gaziano, J.M. A randomized trial of beta carotene supplementation and cognitive function in men: The Physicians' Health Study II. *Arch. Intern. Med.* 2007, 167, 2184–2190. [[CrossRef](#)]
70. Park, D.C.; Reuter-Lorenz, P. The adaptive brain: Aging and neurocognitive scaffolding. *Annu. Rev. Psychol.* 2009, 60, 173–196. [[CrossRef](#)]
71. Moscovitch, M.; Winocur, G. The neuropsychology of memory and aging. In *The Handbook of Aging and Cognition*; Salthouse, T.A., Craik, F.I.M., Eds.; Erlbaum: Hillsdale, NJ, USA, 1992; pp. 315–372.
72. Patrono, C.; Fitzgerald, G.A. Isoprostanes: Potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17, 2309–2315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Minuz, P.; Andrioli, G.; Degan, M.; Gaino, S.; Ortolani, R.; Tommasoli, R.; Zuliani, V.; Lechi, A.; Lechi, C. The F2-isoprostane 8-epiprostaglandin F2 increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 8, 1248–1256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Fontana, L.; Giagulli, C.; Minuz, P.; Lechi, A.; Laudanna, C. 8-Iso-PGF2 induces 2-integrin-mediated rapid adhesion of human polymorphonuclear neutrophils: A link between oxidative stress and ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*

2001, 21, 55–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Praticò, D. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment. A possible predictor of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 2002, 59, 972–976. [[CrossRef](#)]

76. Galasko, D.R.; Peskind, E.; Clark, C.M.; Quinn, J.F.; Ringman, J.M.; Jicha, G.A.; Cotman, C.; Cottrell, B.; Montine, T.J.; Thomas, R.G.; et al. Antioxidants for Alzheimer disease: A randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. *Arch. Neurol.* 2012, 69, 836–841. [[CrossRef](#)]