ANALISI DEI POLIFENOLI QUALI INIBITORI in vitro
DELL’AGGREGAZIONE DI TIPO AMILOIDE

Coordinatore:
Prof. GIANNI CAPPUGI

Docente guida:
Prof.ssa DONATELLA DEGL’INNOCENTI

Dottorando:
STEFANO GESTRI
ABSTRACT DELLA TESI

Amyloidosis encompasses a large group of diseases characterized by tissue deposition of proteins assembled in regular, normally antiparallel β-strands. Several proteins can form amyloid fibrils in vitro, suggesting that this aggregation process should be considered a general feature of polypeptides. Over twenty human proteic molecules, intact or fragmented, have resulted amyloidogenic in vivo, and connected with disorders such as Alzheimer’s, Parkinson’s and type II diabetes diseases. Amyloidoses are often divided into neurodegenerative disorders, non-neuropathic localized amyloidoses and systemic amyloidoses (due, for instance, to immunoglobulin light chains).

Human lysozyme is a bacteriolytic protein of 130 residues present in external secretions and in polymorphs and macrophages. There are five variants of this enzyme, and four of them have been associated with familial non-neuropathic systemic amyloidoses in which large quantities, sometimes kilograms, of aggregated protein accumulate in organs such as liver, kidney, and spleen.

Available at low cost, HEWL (hen egg white lysozyme, 129 amino acids) is a good model for studies on amyloid fibril formation. Identical to human form in a considerable part (40%) of its sequence, it can be easily fragmented in peptides prone to amyloid aggregation (for instance incubating its solutions 1 mM at pH 2.0 and 65 °C for about a week). In this study the HEWL and its 49-64 synthetic, slightly modified peptide (S in 64, instead of C) were used as model proteins to test in vitro the anti-amyloidogenic property of some polyphenols.

Polyphenols are nutraceuticals widely diffused in the human diet (wine, tea, nuts, berries, cocoa, etc), and used in the phytopharmaceutical industry for their antioxidant properties. Their absorption is generally fast (antocyanidins can be absorbed also at gastric level), and often they pass the blood-brain barrier carried by proteic transporters. According to their structure, they are divided in phenolic acids, flavonoids, stilbenes, and lignans. Recently several works pointed out
Polyphenols are able to exert a neuroprotective effect not simply connected to their antioxidant power. Some of these compounds were described as efficient in vitro inhibitors of amyloid fibril formation, especially using the human Aβ-peptide as experimental model. In any case up to date polyphenols anti-amyloidogenic effects were never studied on HEWL or its 49-64 peptide.

For these reasons we selected from local plants and vegetal foods twenty-four phenolic acids, flavonoids or stilbenes, trying to correlate their structural features with the inhibitory effects, at equimolar concentrations, on the amyloid aggregation of the proteic models. Using the HEWL peptide, diluted solutions (0.2 mM) were incubated at pH 4.0 and 37 °C for about a day.

Generally fibrils formation was assessed by fluorescence (tioflavin T assay) and confirmed by atomic force microscopy (AFM). The effects of the most active polyphenols were investigated also by means of other analytical techniques (Congo red assay, circular dichroism or CD, dynamic light scattering or DLS...). When necessary substances were solubilized using small amounts of dimethyl sulfoxide. The chemical stability of the molecules was verified, by HPLC/DAD/MS, in the applied experimental conditions.

The kinetics of HEWL amyloid aggregation resembled a sigmoidal curve with a lag phase of 2-3 days. The 49-64 peptide showed an exponential kinetics of about 10 hours. Tannic acid revealed as the most active molecule in both proteic models. The first part of the kinetic curve was in any case conserved. Using the HEWL, a high inhibition was also obtained by means of anthocyanins such as keracyanin. Anthocyanins are flavonoids which had never been tested against amyloidosis. AFM verified the absence of oligomeric species, generally referred to as cytotoxic. The presence of two distinct benzene rings, with generally two phenolic groups in adjacent positions, revealed the main requisite for the anti-amyloidogenic activity.

In order to investigate the importance of hydrogen bonds in this field, a study of molecular modeling was conducted on a large part of the tested substances. These simulations confirmed the role of the two phenolic rings as hydrogen donors and pointed out the importance of a third central group acting as proton acceptor in another hydrogen bond. Also the distance between one of the donor groups and the acceptor group revealed itself essential for the anti-amyloidogenic effect.

We also tested the anti-amiloidogenic activity of moistures of two polyphenols (each of them 1 mM) on HEWL. Globally this pointed out additive effects between molecules belonging to different chemical classes (for instance hydroxycinnamic acids and flavonoids).

According to these results, we selected also hydroalcoholic or alcoholic vegetable extracts containing some of the studied polyphenols or molecules with a similar structure. When tested on HEWL amyloid aggregation they showed high additive effects of different fenolic compounds. In particular there was a strong inhibition of the process when we used extracts containing anthocyanins (cherry and red chicory extracts).

Our results suggest possible future uses of polyphenols, in nutraceutical or pharmaceutical forms, for amyloidosis prevention or treatment.
**ABSTRACT**

1. **INTRODUZIONE**  
1.1. L’AGGREGAZIONE AMILOIDE DELLE PROTEINE  
   1.1.1. *Folding e misfolding* proteico  
   1.1.2. Caratterizzazione delle strutture amiloidi  
   1.1.3. Intermedi nella formazione di fibrille amiloidi  
   1.1.4. Citotossicità di intermedi e fibrille amiloidi  
1.2. LE PATOLOGIE DA MISFOLDING PROTEICO E LE AMILOIDOSI  
1.3. IL LISOZIMA NEL PROCESSO AMILOIDOGENICO  
   1.3.1. Il lisozima di pollo  
1.4. I POLIFENOLI  
   1.4.1. Classificazioni  
   1.4.2. Funzioni e biosintesi nelle piante  
   1.4.3. Metodi di analisi  
   1.4.4. Assunzione con gli alimenti  
   1.4.5. Assorbimento  
   1.4.6. Metabolismo  
   1.4.7. Attività biologiche dei polifenoli  
      1.4.7.1. *Attività anti-amiloidogeniche*  
   1.4.8. Interazioni con proteine, glicidi, vitamine e minerali  
   1.4.9. Tossicità  
1.5. SCOPO DELLA TESI  

2. **MATERIALI**

3. **METODI**  
3.1. DOSAGGIO DELLE PROTEINE (METODO BRADFORD)  
3.2. ELETTROFORESI IN CONDIZIONI DENATURANTI  
3.3. FORMAZIONE DI FIBRILLE AMILOIDI  
3.4. VALUTAZIONE DELLA COMPARSA DI FIBRILLE AMILOIDI  
   3.4.1. Dosaggio fluorimetrico tramite tiofluavina T  
      3.4.1.1. Leggi cinetiche  
   3.4.2. Test del Congo red  
   3.4.3. Dicroismo circolare  
   3.4.4. Dynamic light scattering  
3.5. ANALISI MORFOLOGICA DELLE FIBRILLE AMILOIDI  
3.6. SOLUBILIZZAZIONE DEI POLIFENOLI E LORO STUDIO PRELIMINARE  
3.7. VERIFICA DELLA STABILITÀ DEI POLIFENOLI NELLE CONDIZIONI D’IMPIEGO  
3.8. AGGREGAZIONE AMILOIDE IN PRESENZA DI POLIFENOLI  
3.9. VALUTAZIONE DELLA DOSE-DIPENDENZA DEGLI EFFETTI ANTI-AMILOIDOGENICI  
3.10. TEST DI DISAGGREGAZIONE DELLE FIBRILLE AMILOIDI
ABSTRACT

Amyloidosis encompasses a large group of diseases characterized by tissue deposition of proteins assembled in regular, normally antiparallel β-strands. Several proteins can form amyloid fibrils in vitro, suggesting that this aggregation process should be considered a general feature of polypeptides. Over twenty human proteic molecules, intact or fragmented, have resulted amyloidogenic in vivo, and connected with disorders such as Alzheimer’s, Parkinson’s and type II diabetes diseases. Amyloidoses are often divided into neurodegenerative disorders, non-neuropathic localized amyloidoses and systemic amyloidoses (due, for instance, to immunoglobulin light chains).

Human lysozyme is a bacteriolytic protein of 130 residues present in external secretions and in polymorphs and macrophages. There are five variants of this enzyme, and four of them have been associated with familial non-neuropathic systemic amyloidoses in which large quantities, sometimes kilograms, of aggregated protein accumulate in organs such as liver, kidney, and spleen.

Available at low cost, HEWL (hen egg white lysozyme, 129 amino acids) is a good model for studies on amyloid fibril formation. Identical to human form in a considerable part (40%) of its sequence, it can be easily fragmented in peptides prone to amyloid aggregation (for instance incubating its solutions 1 mM at pH 2.0 and 65 °C for about a week). In this study the HEWL and its 49-64 synthetic, slightly modified peptide (S in 64, instead of C) were used as model proteins to test in vitro the anti-amyloidogenic property of some polyphenols.

Polyphenols are nutraceuticals widely diffused in the human diet (wine, tea, nuts, berries, cocoa, etc), and used in the phytopharmaecutical industry for their antioxidant properties. Their absorption is generally fast (antocyanidins can be absorbed also at gastric level), and often they pass the blood-brain barrier carried by proteic transporters. According to their structure, they are divided in phenolic acids, flavonoids, stilbenes, and lignans. Recently several works pointed out polyphenols are able to exert a neuroprotective effect not simply connected to their antioxidant power. Some of these compounds were described as efficient in vitro inhibitors of amyloid fibril formation, especially using the human Aβ-peptide as experimental model. In any case up to date polyphenols anti-amyloidogenic effects were never studied on HEWL or its 49-64 peptide.

For these reasons we selected from local plants and vegetal foods twenty-four phenolic acids, flavonoids or stilbenes, trying to correlate their structural features with
the inhibitory effects, at equimolar concentrations, on the amyloid aggregation of the proteic models. Using the HEWL peptide, diluted solutions (0.2 mM) were incubated at pH 4.0 and 37 °C for about a day.

Generally fibrils formation was assessed by fluorescence (tioflavin T assay) and confirmed by atomic force microscopy (AFM). The effects of the most active polyphenols were investigated also by means of other analytical techniques (Congo red assay, circular dichroism or CD, dynamic light scattering or DLS...). When necessary substances were solubilized using small amounts of dimethyl sulfoxide. The chemical stability of the molecules was verified, by HPLC/DAD/MS, in the applied experimental conditions.

The kinetics of HEWL amyloid aggregation resembled a sigmoidal curve with a lag phase of 2-3 days. The 49-64 peptide showed an exponential kinetics of about 10 hours. Tannic acid revealed as the most active molecule in both proteic models. The first part of the kinetic curve was in any case conserved. Using the HEWL, a high inhibition was also obtained by means of anthocyanins such as keracyanin. Anthocyanins are flavonoids which had never been tested against amyloidosis. AFM verified the absence of oligomeric species, generally referred to as cytotoxic. The presence of two distinct benzene rings, with generally two phenolic groups in adjacent positions, revealed the main requisite for the anti-amyloidogenic activity.

In order to investigate the importance of hydrogen bonds in this field, a study of molecular modeling was conducted on a large part of the tested substances. These simulations confirmed the role of the two phenolic rings as hydrogen donors and pointed out the importance of a third central group acting as proton acceptor in another hydrogen bond. Also the distance between one of the donor groups and the acceptor group revealed itself essential for the anti-amyloidogenic effect.

We also tested the anti-amiloidogenic activity of moistures of two polyphenols (each of them 1 mM) on HEWL. Globally this pointed out additive effects between molecules belonging to different chemical classes (for instance hydroxycinnamic acids and flavonoids).

According to these results, we selected also hydroalcoholic or alcoholic vegetable extracts containing some of the studied polyphenols or molecules with a similar structure. When tested on HEWL amyloid aggregation they showed high additive effects of different fenolic compounds. In particular there was a strong inhibition of the process when we used extracts containing anthocyanins (cherry and red chicory extracts).

Our results suggest possible future uses of polyphenols, in nutraceutical or pharmaceutical forms, for amyloidosis prevention or treatment.
1. INTRODUZIONE

1.1. L'AGGREGAZIONE AMILOIDE DELLE PROTEINE

Negli ultimi anni un numero sempre maggiore di patologie è stato correlato al fenomeno dell’aggregazione amiloide delle proteine. Tale processo consiste nella deposizione tissutale, all’interno o all’esterno delle cellule, di strutture proteiche supramolecolari organizzate in foglietti $\beta$. In genere il tutto si evolve fino alla formazione di fibrille mature, il cui asse risulta perpendicolare ai filamenti $\beta$ allineati (Fig. 1.1). Data la specifica posizione dei filamenti si parla nel complesso di strutture cross $\beta$.

Figura 1.1. Fibrilla derivante dal dominio C-terminale 218-289 della proteina prionica fungina HET-s [riadattamento da Chiti F et al. 2006].

Il termine amiloide fu introdotto nel 1854 dal medico tedesco Rudolph Virchow, che notò come anomali corpi tissutali del cervello si colorassero in blu pallido se trattati con iodio, e in violettto dopo la successiva aggiunta di acido solforico. Lo studioso pensò si trattasse di cellulosa o amido (a quei tempi la distinzione fra le due sostanze non era chiara). La parola amido deriva dal latino “amylum”, che, traducendo il termine greco “amylon”, indica un materiale “non macinato”. Nel 1959 Friedereiche e Kekulè dimostrarono, valutandone l’alto contenuto in azoto, che la sostanza amiloide contiene proteine [Sipe JD et al. 2000]. In effetti, in vivo gli aggregati amiloidi risultano costituiti da proteine unite ad apprezzabili quantità di glicidi.

Oggi giorno è ormai accertato che tutte le fibrille amiloidi, per quanto originate da proteine o peptidi anche molto diversi fra loro, hanno notevoli somiglianze
morfologiche e strutturali. Poiché inoltre si conoscono anche aggregati amiloidi apparentemente non connessi a patologie (né animali, né vegetali), si è già ipotizzato che la capacità di formare fibrille sia una proprietà generale di peptidi e proteine, dovuta sostanzialmente agli stabili ponti a idrogeno che possono istaurarsi fra le catene contenenti i legami peptidici [Vendruscolo M et al. 2005]. Solo sequenze ricche in prolina avrebbero difficoltà ad aggregare, poiché tale aminoacido non può fornire un legame a idrogeno con un gruppo accettore. Negli ultimi anni sono stati elaborati anche algoritmi specifici per il calcolo della propensione ad aggregare di una qualsiasi sequenza aminoacidica [Pawar AP et al. 2005]. Il computo si basa su idrofobicità, tendenza a dare struttura secondaria α o β ed eventuale carica dei singoli aminoacidi, ciascuno rapportato però a un contesto molecolare che comprende i tre aminoacidi precedenti e i tre successivi. Il principale parametro proposto in letteratura è detto $Z_{agg}$, e generalmente indica una marcata propensione all’aggregazione amiloide quando risulta superiore a 1. Un ulteriore parametro recentemente presentato, $S_{agg}$, sembra inoltre correlare abbastanza bene con la velocità del processo, dato che esalta il contributo degli stretch d’aminoacidi maggiormente amiloidogenici [Lashuel HA et al. 2002].

1.1.1. Folding e misfolding proteico

cinetico invece è ancora da chiarire il paradosso di Levinthal (1968), secondo il quale una proteina che per raggiungere la sua forma nativa passasse attraverso tutte le possibili conformazioni necessiterebbe di un tempo superiore all'età dell'universo.

Il mancato folding corretto di una proteina prende il nome di misfolding o aggregazione [Dobson CM 2004]. Il processo, che attraverso tutta una serie di intermedi può condurre alla formazione di fibrille amiloidi, è attualmente descritto, nella cosiddetta “nuova visione del folding”, attraverso il modello dell’*energy landscape* [Matagne A et al. 1998]. Si tratta di una frastagliata superficie energetica la cui forma globale ricorda quella di un imbuto. Al fondo di tale struttura si trova appunto la fibrilla amiloide, oramai ampiamente caratterizzata (Fig. 1.2).

![Figura 1.2. Esempio di moderno modello termodinamico per il folding e l'aggregazione delle proteine [riadattamento da Jahn TR et al. 2007].](image)

In realtà esistono altre possibili rappresentazioni di energy landscape: per esempio in un sistema di tre assi cartesiani si riporta spesso in verticale l’energia libera e lungo le altre due direzioni il numero dei contatti nativi all'interno dei domini α e β [Dinner AR et al. 2000].
1.1.2. Caratterizzazione delle strutture amiloidi

In generale vi sono tre condizioni che, se soddisfatte, permettono di definire un aggregato proteico fibrilla amiloide: la birifrangenza in verde dopo la colorazione con Congo red (CR), la morfologia fibrillare (cioè molto allungata) e la struttura secondaria con predominanza di foglietti $\beta$ [Nilsson MR 2004]. Dal punto di vista sperimentale, comunque, le tecniche analitiche che possono condurre a questa classificazione sono svariate.

L’interazione con il Congo red è stata descritta oltre cinquanta anni fa [Missmahl HP et al. 1954]. Più recentemente essa è stata sfruttata anche in assenza di polarizzazione della luce incidente, poiché i legami a ponte d’idrogeno che s’instaurano determinano un red-shift (da 490 a 540 nm) nello spettro d’assorbimento del colorante. Anche il fluoroforo tioflavina T (ThT) è in grado di legarsi selettivamente alle fibrille amiloidi: ne deriva un red-shift nel massimo del suo spettro di eccitazione, e la comparsa del relativo picco di emissione a 485 nm.

La morfologia delle fibrille amiloidi è stata osservata per la prima volta al microscopio elettronico negli anni ’50. Sono state così descritte strutture filamentose con diametri intorno a 10 nm. Studi successivi su fibrille ex vivo hanno evidenziato la presenza, in strutture di 7,5-8 nm di diametro e con lunghezza micrometrica, di 5-6 protofilamenti (con diametri di 2,5-3,5 nm). Un’immagine di tali lavori è riportata in Fig. 1.3. La microscopia elettronica, e in particolare quella a trasmissione (TEM), in cui un fascio d’elettroni accelerati in uno spazio vuoto passa attraverso una sottile sezione del preparato, e poi subisce deviazioni ad opera di due campi magnetici laterali, fornendo così un’immagine ingrandita in bianco e nero, ha un ottimo potere risolutivo (0,2 nm). Una variante ancora più recente di questa tecnica è stata la scanning transmission electron microscopy (STEM). L’aggregazione amiloide è stata talora indagata anche tramite la crio-microscopia elettronica (cryo-EM).
Negli ultimi anni un altro tipo di microscopia, quella a forza atomica (AFM), è stata adattata allo studio delle strutture amiloidi. La tecnica, nata nel 1986 con il microscopio a scansione di sonda (SPM) di Binnig, Quate e Gerber, ha un potere risolutivo appena superiore alla TEM, ma in molti casi ha offerto immagini particolarmente nitide dei vari aggregati amiloidi, e soprattutto ne ha permesso un’attendibile misura in altezza (ovvero in diametro), e quindi la relativa classificazione in fibrille, protofilamenti o altro. In alcuni casi, per esempio con il peptide-Aβ, coinvolto nella genesi del morbo di Alzheimer, si sono potute ottenere immagini anche delle specie oligomere solubili che iniziano il processo di aggregazione amiloide [Mastrangelo IA et al. 2006]. Informazioni meno dettagliate sul diametro delle varie particelle presenti possono ottenersi anche dal dynamic light scattering (DLS), tecnica che sfrutta la diffusione della luce da parte del materiale in dispersione colloidale.

Per la determinazione della struttura secondaria delle fibrille amiloidi la tecnica più importante usata in passato è stata la diffrazione dei raggi X. In questo caso il campione (solido) viene esposto ad un fascio di raggi X con direzione perpendicolare all’asse della fibrilla. Le riflessioni ottenute si distinguono in meridionali (se giacciono parallele all’asse fibrillare) o equatoriali (se a 90°). Le fibrille amiloidi presentano riflessioni meridionali a distanze di 4,7 Å e riflessioni equatoriali ripetute ogni 8-11 Å [Sunde M et al. 1997]. La ripetizione strutturale dei 4,7 Å circa corrisponde alla

**Figura 1.3.** Esempio di fibrille amiloidi osservate tramite il microscopio elettronico [riadattamento da Shirahama T et al. 1967].
distanza tra i filamenti \(\beta\) adiacenti, mentre l’altra spaziatura rappresenta la distanza tra i foglietti \(\beta\) all’interno di ogni protofilamento (Fig. 1.4).

**Figura 1.4.** Correlazioni di base fra diffrazione dei raggi X e distanze fra filamenti e foglietti \(\beta\) in una fibrilla amiloide. La spaziatura di 9,6 Å è ricavabile solo dai pattern di diffrazione più nitidi [Serpell LC 2000].

In genere i foglietti \(\beta\) contengono una mescolanza di filamenti \(\beta\) antiparalleli e paralleli. In anni più recenti nuove tecniche hanno contribuito alla caratterizzazione strutturale delle fibrille amiloidi: la risonanza magnetica allo stato solido (SSNMR) e lo spin labeling sito-specifico accoppiato alla risonanza paramagnetica elettronica (SDSL-EPR). Il primo metodo d’indagine sfrutta le interazioni fra spin nucleari e campi magnetici, che allo stato solido sono strettamente influenzate dall’anisotropia del campione: i campi magnetici generati dai nuclei in rotazione possono entrare in risonanza o meno, a seconda del proprio intorno molecolare, con campi d’intensità variabile applicati esternamente. La seconda tecnica sfrutta invece i piccoli campi magnetici originati dallo spin elettronico: in pratica si aggancia al campione, in punti predeterminati, una sonda (probe) paramagnetica, e si osserva poi la risonanza con deboli campi magnetici esterni. Queste indagini ad alta risoluzione hanno permesso di costruire modelli ben precisi della struttura di alcune proteine amiloidi. Un esempio di queste rappresentazioni tridimensionali è riportato in Fig. 1.5.
Figura 1.5. Struttura ipotizzata per l’amilina umana, nota anche come human islet amyloid polipeptide (hIAPP), e coinvolta nella genesi del diabete mellito di tipo II (non insulino-dipendente). I tre filamenti $\beta$ sono costituiti dagli aminoacidi 12-17, 22-27 e 31-37.

In pratica si è visto che ogni fibrilla amiloide ha un diametro di circa 7-13 nm, ma deriva dal superavvogigimento di due-sei protofilamenti di 2-5 nm di diametro. I vari protofilamenti sono a loro volta costituiti da uno o più foglietti $\beta$ che si estendono parallelamente all’asse fibrillare. Gli strand $\beta$ sono collegati fra loro da loop di un ridotto numero di aminoacidi. A livello quali-quantitativo la graduale comparsa di struttura $\beta$ negli aggregati proteici può comunque essere valutata anche con altre apparecchiature meno costose. Ad esempio può essere sfruttato il dicroismo circolare (circular dichroism o CD): uno spettropolarimetro invia sul campione proteico (otticamente attivo per la presenza di centri chirali) luce polarizzata, analizzandone poi il diverso assorbimento in termini di componenti polarizzate circolarmente. Fra le varie informazioni ottenibili si ricorda il segnale a 216 nm (nel far UV, cioè la regione compresa fra 190 e 250 nm), che evidenzia il progressivo incremento percentuale di struttura $\beta$ nelle molecole che stanno aggregando. Qualora si disponga di maggiori quantitativi di proteina (intorno al mg), può essere utilizzata la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), che valuta l’assorbimento in campi energetici coinvolti gli stati vibrazionali del sistema: in questo caso il raggio incidente passa attraverso un interferometro (anziché un monocromatore), e poi si ha l’interazione con il campione, purché questo abbia vibrazioni che modificano il proprio momento dipolare, permettendo così la risonanza con il campo elettromagnetico delle radiazioni selezionate. La zona dello spettro fra 1700 e 1600 cm$^{-1}$, detta ammide I e generata
sostanzialmente dallo *stretching* dei carbonili dello scheletro (*backbone*) proteico, può essere sottoposta a opportuna deconvoluzione tramite software [Zandomeneghi G *et al.* 2004]. In alcuni casi, per risparmiare campione, si possono registrare spettri sfruttando la tecnica della riflessione totale interna attenuata (ATR).

### 1.1.3. Intermedi nella formazione di fibrille amiloidi

Tutte queste metodiche analitiche hanno permesso di chiarire anche la struttura di alcuni degli intermedi che conducono le proteine native alla formazione di fibrille amiloidi. In tale settore si sono rivelati assai utili esperimenti di aggregazione amiloide *in vitro*. Da vari anni, infatti, non solo si è riusciti a ricreare condizioni analoghe a quelle che conducono *in vivo* ad aggregati amiloidi, ma si sono scoperte proteine che, pur non risultando correlate a patologie, possono essere spinte alla formazione di fibrille. I primi studi in proposito, con la subunità proteica PI3-SH3 (si veda il secondo rigo della Tab. 1.1), risalgono a circa un decennio fa [Guijarro JI *et al.* 1998].

![Table 1.1](image)

**Tabella 1.1.** Alcune proteine non connessse ad amiloidosi che possono originare fibrille in opportune condizioni sperimentali [riadattamento da Stefani M *et al.* 2003].

Abbastanza recentemente sono state prodotte fibrille amiloidi anche da poli-L-lisina, poli-L-treonina e poli-L-acido glutammico [Fändrich M *et al.* 2002]. In genere
nelle proteine globulari la formazione di fibrille diviene possibile quando le catene laterali idrofobiche vengono in parte esposte al solvente: l’aggregazione sembra pertanto richiedere delle condizioni di parziale unfolding [Monti M et al. 2004]. In alcuni casi è addirittura necessaria una frammentazione preliminare. Fra gli agenti più usati per innescare la produzione di fibrille vi è il pH acido: lo si impiega ad esempio con la PI3-SH3, il lisozima e la transtiretina (proteina associata ad amiloidosi sistemiche umane). Nel caso della PI3-SH3, le cui fibrille si formano a pH 2, a temperatura ambiente o anche a 4 °C, si ottiene inizialmente uno stato monomerico abbastanza destrutturato (A state), ma che contiene ancora un nucleo (core) idrofobico. In ogni modo l’aggregazione amiloide può coinvolgere anche proteine o peptidi che nel loro stato nativo sono unfolded: è quanto accade ad esempio con i peptidi A\textsubscript{β}, l’\(\alpha\)-sinucleina (connessa al morbo di Parkinson), la proteina tau (implicata nella genesi dell’Alzheimer) e il frammento costitutivo dell’amilina. Con quest’ultimo peptide si assiste alla formazione di un intermedio transiente simile agli stati parzialmente destrutturati detti molten globule [Kayed R et al. 1999]. La Fig. 1.6 offre un quadro generale delle varie specie da cui possono originarsi le fibrille amiloidi.

![Figura 1.6. Precursori e intermedii coinvolti nell’amiloidogenesi. (ds) = domain swapping; (sa) = strand association; (ee) = edge-edge association; (bs) = \(\beta\)-strand stacking](riadattamento da Jahn TR et al. 2007)]

1.1.4. Citotossicità di intermedi e fibrille amiloidi

Indubbiamente il meccanismo di formazione delle fibrille amiloidi è abbastanza complesso e variegato. Spesso la fase d’accrescimento esponenziale è preceduta da una fase di latenza (lag phase), la cui durata dipende dalla concentrazione del campione: essa è determinata dalle frammentazioni preliminari (ove presenti) e da processi di nucleazione analoghi a quelli dell’ottenimento di cristalli in ambiente

Già da alcuni anni è noto come, almeno nel morbo di Alzheimer e in quello di Parkinson, gli aggregati solubili (aggregati amorfi, oligomeri, protofibrille) che precedono la formazione di fibrille rappresentino le specie maggiormente citotossiche in campo amiloide [Walsh DM et al. 2004; Townsend M et al. 2007]. Poiché questi aggregati espongono al solvente regioni prone ad aggregare, è probabile che essi riescano a interagire con il doppio strato fosfolipidico (di spessore compreso fra 3 e 8 nm) delle membrane cellulari, scompaginandone la funzionalità [Stefani M et al. 2003; Malisauskas M et al. 2005]. Si è ad esempio ipotizzato che alcune di queste specie vengano a formare canali responsabili di un abnorme ingresso di calcio nelle cellule, dando così il via a processi di stress ossidativo che conducono in genere all’apoptosi. Del resto gli oligomeri in taluni esperimenti hanno determinato una netta attivazione delle caspasi [Gharibyan AL et al. 2007]. Va inoltre messo in evidenza come l’invecchiamento cellulare comporti in genere una minore protezione dai vari precursori amiloidi. Sulla base di queste osservazioni la formazione di fibrille potrebbe anche essere vista, almeno in vivo, come una specifica strategia dei tessuti per sequestrare specie citotossiche. Qualche recente lavoro ha comunque messo in luce effetti citotossici anche a livello di fibrille mature [Gharibyan AL et al. 2007].
1.2. LE PATOLOGIE DA MISFOLDING PROTEICO E LE AMILOIDOSI

Il termine amiloidosi raggruppa un elevato numero di patologie facenti capo al misfolding proteico, ma caratterizzate nella fattispecie dalla degenerazione amiloide di una o più molecole, che formano le fibrille (il termine è usato per lo più se la localizzazione è extracellulare) oppure le cosiddette “inclusioni intracellulari”. Altri tipi di misfolding sono responsabili di ridotta disponibilità proteica (si veda il caso della fibrosi cistica, dove compare una variante del canale del cloro o CFTR) o di un anomalo trafficking (come accade ad esempio nell’enfisema polmonare a insorgenza precoce, in cui l’α₁-antitripsina polimerizza e non si sposta dal fegato ai polmoni per inibirne l’elastasi). Negli ultimi anni le amiloidosi sono state suddivise in tre categorie: neurodegenerative, localizzate non-neuropatiche e sistemiche non-neuropatiche. Nel primo gruppo rientrano patologie a notevole impatto sociale, quali il morbo di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), le encefalopatie spongiformi, la sclerosi amiotrofica laterale (ALS) o malattia di Lou Gehrig, la corea di Huntington. Nel secondo gruppo si ritrovano il diabete di tipo II, la cataratta ecc. Nel terzo gruppo abbiamo infine l’amiloidosi correlata all’emodialisi, l’amiloidosi da lisozima, l’amiloidosi da catene leggere delle immunoglobuline (AL) [Comenzo RL 2007]. Di fatto più di quaranta patologie umane sono state associate all’amiloidosi. Un elenco delle principali è riportato in Tab. 1.2. Data la notevole incidenza sociale di questo gruppo di malattie, negli ultimi anni la ricerca nel settore, anche a livello di terapie sperimentali, ha registrato un notevole sviluppo [Gillmore JD et al. 2006]. Forse i maggiori sforzi sono stati indirizzati, anche se con modesto successo, verso la cura del morbo di Alzheimer [Hamaguchi T et al. 2006].

Fra le proteine che, intere o frammentate, risultano coinvolte in patologie amiloidi alcune sono state da tempo impiegate come sistemi modello per studiare il fenomeno, sia in vitro che su cellule o animali: il peptide Aβ, l’α-sinucleina, l’amilina.
<table>
<thead>
<tr>
<th>Proteina Amiloide</th>
<th>Precursores</th>
<th>Sistemica/Localizzata</th>
<th>Sindrome o tessuto coinvolto</th>
<th>Organi coinvolti</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>AL</td>
<td>Catena leggera delle immunoglobuline</td>
<td>S, L</td>
<td>Primaria Associta a mieloma</td>
<td>Rene, cuore, fegato, SNP, SNA</td>
</tr>
<tr>
<td>ATTR</td>
<td>Transtiretina</td>
<td>S</td>
<td>Sistemica senile</td>
<td>SNP, Cuore, SNA</td>
</tr>
<tr>
<td>Aβ2M</td>
<td>β2-microglobulina</td>
<td>S</td>
<td>Emodialisi cronica</td>
<td>Articolazioni, ossa</td>
</tr>
<tr>
<td>AA</td>
<td>(Apo)AA sierica</td>
<td>S</td>
<td>Secondaria, reattiva a flogosi cronica</td>
<td>Rene, fegato, SNA</td>
</tr>
<tr>
<td>AApA-I</td>
<td>Apolipoproteina A-I</td>
<td>S</td>
<td>Familiare</td>
<td>Fegato, rene, cuore, testicolo</td>
</tr>
<tr>
<td>AApA-II</td>
<td>Apolipoproteina A-II</td>
<td>S</td>
<td>Familiare</td>
<td>Rene, cuore</td>
</tr>
<tr>
<td>AGel</td>
<td>Gelsolina</td>
<td>S</td>
<td>Familiare</td>
<td>SNP, nervi cranici, cute</td>
</tr>
<tr>
<td>ALys</td>
<td>Lisozima</td>
<td>S</td>
<td>Familiare</td>
<td>Rene, fegato e milza</td>
</tr>
<tr>
<td>AFib</td>
<td>Catena-α del fibrinogeno</td>
<td>S</td>
<td>Familiare</td>
<td>Rene</td>
</tr>
<tr>
<td>ACys</td>
<td>Cistatina C</td>
<td>S</td>
<td>Familiare</td>
<td>SNC</td>
</tr>
<tr>
<td>ABri</td>
<td>ABriPP</td>
<td>L</td>
<td>Demenza familiare</td>
<td>SNC</td>
</tr>
<tr>
<td>ADan</td>
<td>ADanPP</td>
<td>L</td>
<td>Demenza familiare</td>
<td>SNC</td>
</tr>
<tr>
<td>Aβ</td>
<td>Proteina precursore Aβ (AβPP)</td>
<td>L</td>
<td>Malattia di Alzheimer, senilità, angiopatia cerebrale amiloide</td>
<td>SNC</td>
</tr>
<tr>
<td>AprP</td>
<td>Proteina prionica</td>
<td>L</td>
<td>Encefalopatia spongiforme</td>
<td>SNC</td>
</tr>
<tr>
<td>ACal</td>
<td>(Pro)calcitonina</td>
<td>L</td>
<td>Tumori della tiroide a cellule C</td>
<td>Tiroide</td>
</tr>
<tr>
<td>AIAPP</td>
<td>Islet amyloid polypeptide</td>
<td>L</td>
<td>Isole di Langerhans, Insulinomi</td>
<td>Pancreas</td>
</tr>
<tr>
<td>AANF</td>
<td>Fattore natriuretico atriale</td>
<td>L</td>
<td>Atri cardiaci</td>
<td>Cuore</td>
</tr>
<tr>
<td>Apro</td>
<td>Prolattina</td>
<td>L</td>
<td>Invecchiamento ipofisario, Prolattinoma</td>
<td>Ipofisi</td>
</tr>
<tr>
<td>AIns</td>
<td>Insulina</td>
<td>L</td>
<td>Iatrogena</td>
<td>Sedi di iniezione</td>
</tr>
<tr>
<td>Amed</td>
<td>Lactaderina</td>
<td>L</td>
<td>Senile aortica, media</td>
<td>Aorta</td>
</tr>
<tr>
<td>Aker</td>
<td>Cherato-epitelina</td>
<td>L</td>
<td>Cornea; Familiare</td>
<td>Cornea</td>
</tr>
<tr>
<td>A(bn) da denominare</td>
<td>Tumori di Pindborg</td>
<td>L</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ALac</td>
<td>Lattoferrina</td>
<td>L</td>
<td>Cornea; Familiare</td>
<td>Cornea</td>
</tr>
</tbody>
</table>

SNA, sistema nervoso autonomo; SNP, sistema nervoso periferico; SNC, sistema nervoso centrale.

**Tabella 1.2.** Principali amiloidosi umane e proteine o peptidi coinvolti.
1.3. IL LISOZIMA NEL PROCESSO AMILOIDOGENICO

Il lisozima umano è un enzima batteriolitico (EC 3.2.1.17) scoperto casualmente nel 1922 da Alexander Fleming. Lo studioso coniò il termine lisozima per indicare contemporaneamente la capacità di lisare i batteri (di fatto idrolizza i legami β-1,4 glicosidici fra acido N-acetilmuramico e N-acetilglucosamina del peptidoglicano) e la natura enzimatica. La proteina in questione è presente nelle secrezioni delle mucose e in alcuni tipi di globuli bianchi (granulociti, monociti e macrofagi). Essa è costituita da 130 aminoacidi, organizzati in quattro α-eliche (A-D), un'elica 3_10 e un foglietto β antiparallelo [Merlini G et al. 2005]. Il dominio α e il dominio β sono collegati da uno dei quattro ponti disolfuro, quello 77-95 (Fig. 1.7).

1. INTRODUZIONE

I pazienti che soffrono di amiloidosi da lisozima sono tutti eterozigoti. La patologia si sviluppa lentamente, ma porta in genere a morte entro i 50 anni. L’unico trattamento efficace, anche se non risolutivo, risulta il trapianto degli organi danneggiati, come ad esempio i reni [Hawkins PN 2003].

Il lisozima umano costituisce una buona proteina modello per lo studio delle amiloidosi. Infatti in opportune condizioni sperimentali (bassi valori di pH, alta temperatura, moderate concentrazioni di denaturanti) anche la proteina WT (wild type), così come la variante non amiloidogenica T70N, forma fibrille amiloidi. Sempre in vitro le varianti patogenetiche I56T e D67H aggregano ancora più facilmente. La termodinamica e la cinetica del processo di aggregazione amiloide sono in questo caso abbastanza note, così come la struttura delle fibrille generate [Frare E et al. 2006].

In ogni modo anche il lisozima proveniente da altre specie animali (ad esempio dal cavallo o dal pollo) può essere spinto in vitro a formare fibrille amiloidi [Malisauskas M et al. 2005; Frare E et al. 2004].

1.3.1. Il lisozima di pollo

Il lisozima di albume di uovo di pollo (hen egg white lysozyme, o HEWL) è una proteina globulare costituita da 129 aminoacidi (peso molecolare 14,3 kDa), che si strutturano in 4 α-eliche, A, B, C, e D, e 3 filamenti β, di cui i primi due antiparalleli (Fig. 1.8).

![Figura 1.8. Rappresentazione tridimensionale dell'HEWL. I quattro ponti disolfuro sono colorati in giallo [Frare E et al. 2004].](image-url)
La molecola è identica al lisozima umano per una discreta percentuale della sua sequenza (40%). Essa non forma fibrille amiloidi in vivo [Sethuraman A et al. 2005]. Tuttavia può essere facilmente frammentata in peptidi con notevole tendenza all’aggregazione amiloide. Infatti ad alte temperature e bassi valori di pH nelle sue soluzioni compaiono peptidi corrispondenti a parti del suo dominio β e all’intera elica C (Fig. 1.9). Tali frammenti, originati per lo più da rottura di legami Asp-X, sono tra l’altro simili alle regioni delle varianti Ile56Thr e Asp67His del lisozima umano che formano aggregati amiloidi, e nel giro di pochi giorni si riorganizzano in fibrille mature. Lavorando a pH 2,0 e 65 °C le fibrille risultano costituite prevalentemente da peptidi della regione 49-101 della proteina nativa.

La formazione di fibrille può essere ottenuta anche a pH neutro in presenza di agenti denaturanti quali il trifluoroetanolo o l’etanolo [Cao A et al. 2004]. In opportune condizioni si potrebbe utilizzare anche un’alta pressione idrostatica. In generale la riduzione dei quattro ponti disolfuro accelera il processo amiloidogenico. Cinetiche più rapide, in cui si osserva una drastica riduzione della fase di latenza iniziale, possono essere ottenute tramite semina con fibrille preformate [Krebs MR et al. 2004].

In ogni modo il processo di aggregazione amiloide dell’HEWL, per quanto complesso, è ormai abbastanza noto (Fig. 1.10).

**Figura 1.10.** Le diverse vie e i diversi intermedi che possono portare alla formazione di fibrille amiloidi di HEWL a pH acido e a elevata temperatura [Mishra R et al. 2007].

Pertanto, in considerazione anche dei suoi bassi costi e della modesta tossicità di tutti i reattivi coinvolti, l’HEWL rappresenta un ottimo modello per lo studio delle fibrille amiloidi [Arnaudov LN et al. 2005].
1.4. I POLIFENOLI


1.4.1. Classificazioni

I polifenoli naturali, oltre 8000, sono metaboliti secondari di un elevato numero di piante [Sakakibara H et al. 2003]. Essi rientrano fra i gruppi di sostanze vegetali biologicamente attive (Fig. 1.11).

![Diagramma dei polifenoli](image)

**Figura 1.11.** Principali classi di composti vegetali con attività biologica [riadattamento da Carratù B et al. 2005].

Strutturalmente sono caratterizzati dalla presenza di uno o più anelli fenolici. La classificazione chimica più diffusa risale agli anni ’80 del secolo scorso, ed è opera sostanzialmente di Jeffrey B. Harborne [Urquiaga I et al. 2005]. Si distinguono anzitutto quattro classi principali di composti: acidi fenolici, flavonoidi, stilbeni e lignani. Gli acidi fenolici comprendono a loro volta acidi benzoici e acidi idrossicinnamici (Fig. 1.12).
I flavonoidi presentano due anelli aromatici: l’anello A, condensato con un eterociclo ossigenato (anello C), e l’anello B, legato di solito in posizione 2 dell’eterociclo, o meno frequentemente in posizione 3, come avviene per gli isoflavoni. I flavonoidi sono in genere divisi in sei sottoclassi sia in funzione dello stato di ossidazione degli atomi della struttura C che della posizione dei sostituenti sugli anelli: flavonoli, flavoni, isoflavoni, flavanoni, antocianine e flavanoli (catechine e proantocianine). Le proantocianine, responsabili del carattere astringente dei cibi, sono flavanoli complessi con un grado di polimerizzazione medio di 4-11. Come schema riassuntivo si veda la Fig. 1.13.
Figura 1.13. Le varie sottoclassi che fanno capo ai flavonoidi [riadattamento da Ramassamy C 2006].
I flavonoidi sono i polifenoli più importanti, sia a livello di diffusione nelle piante che a livello di distribuzione nella dieta umana. Se ne conoscono oltre 4000. Sono pigmenti idrosolubili (gialli, arancio o rossi) delle piante con fiore. Contengono un fenilcromanone con uno o più gruppi ossidrile. Fra i pigmenti più comuni nelle piante si ricordano le antocianine (oltre 200), responsabili dei colori rosso-violetti.

1.4.2. Funzioni e biosintesi nelle piante

I derivati fenolici rientrano fra i metaboliti secondari delle piante, e tuttavia sono essenziali per la crescita e la riproduzione delle medesime, nelle quali agiscono come antipatogeni, antibiotici, pesticidi, fungicidi (ad esempio gli stilbeni e i glicosidi dei flavonoli), antivirali (si vedano i lignani). Essi sono inoltre importanti per l'instaurarsi di simbiosi nelle micorrizze, nella protezione dai raggi ultravioletti, nell'isolamento delle cellule da gas e acqua (assieme ad acidi carbossilici e alcoli con 14-30 carboni vengono infatti a costituire suberina e cutina). I lignani hanno in genere funzione difensiva (il pinoresinolo si forma quando la pianta subisce lesioni), e rappresentano anche la struttura di base della lignina, sostanza che si lega alla cellulosa delle pareti cellulari conferendo stabilità, nonché resistenza alla digestione da parte degli animali erbivori.

Dal punto di vista biosintetico i polifenoli derivano dalla fenilalanina e, in alcuni casi, dalla tirosina [Shahidi FS et al. 2003]. Dalla fenilalanina, tramite un'opportuna liasi (PAL), si libera ammoniaca, e si forma così acido cinnamico. Da questo si ottengono poi i fenilpropanoidi, precursori di lignani, lignina, suberina, cutina, stilbeni, flavonoidi e tannini.

I tannini sono sostanze complesse suddivisibili principalmente in polimeri dei flavan-3-oli (tannini condensati, con peso molecolare di 2000-4000 Da) e acidi gallici glicosilati (tannini idrolizzabili, con peso molecolare di 500-2800 Da). Uno schema riassuntivo sulla classificazione dei tannini è riportato in Tab. 1.3.
1. INTRODUZIONE

**Tabella 1.3.** Principali tipi di tannini presenti nella dieta umana [riadattamento da Beecher GR 2003].

Per azione della luce flavonoli e flavoni possono dare glicosidi. Nel caso dei flavonoli possiamo avere monoglicosidi (soprattutto 3-O-glicosidi), diglicosidi (con zuccheri in posizioni diverse o meno) e triglicosidi: alcuni risultano talora acilati con acidi fenolici. I flavanoni sono spesso glicosilati in posizione 7 con un disaccaride. Le antocianine sono in genere mono o diglicosidi, ma in alcune matrici (patate, melanzane, vari fiori, ecc.) si ritrovano anche derivati glicosilati e ampiamente acilati con acidi fenolici. Sono noti anche alcuni C-glicosiflavonoidi. In generale gli zuccheri più frequenti nei polifenoli sono il glucosio e il ramnosio. I lignani possono esistere anche in forma ciclizzata. I derivati dell’acido benzoico si ottengono sempre dai fenilpropanoidi per perdita di un frammento bicarbonioso. Le principali vie biosintetiche dei polifenoli sono riassunte in Fig. 1.14.

1.4.3. Metodi di analisi

Negli ultimi quindici anni l’interesse dei ricercatori e delle industrie nei confronti dei polifenoli è molto aumentato. Essi si sono rivelati ad esempio degli ottimi antiossidanti per preparati farmaceutici o alimentari. Di conseguenza, per monitorare la presenza di queste molecole nelle varie matrici vegetali, sono state messe a punto diverse tecniche analitiche, facenti capo soprattutto alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelatori a fotodiodi (diode array detector o DAD) o a fluorescenza spesso accoppiati a rivelatori in spettrometria di massa (MS) [Sakakibara H et al. 2003].

In passato (ed ancora oggi in molti lavori) il titolo in polifenoli totali è stato fornito anche tramite la riduzione del reagente di Folin-Ciocalteu, che prevede l’espressione del dato quantitativo come acido gallico. Questa determinazione in presenza di polimeri o di forme ossidate è ancora più accurata dell’HPLC, ma è comunque soggetta a
interferenze da parte di molti composti (acido ascorbico, anidride solforosa, ammine aromatiche, zuccheri, acidi organici).

1.4.4. Assunzione con gli alimenti

La frutta e i relativi succhi rappresentano le fonti principali di polifenoli per l’uomo, anche perché le porzioni consumate sono abbastanza consistenti (100-200 g). Ad esempio una mela contiene circa 400 mg di polifenoli (espressi come acido gallico). 100 g di prugne possono fornire fino a 1-2 g di polifenoli. Anche gli ortaggi contengono le sostanze in questione: ne sono particolarmente ricche le cipolle, gli spinaci e i broccoli. Fra le bevande che apportano sostanze fenoliche si ricordano il tè, soprattutto quello verde, in cui i polifenoli sono il 10-30% del peso secco, il caffè, la cioccolata, il vino rosso e la birra. Ad esempio 200 ml di tè nero forniscono 150-250 mg di sostanze fenoliche, 200 ml di vino rosso 200-500 mg. Il tè verde, prodotto dalle foglie dell’alberello sempreverde *Camellia sinensis* L. senza l’intervento di processi fermentativi, rappresenta la seconda bevanda al mondo dopo l’acqua [Bonoli M et al. 2003]. In diversi paesi esso costituisce anzi la fonte più cospicua di polifenoli dell’alimentazione [Hertog MG et al. 1993; Arts IC et al. 2001]. Per quanto riguarda il tè nero, il paese con il suo più alto consumo (3,16 Kg all’anno pro capite) è l’Irlanda del Nord; seguono a ruota Regno Unito e Kuwait.

Come già suggerito una trentina d’anni fa, si stima che mediamente un individuo assuma con la dieta 1 g di polifenoli al giorno [Lotito SB et al. 2006]. In genere un terzo è rappresentato da acidi fenolici, e il resto sostanzialmente da flavonoidi (soprattutto flavanoli e antocianine). Fra gli acidi fenolici più abbondanti nei cibi si possono ricordare l’acido caffeico (nella frutta e negli ortaggi spesso esterificato ad acido clorogenico) e l’acido ferulico, presente nel frumento. Nei paesi occidentali la dieta fornisce circa 50 mg di flavonoidi, di cui il 61% tramite il tè nero. Gli isoflavoni sono contenuti soprattutto nella soia, i flavanoni negli agrumi, i flavonoli (ad esempio la quercetina) nella cipolla gialla o rossa, i flavoni (meno comuni nella dieta) nel pepe rosso, i flavanoli, e in particolare le catechine, nel tè verde, ma anche nei vinaccioli e nelle mele, le antocianine nelle uve rosse, nei frutti di bosco, nelle ciliegie e in alcune varietà a polpa pigmentata di patate. Le antocianine assunte ogni giorno variano dai 25 ai 1000 mg. Gli stilbeni sono poco diffusi; fra questi il resveratrolo è il più noto, e se ne stimano concentrazioni pari a 0,3-2 mg/l nel vino rosso. I lignani, alcuni dei quali sono noti per la loro attività di fitoestrogeni, sono presenti nel plasma e nelle urine, ma a livello di cibo si trovano in pochi prodotti (per lo più nei semi di lino). Recentemente sono stati individuati anche negli oli extra vergini di oliva. Probabilmente è grazie all’azione della microflora intestinale che si formano i cosiddetti “lignani del mammifero”
1. INTRODUZIONE


<table>
<thead>
<tr>
<th>Chemical classes</th>
<th>Examples</th>
<th>Sources</th>
<th>References</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Phenolic acids</td>
<td>Hydroxybenzoic acids</td>
<td>- TANNIC ACID</td>
<td>Fruits (raspberry etc.); nuts; tea; red wine</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Hydroxycinnamic acids</td>
<td>- ROSMARINIC ACID</td>
<td>Root vegetables (potato etc.); fruits (cherry, plum, blueberry etc.); greens (chicory, artichoke etc.); coffee</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Flavonols</td>
<td>- RUTIN</td>
<td>Leaf vegetables (curly kale, broccoli etc.); yellow onion; apricot</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Flavones</td>
<td>- HINOKIFLAVONE</td>
<td>Leaf vegetables</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Isoflavones</td>
<td>- GENISTEIN</td>
<td>Soybeans</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Anthocyanidins</td>
<td>- KERACYANIN</td>
<td>Magenta coloured foods (aubergine, cherry, blueberry, black currant etc.); red wine</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Flavanols</td>
<td>- EPIGALLOCAUCIC GALLATE</td>
<td>Green tea; beans; chocolate; apricot</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Stilbenes</td>
<td>- RESVERATROL</td>
<td>Red wine; peanut</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>- COUMESTROL</td>
<td>Soybeans</td>
</tr>
</tbody>
</table>


1.4.5. Assorbimento

L’assorbimento dei polifenoli dipende molto dalla loro struttura chimica, ma normalmente è poco marcato. La maggior parte dei polifenoli ingeriti (75-99%) non si ritrova nelle urine. Questo può indicare a seconda dei casi scarso assorbimento, attacco da parte della flora microbica intestinale, metabolismo tissutale e/o eliminazione attraverso la bile (Fig. 1.15).
1. INTRODUZIONE

Figura 1.15. Possibili destini metabolici dei polifenoli introdotti con la dieta [Scalbert A et al. 2000].

Complessivamente la maggiore biodisponibilità si registra forse per la naringina del pompelmo (fino al 57% può comparire immodificata nelle urine). Fra i polifenoli meglio assorbiti si ricordano anche l’acido gallico e gli isoflavoni (questi ultimi hanno una biodisponibilità compresa fra il 13 e il 35%). Modesto assorbimento si registra invece per proantocianidine, catechine galloilate e antocianine [Manach C et al. 2005].

I polifenoli glicosilati possono essere assorbiti come tali o dopo idrolisi enzimatica, anche ad opera della microflora intestinale. Ad esempio la rutina, un rmanoglucoside della quercetina, viene assorbita dalla mucosa del colon solo dopo deglicosilazione ad opera della flora batterica locale [Hollman PC et al. 1998]. Il colon contiene circa $10^{12}$ microrganismi/cm$^3$. Lactobacilli, Bacteriodes e Bifidobacteria possiedono sicuramente attività β-glicosidasiche. Attività glicosidasiche possono manifestarsi anche durante le lavorazioni cui i cibi sono sottoposti. Dopo un pasto le massime concentrazioni ematiche di polifenoli variano da 0,1 a 10 µM [Kroon PA et al. 2004]. Per quanto concerne in particolare i flavonoidi, le loro concentrazioni nel plasma raramente sono superiori a 1 µM, ma vengono raggiunte in tempi abbastanza brevi (spesso entro 1-2 h dall’assunzione). Per esempio nei ratti le antocianine possono essere assorbite attivamente già a livello gastrico mediante il coinvolgimento di una bilitranslocasi, e nel giro di pochi minuti riescono a passare, grazie a carrier di membrana, anche la barriera ematoencefalica [Passamonti S et al. 2005].
1.4.6. Metabolismo

Nel corpo umano i polifenoli vanno incontro a vari processi metabolici. In sostanza le strutture fenoliche che raggiungono il sangue e i tessuti non sono identiche a quelle assunte con la dieta. Solo nel caso delle catechine del té verde le biotrasformazioni sono un po’ più semplici, e le forme in circolo risultano direttamente gli agliconi.

Generalmente il primo passaggio del metabolismo dei polifenoli è comunque la rimozione enzimatica delle eventuali molecole zuccherine presenti, in modo da facilitare la diffusione passiva attraverso le membrane biologiche (solo nel caso dei flavonoli i glicosidi sono assorbiti meglio degli agliconi; le antocianidine inoltre sembrano essere assorbite esclusivamente glicosilate). Sull’orletto a spazzola delle cellule dei villi intestinali è presente la lattasi-floridinz-idrolasi (LPH), una β-glicosidasi i cui substrati fisiologici sarebbero i glucosilceramidi e i lattosilceramidi del latte (ed anche il lattosio stesso una volta assorbito). Il 5% degli europei e il 90% degli africani e degli asiatici, da adulti, hanno carenze di quest’enzima. Nell’interno delle cellule della mucosa intestinale e soprattutto in quelle epatiche si ritrova invece una β-glicosidasi citosolica (CBG). Il fegato è in genere il sito dove i glicosidi assorbiti come tali (alcune antocianine, alcuni flavonoli ecc.) sono comunque idrolizzati. Il ramnosio non è un substrato delle β-glicosidasi umane, e può essere staccato solo dalle α-ramnosidasi della microflora del colon.

I flavanoli della dieta risultano spesso acilati, soprattutto con acido gallico (si vedano ad esempio le gallocatechine del té verde). Tale fatto non modifica però in modo sostanziale la loro capacità di diffusione passiva. Solo l’epigallocatechina gallato sembra subire degalloilazione nella saliva [Yang CS et al. 1999].

Molti acidi fenolici sono esterificati con zuccheri, acidi organici e lipidi. Spesso l’organismo umano non possiede esterasi in grado di idrolizzare tali derivati (per esempio per liberare acido caffeico dall’acido clorogenico).

Viceversa, almeno nel ratto, gli ellagitannini sono idrolizzati (forse anche a livello gastrico), con comparsa nelle urine di acido ellagico.


Alcuni polifenoli possono essere assorbiti non solo per diffusione passiva, ma anche tramite trasporto attivo, ad esempio sodio-dipendente, come nel caso dell’acido caffeico nell’intestino tenue. Per i glicosidi dei flavonoidi è stata addirittura proposta l’interazione con il trasportatore-1, sodio-dipendente, di glucosio (SULT-1).
Le massime concentrazioni ematiche dei polifenoli si raggiungono a 1,5-5,5 h dall’assunzione [Manach C et al. 2005]. I tempi più lunghi sono tipici di quelle molecole il cui aglicone è rilasciato ad opera della microflora intestinale (ad esempio la rutina, l’esperidina e la naringina).

Gli agliconi dei polifenoli subiscono per lo più coniugazioni (metilazioni, solfatazioni, glucuronidazioni o combinazioni delle stesse). Questo avviene soprattutto con le catechine [Donovan JL et al. 2001]. Solo l’1,68% delle catechine del tè nero si ritrova immodificato nel plasma, nelle urine e nelle feci [Warden BA et al. 2001]. Piccoli quantitativi di polifenoli sono trasformati già nell’intestino; con dosi più alte entra in gioco il fegato, e talora anche il rene. A pH fisiologico i glucuronati e i solfati presentano carica negativa. La catecolamin-O-metiltranferasi (COMT), enzima polimorfico con un ruolo chiave nel metabolismo della dopamina, è in grado di metilare alcuni degli ossidrili dei polifenoli. La reazione avviene a livello di vari tessuti. La coniugazione con acido glucuronico è catalizzata invece dalla uridindifosfato glucuronosil transferasi (UDPGT o UGT). Con questo nome si intende in realtà una vasta famiglia di enzimi del reticolo endoplasmatico (UGT1A1, UGT1A3 ecc.) presenti soprattutto nel fegato, nell’intestino e nel rene. I farmaci, l’alcol e il fumo inducono il gruppo di enzimi UGT1A. Fra i polifenoli che subiscono maggiormente la glucuronidazione si ricordano gli isoflavoni. Le fenol sulfotransferasi (P-PST o SULT) sono un gruppo di enzimi citosolici ad ampia distribuzione aventi come substrati elettivi le iodotironine, ma in grado di solfatare anche fenoli, 4-nitrofenoli e idrossiarilamine. SULT1A1 è presente soprattutto nel fegato, SULT1A3 nel colon.

Alcuni polifenoli possono essere coniugati anche con una, due o tre molecole di glutazione. È quanto accade alle catechine in presenza di tirosinasi o di altri complessi enzimatici con funzioni ossidative [Moridani MY et al. 2001].

A livello degli enterociti la maggior parte dei metaboliti dei polifenoli è comunque rtrasportata nel lume intestinale tramite carrier proteici della famiglia delle ATP-binding cassette/multidrug resistance proteins (ABC/MDR). Nell’intestino le molecole fenoliche vengono definitivamente degradate dalla flora batterica [Biasutto L et al. 2007]. In alcuni casi si assiste comunque a riciclo enteropatico. L’escrezione urinaria dei polifenoli e dei relativi metaboliti varia infatti dallo 0,3 al 43%.

Complessivamente le emivite dei polifenoli sono abbastanza brevi, dell’ordine di poche ore. Del resto il loro elevato numero di ossidrili pone già i presupposti per un’efficace eliminazione per via renale.

Uno schema riassuntivo del metabolismo dei polifenoli è riportato in Fig. 1.16.
1. INTRODUZIONE


1.4.7. Attività biologiche dei polifenoli

I polifenoli sono spesso classificati come nutraceutici. Il termine fu coniato nel 1989 dal medico Stephen DeFelice, che uni le parole “nutrizione” e “farmaceutico” per indicare qualsiasi sostanza che fosse un alimento o parte d’alimento e che apportasse benefici medici o alla salute. DeFelice diede anche vita alla Fondazione per l’innovazione in medicina (FIM), Cranford, NJ (USA). Talvolta si parla anche di alimenti funzionali, cioè cibi che, se consumati regolarmente, esercitano una specifica azione benefica sulla salute che va oltre le loro proprietà nutrizionali [Espín JC et al. 2007].

Le attività biologiche dei polifenoli sono molteplici, anche in relazione alla loro tendenza a reagire, in forma ossidata, con aminoacidi e proteine, e a formare complessi con altre molecole biologiche o sali minerali. Uno schema generale degli effetti di queste sostanze sull’organismo umano è riportato in Fig. 1.17.

CBG = Cytosolic beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)
LPH = Lactase-phlorizin hydrolase (EC 3.2.1.108)
COMT = Catechol-O-methyltransferase (EC 2.1.1.6)
UDPGT = UDP glucuronosyl transferase (EC 2.4.1.17)
SULT = Phenol sulfotransferase (EC 2.8.2.1)
1. INTRODUZIONE

La capacità antiossidante dei polifenoli è strettamente connessa al numero e alla posizione degli ossidrili presenti. Per esempio nel caso delle catechine essa risulta superiore a quella dell’ascorbato. Anche il metodo di indagine può influenzare la scala dei potenziali registrata [De la Lastra CA et al. 2007]. A seconda del loro meccanismo d’azione gli antiossidanti possono essere infatti classificati come terminatori di radicali liberi, chelanti ioni metallici in grado di catalizzare la perossidazione lipidica o infine scavengers dell’ossigeno [Shahidi F et al. 1993].

Negli ultimi anni sono stati proposti più metodi per determinare l’attività antiossidante dei vari alimenti. Tuttavia non sempre i risultati di queste analisi correlano fra loro [Prior RL et al. 2005]. Una buona parte delle tecniche usate fa capo alla chemiluminescenza. Si possono ricordare il total reactive antioxidant potential assay o TRAP test, l’oxygen radical absorbance capacity assay od ORAC test, e il ferric reducing ability assay o FRAP test [Pulido R et al. 2000]. Recentemente è stato proposto il metodo CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) [Apak R et al. 2004]. In base a quest’ultima tecnica analitica le sostanze polifenoliche con maggior potere antiossidante risultano l’epicatechina gallato, l’epigallocatechina gallato, la quercetina. Per molti alimenti si parla comunque di potere antiossidante globale (AOP),

Figura 1.17. Principali effetti biologici dei polifenoli dell’alimentazione [riadattamento da Han XH et al. 2007].
1. INTRODUZIONE

o anche d’attività antiossidante totale (TAA) [Brenna OV et al. 2001; López-Vélez M et al. 2003]. Alcuni dati sul potere antiossidante degli alimenti sono presentati in Fig. 1.18.

**Figura 1.18.** Esempi di potere antiossidante di alcuni alimenti o estratti naturali. TE = equivalenti Trolox®, che è un analogo idrosolubile (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) della vitamina E (riadattamento dal sito web www.zuccari.com).

Mediamente la deidratazione di frutta e vegetali non sembra alterarne in maniera sostanziale il potere antiossidante [Mea GM et al. 2004].

L’attività antiossidante dei polifenoli può in parte spiegare il loro effetto benefico su alcune patologie umane, soprattutto quelle di natura degenerativa. Per esempio il rischio di malattie cardiovascolari sembra legato, più che alla semplice ipercolesterolemia, a un alterato rapporto colesterolo/vitamine antiossidanti. In vitro i polifenoli sono in grado di modulare l’ossidazione delle liproproteine a bassa densità (LDL), e ciò in misura maggiore dell’α-tocoferolo, che rappresenta ancora oggi il più importante antiossidante lipidico [Frankel EN et al. 1993]. L’ossidazione delle LDL sembra essere un fenomeno aterogenetico [Reed J 2002]. D’altra parte le sostanze fenoliche sono in grado di bloccare i radicali liberi dell’ossigeno o RLO (radicale idrossido, radicale perossido e radicale superossido). Queste specie, che si generano ordinariamente nella respirazione cellulare, nel metabolismo delle purine o per azione di lipossigenasi e ciclossigenasi, sono in grado di perossidare gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) delle membrane cellulari: i PUFA perossidati vengono distaccati ad opera della
fosfolipasi A₂, con alterazione della fluidità di membrana e necrosi cellulare, punto di partenza per la comparsa di lesioni ateromatose. Questo può in parte spiegare il cosiddetto “paradosso francese”, fenomeno per il quale alcune regioni del sud della Francia in cui si consumano molti grassi saturi (per esempio burro) presentano una bassa mortalità per malattie cardiovascolari [Renaud S et al. 1992]. In queste zone si ha infatti la contemporanea assunzione di vino rosso e, sebbene in quantità molto minori, d’olio extravergine d’oliva. Nell’olio in questione il contenuto di polifenoli oscilla fra i 150 e i 500 mg/kg. Non si deve poi dimenticare che alcune sostanze polifenoliche possiedono anche altre attività correlabili alla diminuzione del rischio cardiovascolare: per esempio hanno azione antiaggregante, inducono il rilascio di ossido nitrico da parte dell’endotelio, con conseguente vasodilatazione, inibiscono la sintasi degli acidi grassi (FAS) ecc. [Rein D et al. 2000; Fitzpatrick DF et al. 2001; Tian WX 2006].

Molti altri studi sono stati condotti sui polifenoli, e soprattutto sui flavonoidi, come agenti anticancro. Per esempio i fenoli del vino sono stati testati nella terapia del melanoma [Gómez-Cordovés C et al. 2001]; i polifenoli isolati dal tè verde hanno invece mostrato una notevole capacità di inibire la formazione di metastasi nel tumore della prostata e del seno [Adhami VM et al. 2003; Nakachi K et al. 1998]. Di nuovo in molti casi l’effetto anticancro sembra correlato alla capacità di bloccare i radicali liberi dell’ossigeno, o, più in generale, i cosiddetti ROS (reactive oxygen species). Infatti vari agenti tumorali, quali ad esempio il benzene e i suoi metaboliti, o anche le semplici radiazioni ionizzanti, determinano la formazione di alcune di queste specie, in grado a loro volta di ossidare gli zuccheri o le basi azotate del DNA, provocandone anche la rottura [Lee SF et al. 1996]. I polifenoli si affiancano dunque a quegli enzimi del nostro organismo (superossido-dismutasi, catalasi, glutatone-perossisidi) che normalmente provvedono all’eliminazione dei ROS. In futuro, comunque, alcuni flavonoidi potrebbero essere impiegati come antitumorali per le loro capacità di ridurre la resistenza multipla alla chemioterapia (MDR): sostanze come l’epigallocatechina gallato e la cianidina cloruro inibiscono infatti la glicoproteina-P (P-gp), trasportatore di membrana ATP-dipendente responsabile dell’efflusso dalle cellule d’aluni tipi di chemioterapici, ad esempio della daunorubicina [Kitagawa S 2006].

Vasta è la letteratura che si occupa delle proprietà antimicrobiche dei polifenoli. Per esempio alcuni alchilgallati si sono rivelati buoni antifungini in test contro Saccharomices cerevisiae. L’attività fungicida si è manifestata anche a concentrazioni di pochi mg/l [Kubo I et al. 2002]. Diversi acidi idrossicinnamici e flavonoidi sono risultati inibitori della crescita di lieviti, muffe e altre specie fungine. Da oltre 30 anni si sono poi accumulate evidenze sperimentali dell’azione antibatterica di vari acidi idrossicinnamici, acidi benzoici e flavonoidi. Per esempio le proantocianidine del mirtillo


**1.4.7.1. Attività anti-amiloidogeniche**


Negli ultimi anni diversi gruppi di ricerca hanno messo in luce un ruolo più generale dei composti fenolici come inibitori *in vitro* della formazione di fibrille amiloidi:

Alcuni dati relativi all’effetto anti-amiloidogenico di vari polifenoli nei confronti delle tre principali proteinne modello sino a oggi impiegate sono riportati in Tab. 1.5.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Polyphenols</th>
<th>IC_{50} (µM)</th>
<th>(\alpha)-synuclein</th>
<th>tau</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>apigenin</td>
<td>&gt;40</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>baicalein</td>
<td>4.5</td>
<td>8.2</td>
<td>2.7</td>
</tr>
<tr>
<td>(+)-catechin</td>
<td>&gt;40</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>(-)-catechin</td>
<td>5</td>
<td>21.4</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>chlorogenic acid</td>
<td>&gt;40</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>curcumin</td>
<td>1.7</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>cyanidin</td>
<td>4</td>
<td>10.3</td>
<td>33.3</td>
</tr>
<tr>
<td>daidzein</td>
<td>&gt;40</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>delphinidin</td>
<td>3</td>
<td>6.5</td>
<td>6.9</td>
</tr>
<tr>
<td>2,2'-dihydroxybenzophenone</td>
<td>&gt;40</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>4,4'-dihydroxybenzophenone</td>
<td>&gt;40</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>dopamine chloride</td>
<td>28.6</td>
<td>7.1</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>(+)-epicatechin</td>
<td>&gt;40</td>
<td>&gt;29.9</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>(-)-epicatechin 3-gallate</td>
<td>3</td>
<td>14.5</td>
<td>4.5</td>
</tr>
<tr>
<td>epigallocatechin</td>
<td>7</td>
<td>10.6</td>
<td>8.4</td>
</tr>
<tr>
<td>epigallocatechin gallate</td>
<td>2</td>
<td>9.8</td>
<td>9.6</td>
</tr>
<tr>
<td>exifone</td>
<td>0.7</td>
<td>2.5</td>
<td>3.3</td>
</tr>
<tr>
<td>(+)-galloatechin</td>
<td>7</td>
<td>8.9</td>
<td>13.3</td>
</tr>
<tr>
<td>(-)-gallocatechin gallate</td>
<td>1.5</td>
<td>3.6</td>
<td>1</td>
</tr>
<tr>
<td>gingerol</td>
<td>25</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>gossypetin</td>
<td>1.3</td>
<td>5.6</td>
<td>2</td>
</tr>
<tr>
<td>hinokiflavone</td>
<td>5</td>
<td>8.1</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>hypericin</td>
<td>0.9</td>
<td>7.5</td>
<td>26.8</td>
</tr>
<tr>
<td>kaempferol</td>
<td>8</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>luteolin</td>
<td>3</td>
<td>28</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>myricetin</td>
<td>0.9</td>
<td>13.3</td>
<td>1.2</td>
</tr>
<tr>
<td>naringenin</td>
<td>25</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>2,3,4,2',4'-pentahydroxybenzophenone</td>
<td>2.8</td>
<td>28.3</td>
<td>2.4</td>
</tr>
<tr>
<td>procyanidin B1</td>
<td>14</td>
<td>7.3</td>
<td>27.5</td>
</tr>
<tr>
<td>procyanidin B2</td>
<td>&gt;40</td>
<td>4.3</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>purpurogallin</td>
<td>0.5</td>
<td>12.9</td>
<td>5.6</td>
</tr>
<tr>
<td>quercetin</td>
<td>5</td>
<td>20</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>rosmarinic acid</td>
<td>12</td>
<td>4.8</td>
<td>16.6</td>
</tr>
<tr>
<td>rutin</td>
<td>32</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>(+)-taxifolin</td>
<td>&gt;40</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>2,2',4',tetrahydroxybenzophenone</td>
<td>&gt;40</td>
<td>&gt;80</td>
<td>&gt;200</td>
</tr>
<tr>
<td>theaflavine</td>
<td>2</td>
<td>5.8</td>
<td>7.9</td>
</tr>
<tr>
<td>(+)-tocoferol</td>
<td>&gt;40</td>
<td>10.9</td>
<td>107.7</td>
</tr>
<tr>
<td>2,3,4-trihydroxybenzophenone</td>
<td>3.1</td>
<td>18.6</td>
<td>12.2</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Tabella 1.5. Esempi di effetti anti-amiloidogenici di polifenoli espressi come IC_{50} (inhibitory concentration), cioè concentrazioni alle quali si ha un’inibizione del 50% [riadattamento da Masuda M et al. 2006].
Sulla base di ricerche mirate qualche autore ha anche proposto una suddivisione delle varie sostanze in “inibitori poco attivi”, “inibitori molto attivi” e “inibitori selettivi” [Shoval H et al. 2007].


Recentemente è stata anche proposta una suddivisione generale dei composti in grado di inibire l’aggregazione amiloide del peptide Aβ42: I) sostanze che inibiscono l’oligomerizzazione; II) sostanze che inibiscono sia l’oligomerizzazione che la formazione di fibrille; III) sostanze che inibiscono solo la formazione di fibrille [Necula M et al. 2007]. Tutti questi effetti sull’aggregazione amiloide sono stati correlati a un meccanismo generale basato su vincoli strutturali e interazioni aromatiche che indirizzano l’inibitore polifenolico verso il core amiloidogenico [Porat Y et al. 2006]. Qui il composto può esercitare la sua azione sugli oligomeri amiloidi o sulle fibrille già formate [Hirohata M et al. 2007]. L’importanza delle interazioni fra strutture aromatiche per gli inibitori dell’aggregazione amiloide era già stata messa in luce alcuni anni fa [Porat Y et al. 2004]. Per la curcumina e alcuni analoghi strutturali è stato anche proposto un modello d’interazione con le fibrille amiloidi (Fig. 1.19).

Figura 1.19. Correlazioni fra attività e struttura per curcumina e derivati quali inibitori della formazione di fibrille amiloidi [riadattamento da Reinke AA et al. 2007].
1.4.8. Interazioni con proteine, glicidi, vitamine e minerali

Da diversi decenni è noto che i polifenoli possono legarsi alle proteine, in modo reversibile prevalentemente tramite legami a ponte di idrogeno, o talvolta in modo irreversibile, qualora abbiano subito ossidazione a chinoni. La reazione con gli ε-aminogruppi delle lisine o gli –S-CH₃ delle metionine può contribuire a rendere i tessuti vegetali indigeribili per gli animali monogastrici. La formazione di questi complessi sembra favorita in ambiente neutro e basico. L’interazione con le proteine può essere responsabile anche di alcuni effetti inibitori sugli enzimi digestivi (α-amilasi, lipasi, tripsina) [McDougall GJ et al. 2005; McDougall GJ et al. 2006]. Nel caso dell’amido la ridotta digeribilità può comunque derivare anche da interazioni dirette con le molecole fenoliche.

Osservazioni particolari possono essere fatte per i tannini, che con le proteine formano complessi solubili o insolubili. La loro affinità per le molecole proteiche può variare di quattro ordini di grandezza o più. Le proteine che si legano maggiormente ai tannini sembrano essere ricche di prolina e altri aminoacidi idrofobici. La presenza di oligosaccaridi può facilitare le interazioni mantenendo le molecole proteiche in una conformazione aperta. Del resto con le proteine globulari i tannini riescono ad interagire pochissimo. Sembra anche esistere una correlazione inversa fra la solubilità in acqua dei tannini e la loro capacità di precipitare le proteine. È stato poi provato che per avere un buon effetto precipitante i tannini condensati devono presentare tre subunità flavanoliche. Anche i galloilesteri del D-glucosio si legano maggiormente alle proteine se possiedono un elevato numero di residui di acido gallico [Kawamoto H et al. 1996]. In generale, con i tannini si ha prima un rivestimento della superficie proteica che sfrutta attrazioni idrofobiche, e poi un cross linking mediato dai polifenoli adesì [Charlton AJ et al. 2002]. Eventuali legami covalenti possono instaurarsi fra gruppi fenolicici ossidati dei tannini e residui nucleofili delle proteine (–SH, –OH, –NH₂). Dai dati sperimentali raccolti con l’albumina serica bovina (BSA) e la gelatina è stato anche sviluppato un modello quantitativo [Silber ML et al. 1998]. Nel caso del lisozima la massima precipitazione in presenza di tannini si ha a pH superiore a 8,0. I complessi proteina-tannino possono essere dissociati tramite solventi organici quali il metanolo e la dimetilformammide.

I polifenoli si legano facilmente anche con i carboidrati, come si può osservare ad esempio nelle colonne cromatografiche di Sephadex: in questo caso oltre alla penetrazione negli interstizi sembrano operare anche interazioni fra ossigeni, o fra elettroni fenilici e gruppi idrossido dei gel. Affinità si hanno anche fra polifenoli e ciclodestrine. Le molecole fenoliche che si legano maggiormente ai glicidi sono i tannini e le catechine, come è stato provato ad esempio con l’amido.
1. INTRODUZIONE


Con i minerali, infine, si conoscono da anni diversi complessi polifenolici. I più noti sono quelli tannici, che nelle piante costituiscono forse una forma di difesa dagli attacchi dei microrganismi, e che hanno avuto varie applicazioni industriali (nel trattamento delle acque di scarico, nella produzione di inchiostri ecc.). Vari polifenoli del tè, dei vegetali, del vino e del caffè si sono inoltre rivelati inibitori dell’assorbimento del ferro (III): particolarmente efficaci sono risultati l’acido tannico e l’acido gallico. I flavonoidi del tè, se assunti assieme ai cibi, possono ridurre l’assorbimento del ferro dal 63 al 91% [Brune M et al. 1990]. Invece bere del tè nero lontano dai pasti inibisce tale assorbimento solo per il 20%. L’acido ascorbico può contenere quest’effetto antinutrizionale riducendo il ferro (III) a ferro (II) [Siegenberg D et al. 1991].

1.4.9. Tossicità

Alcuni decenni fa sono state ipotizzate correlazioni fra il cancro esofageo e l’uso di bevande ricche di tannini (tè, succhi di mela, sidro ecc.). I tannini potrebbero di fatto irritare le cellule epiteliali dell’esofago e anche danneggiarne il DNA. Questo soprattutto se tali composti fenolici vengono assunti ad alte dosi: in tal caso infatti le capacità di detossificazione dell’organismo sarebbero sopraffatte, con in più un netto calo dei gruppi metilici e glucuronato a disposizione per il metabolismo ordinario [Singleton VL 1982]. Quantitativi elevati di polifenoli potrebbero del resto inibire enzimi chiave delle cellule [Skibola CF et al. 2001].

Di fatto comunque i polifenoli sembrano dare tossicità a lungo termine solo quando rappresentano l’1-5% dell’alimentazione. Per esempio non si sono osservati effetti tossici in ratti nutriti per 90 giorni con estratti d’uva contenenti meno del 5,5% di catechine monomeri [Wren AF et al. 2002].

Complessivamente sino ad oggi non sono emersi casi di tossicità o rischi correlati all’assunzione di molecole polifenoliche con la dieta ordinaria. Anche l’utilizzo di integratori alimentari arricchiti in composti fenolici non si è rivelato per il momento problematico.
1.5. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato quello di valutare, in uno screening in vitro, l’effetto anti-amiloidogenico di diversi polifenoli vegetali opportunamente purificati e di alcuni estratti (idroalcolici o alcolici) di piante a composizione nota. Molte delle sostanze utilizzate sono presenti normalmente nella dieta mediterranea, e hanno talora applicazioni in campo erboristico o farmaceutico (ad esempio come antiossidanti).

Le proteine modello impiegate sono state l’HEWL e un suo frammento (aminoacidi 49-64) prodotto per sintesi in forma leggermente modificata. L’aggregazione amiloide è stata in genere seguita con una tecnica fluorimetrica (test della ThT) e con l’AFM (per la caratterizzazione morfologica delle fibrille). In alcuni casi i dati raccolti sono stati confermati con altre metodiche di indagine (CD, DLS, saggio del Congo red, modellistica molecolare o molecular modeling...).

Sono state testate oltre venti sostanze pure e sei estratti. I polifenoli, appartenenti a diverse classi chimiche (tannini, acidi idrossicinnamici, flavonoli, flavoni, isoflavoni, antocianine, flavanoli e stilbeni), sono stati selezionati con criterio, in modo da poter ricavare alcune semplici correlazioni attività-struttura. Alcuni di essi, quali ad esempio l’acido tannico, la curcumina e il resveratrolo, già testati contro l’aggregazione amiloide d’altre proteine (peptide Aβ, α-sinucleina…), sono serviti da molecole di riferimento [Ono K et al. 2004b; Reinke AA et al. 2007; Rivière C et al. 2008]. Uno degli obiettivi principali dei test sugli estratti è stato invece l’identificazione di possibili sinergie fra le varie classi di polifenoli, punto di partenza per la loro valorizzazione come nutraceutici o come veri e propri farmaci.
2. MATERIALI

Nelle attività sperimentali sono sempre stati impiegati solventi e reattivi con purezza di grado analitico. Essi sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Anche l’HEWL è stato reperito in forma liofilizzata presso la Sigma-Aldrich. La sua purezza, pari a circa il 95%, è stata ottenuta tramite ripetute ricristallizzazioni e dialisi. Il frammento di HEWL 49-64 è stato sintetizzato dalla Sigma-Aldrich, e purificato tramite cromatografia in fase liquida (HPLC) fino a un titolo minimo dell’80%. Tale peptide ha la stessa sequenza dei residui 49-64 dell’HEWL (GSTDYGILQINSRWWC), fatta eccezione per l’amminoacido in posizione 64, che è stato cambiato in serina per prevenire la dimerizzazione attraverso il gruppo sulfidrico libero, coinvolto, nella proteina nativa, in un legame disolfuro intramolecolare [Krebs MR et al. 2000]. La purezza e l’integrità del peptide è stata controllata anche da dei gruppi di ricerca dell’Ateneo fiorentino tramite HPLC e spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (ESI-MS). La massa molecolare del prodotto è risultata 1883 (± 0,1) Da.

HEWL e peptide 49-64 sono rappresentati in Fig. 2.1.

![Figura 2.1. Struttura tridimensionale dell’HEWL e della porzione corrispondente al peptide 49-64 (in verde). In quest’ultimo sono visibili due filamenti β legati da un β-turn (contenente una glicina), e una regione random.](image)

I composti polifenolici testati sono stati acquistati dall’Extrasynthese (Genay Cedex, France), fatta eccezione per l’acido cicorico, il verbascoside e la cinarina, isolati

<table>
<thead>
<tr>
<th>Chemical classes</th>
<th>Compounds</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Phenolic acids</td>
<td>Hydroxybenzoic acids: TANNIC ACID</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Hydroxycinnamic acids: ROSMARINIC ACID, CURCUMIN, CICHERIC ACID, CYNARIN, VERBASCOSIDE, CAFFEIC ACID, CHLOROGENIC ACID</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Phenolic acids: RUTIN, QUERCETIN, QUERCETIN-3-GALACTOSIDE</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Flavones: HINOKIFLAVONE*, AMENTOFлавONE*, SCUTELLAREIN</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Isoflavones: GENISTEIN, DAIDZEIN, COUMESTROL**</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Anthocyanidins: KERACYANIN, KUROMANIN, MALVIN</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Flavanols: EPIGALLODATECHIN GALLATE, (-)EPICATECHIN, (+)CATECHIN</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Stilbenes: RESVERATROL</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* Biflavones  ** Phytoestrogen coming from an isoflavonic structure

**Tabella 2.1.** Elenco dei policenoli testati e delle relative classi chimiche di appartenenza.

La purezza di queste molecole, saggiata tramite HPLC/DAD o HPLC/MS, è risultata sempre superiore al 90%.

Gli estratti idroalcolici o alcolici delle varie piante (radicchio rosso, rosmarino, carciofo, ciliegia dolce, ciliegia acida) sono stati preparati, sempre dal gruppo della Professoressa N. Mulinacci, secondo metodiche leggermente diverse da caso a caso. In genere si è proceduto alla frantumazione sotto azoto liquido (T = -198 °C) del
materiale vegetale fresco, trattando poi la polvere per tre volte con alcol azeotropico o con una soluzione etanolica al 70% v/v, acida per acido formico (pH = 2,0-2,5). Per alcuni campioni (per esempio di rosmarino) si è fatto anche ricorso ad ultrasuoni. Al processo estrattivo, condotto a freddo, è in genere seguito defatting con esano, evaporazione e ridiscioglimento in soluzione alcolica acidificata di nuovo con acido formico. Uno degli estratti di carciofo è stato reperito in forma liofilizzata dall’Indena (Milano, Italia). Il contenuto in polifenoli è stato determinato tramite HPLC/DAD e HPLC/MS.

Tutte le soluzioni sono state preparate con acqua milliQ, ottenuta tramite impianti della Millipore (Billerica, USA).

Per la maggior parte degli esperimenti sono stati utilizzati contenitori in plastica monouso. La vetreria impiegata ha in genere subito lavaggi con detergenti specifici e successivi risciacqui con acqua deionizzata.
3. METODI

3.1. DOSAGGIO DELLE PROTEINE (METODO BRADFORD)

Il dosaggio proteico secondo Bradford sfrutta una reazione colorimetrica che permette di rilevare quantitativi minimi di proteine (µg). Il colorante Coomassie G-250 in ambiente acido (soluzione acquosa contenente anche acido fosforico e metanolo) si lega alle proteine (Fig. 3.1), mostrando un massimo di assorbimento a 595 nm [Bradford MM 1976]. La retta di calibrazione viene in genere costruita utilizzando come standard l’albumina di siero bovino (BSA), in quantitativi compresi fra 0 e 8 µg.


Durante l’aggregazione amiloide dell’HEWL il contenuto proteico della miscela di reazione e di alcune sue frazioni è stato valutato più volte, sempre secondo la metodica di Bradford. I campioni sono stati diluiti 1:10 con acqua.

L’analisi è stata effettuata tramite lo spettrofotometro UV-vis Lambda 4B della PerkinElmer (Waltham, USA), utilizzando cuvette monouso con un cammino ottico di 10 mm.

3.2. ELETTROFORESI IN CONDIZIONI DENATURANTI

L’elettroforesi su gel di poliacrilammide (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis o SDS-PAGE) permette la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare (Fig. 3.2). Infatti il detergente anionico
introdotto (dodecilsolfato di sodio o SDS), oltre a denaturare, conferisce a tutte le strutture proteiche una carica negativa netta (in media ogni due aminoacidi si lega una molecola di SDS). La migrazione verso l’anodo (polo positivo del campo elettrico applicato) delle particelle risulta pertanto determinata solo dalla loro forma e dimensione, e quindi in sostanza dalla loro massa molecolare [Laemmli UK 1970].

![Diagram](image)

**Figura 3.2.** Rappresentazione schematica di una cella elettroforetica.

A tempi predeterminati, durante la formazione di fibrille amiloidi sono stati prelevati campioni di HEWL per corse elettroforetiche. Tali campioni hanno subito diluizioni 1:10 o 1:20 con una soluzione a pH 2,0 per HCl, e sono stati poi uniti ad un equal volume di *Laemmli sample buffer 2x*, contenente o meno β-mercaptoetanolo, in grado di ridurre i ponti disolfuro presenti nelle proteine a gruppi –SH liberi. Dopo aver bollito per 5 min a bagnomaria, si è passati alla deposizione nei pozzetti dello *stacking gel* (gel con bassa reticolazione della poliacrilammide, utile per allineare tutti i materiali ad inizio corsa). Le quantità di campione depositate variavano fra 1 e 8 µg. La successiva migrazione elettroforetica è stata realizzata su gel di poliacrilammide al 15%, usando correnti di 400 mA per 50 min in TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v, pH 8,3) come tampone di corsa (*running buffer*).

L’apparecchiatura impiegata è stata il modello Mini-PROTEAN 3 Cell della BIO-RAD (Hercules, USA).

I gel sono stati poi colorati tramite Coomassie R-250, che all’1% in una soluzione acquosa contenente un 40% v/v di metanolo e un 10% v/v di acido acetico.
tende a legarsi ai legami peptidici nel giro di 40 min circa [Southern EM 1970]. Alla
colorazione sono seguiti almeno due trattamenti da 20 minuti, sempre sotto agitazione,
con una miscela decolorante (acqua, 40% v/v di metanolo e 10% v/v di acido acetico).
L’acquisizione delle immagini è stata fatta tramite l’apparecchio Chemi Doc
della BIO-RAD stessa.

3.3. FORMAZIONE DI FIBRILLE AMILOIDI

Dopo alcune prove preliminari a diversi valori di pH e in presenza di solventi
quali l’etanolo o il 2,2,2-trifluoroetanolo (TFE), si è scelto di far formare fibrille amiloidi
di HEWL tramite incubazione a 65 °C in soluzioni acquose di HCl a pH 2,0, come del
resto già descritto in letteratura [Krebs MR et al. 2000]. Sono state impiegate
concentrazioni di proteina pari a 1 mM, seguendo il processo per 10 giorni.
L’incubazione è avvenuta in bagnetto a secco modello 2091 della Lab-Line
Instruments (Melrose Park, USA).
L’aggregazione amiloide del peptide 49-64 (Cap. 2) è stata realizzata, anche
qui dopo alcune prove iniziali, incubando a 37 °C in soluzioni di HCl a pH 4,0 per 20-30
ore. La concentrazione proteica è stata in questo caso ridotta a 0,2 mM, valore
rivelatosi ottimale per gli studi di cinetica. In alcuni casi il processo è stato condotto
anche a pH 2,0 e seguito fino a 48 ore. Nella Tab. 3.1 è offerta una panoramica delle
prove che sono state fatte con il peptide 49-64 prima della scelta delle condizioni
operative finali.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Concentrazione (mM)</th>
<th>Temperatura (°C)</th>
<th>pH (con HCl)</th>
<th>Solventi (% v/v)</th>
<th>Altre condizioni</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>-</td>
<td>Peptide scongelato</td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>37</td>
<td>7,2 (con NaOH)</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>DMSO 1%</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,15</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>-</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>DMSO 0,2%</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>-</td>
<td>EDTA 1 mM*</td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>37</td>
<td>4</td>
<td>DMSO 1%</td>
<td>Peptide pre-disciolto in DMSO**</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* Chelante impiegato per escludere interferenze a carico d’impurezze di cationi metallici
** Solvente talvolta utilizzato per la conservazione degli stock di peptide

Tabella 3.1. Schema riassuntivo dei principali parametri variati per ottimizzare
l’aggregazione amiloide del peptide 49-64.
Tutti i risultati rappresentano la media di almeno tre distinti esperimenti.

3.4. VALUTAZIONE DELLA COMPARSA DI FIBRILLE AMILOIDI

La progressiva comparsa di fibrille amiloidi nel corso dell’incubazione delle proteine modello è stata monitorata sia sul piano qualitativo che su quello quantitativo, facendo uso, come raccomandato da tutta la letteratura specialistica, di varie tecniche d’indagine, la maggior parte delle quali di tipo spettroscopico.

3.4.1. Dosaggio fluorimetrico tramite tioflavina T

La cinetica dell’aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide 49-64, in presenza o meno di polifenoli, è stata monitorata attraverso il test della ThT. Questa sostanza si lega specificatamente alle fibrille amiloidi (Fig. 3.3), innalzando la propria fluorescenza a 485 nm in seguito a eccitazione a 440 nm [LeVine H 1993]. Il legame non sembra avvenire né con il monomero proteico, né con gli intermedi oligomerici, necessitando della presenza di vari \( \beta \)-strand contigui (identificabili invece sia nei protofilamenti che nelle fibrille amiloidi).

![Figure 3.3. Modello della disposizione della ThT sulla superficie delle fibrille amiloidi [Krebs MR et al. 2005].](image)

A tempi predeterminati i campioni sono stati agitati tramite vortex, vista l’importanza del movimento nel processo di formazione delle fibrille amiloidi [Lieu VH et al. 2007]. Soluzioni 2,5 mM di ThT in tampone fosfato di sodio 25 mM a pH 6,0, preparate ogni 2 settimane, sono state diluite 100 volte nei giorni di impiego, usando lo stesso tampone fosfato. 460 \( \mu l \) di tali soluzioni diluite sono stati uniti a 40 \( \mu l \) di
campione, agitati su vortex e osservati al fluorimetro alla temperatura di 25 °C. I segnali dei campioni sono stati corretti tramite letture della fluorescenza di base delle soluzioni diluite di ThT e di HCl. Un sensibile incremento della fluorescenza nel corso dell’incubazione è stato considerato indicativo della progressiva comparsa di fibrille amiloidi. Durante il procedere dell’aggregazione i quantitativi di campione sono stati opportunamente ridotti, verificando la linearità della risposta dell’apparecchiatura nell’intervallo delle concentrazioni considerate.

La fluorescenza è stata misurata tramite fluorimetri PerkinElmer (Waltham, USA), modelli 650-10S o LS 55, o Shimadzu (Kyoto, Giappone), modello RF-5000, usando fessure di 5 nm sia in eccitazione che in emissione. I campioni sono stati posti in cuvette Hellma (Müllheim, Germania) con cammini ottici di 2 x 10 mm.

3.4.1.1. Leggi cinetiche
Le cinetiche ottenute per l’HEWL sono risultate curve di tipo sigmoidale. Un soddisfacente fitting è stato infatti possibile tramite l’equazione:

\[ F = A_0 + \frac{A}{1 + e^{\left(t_{1/2}-t\right)k_{agg}}} \]

dove \(A_0\) rappresenta la fluorescenza iniziale, \(A\) la fluorescenza finale, \(t\) il tempo d’incubazione, \(t_{1/2}\) il tempo necessario per avere metà aggregazione e \(k_{agg}\) la costante di velocità apparente d’aggregazione [Nielsen L et al. 2001]. In genere i segnali sono stati normalizzati a 240 h e su di essi è stato applicato un filtro di smoothing mediando i valori in un intorno di 24 h.

Usando il peptide 49-64 il fitting dei dati è stato realizzato tramite la seguente equazione di una curva esponenziale:

\[ F = Ae^{-k_{agg}t} + q \]

dove \(A\) rappresenta la variazione complessiva di fluorescenza fra il tempo 0 e un tempo infinitamente lungo, \(t\) il tempo d’incubazione, \(k_{agg}\) la costante di velocità apparente d’aggregazione e \(q\) la fluorescenza a \(t = \infty\). In questo caso i segnali sono stati generalmente normalizzati a 24 h e su di essi è stato applicato un filtro di smoothing mediando i valori in un intorno di 2 h.

3.4.2. Test del Congo red
Anche il colorante rosso Congo si lega selettivamente alle fibrille amiloidi, modificando così il proprio spettro di assorbimento nel visibile [Klunk WE et al. 1989]. L’interazione sembra instaurarsi grazie alla presenza di ripetuti foglietti \(\beta\) (Fig. 3.4). Il
test può quindi supportare quello della tioflavina, soprattutto nella valutazione degli effetti di eventuali inibitori dell’aggregazione amiloide.

**Figura 3.4.** Doppia ipotesi d’interazione fra Congo red e fibrille amiloidi [riadattamento da Frid P et al. 2006].

Una soluzione di Congo red 50 mM in tampone a pH 7,4 (150 mM in NaCl e 5 mM in fosfato di sodio) è stata preparata il giorno d’impiego, filtrata attraverso pori di 0,2 µm e poi diluita 50 volte nello stesso tampone cloruro di sodio-fosfato di sodio. Si sono poi registrati gli spettri d’assorbimento di: 1) tampone (440 µl) unito alla soluzione delle fibrille amiloidi (60 µl; nel caso dell’HEWL dopo diluizione 1:20 in HCl a pH 2,0); 2) soluzione diluita di Congo red (440 µl) unita alla soluzione di HCl in cui sono state prodotte le fibrille (60 µl); 3) soluzione diluita di Congo red (440 µl) unita alla soluzione delle fibrille (60 µl). Dopo aver corretto tutti questi spettri sottraendo lo spettro del solo tampone, si è determinato lo spettro differenza 3) - 2) - 1): un tipico red-shift nel massimo d’assorbanza del colorante e la comparsa di un picco a 540 nm sono stati considerati indicativi della formazione d’aggregati amiloidi con struttura a foglietto β.

I vari spettri sono stati acquisiti tramite uno spettrofotometro UV-visibile Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 (Uppsala, Svezia), usando una cuvetta Hellma (Müllheim, Germania) con un cammino ottico di 4 x 5 mm.

**3.4.3. Dicroismo circolare**

L’analisi al CD, assieme alla spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier, permette una valutazione della tipologia di struttura secondaria (random, ad α-elica o a foglietto β) delle proteine [Johnson WC 1990]. I carboni α di tutti gli aminoacidi ad
eccezione della glicina (molecola non chirale) assorbono in modo disomogeneo i due raggi polarizzati circolarmente in verso opposto da cui può considerarsi costituito un fascio di luce sottoposto a polarizzazione lineare. Questo è dovuto ai diversi angoli diedri che ogni C forma con l’azoto precedente e il carbonio successivo. L’ellitticità del segnale, ossia la differenza dell’assorbimento destro e sinistro, viene espressa in milligradi. Talora si riportano le differenze fra i coefficienti di estinzione molare (Δε) delle componenti destra e sinistra del raggio incidente (Fig. 3.5). Programmi specifici permettono di deconvolvere gli spettri CD e risalire quindi alle percentuali di struttura α, β ecc. nella proteina in esame [Greenfield NJ 1996].


L’aggregazione amiloide del peptide 49-64, in presenza o meno di sostanze polifenoliche, è stata seguita anche tramite dicroismo circolare. Gli spettri nel lontano ultravioletto (190-250 nm) sono stati registrati usando una velocità di scansione di 50 nm/min, con step di 0,5 nm, e una fessura nella selezione del raggio incidente di 1 nm. Ogni spettro è stato mediato su cinque scansioni e corretto per sottrazione dello spettro del solvente. I campioni contenevano 0,13 mg/ml di peptide in HCl a pH 4,0. La temperatura (25 °C) è stata regolata tramite un termostato.
Gli spettri sono stati acquisiti su uno spettropolarimetro J-810 della Jasco (Hachioji, Giappone), usando una cuvetta della Hellma (Müllheim, Germania) con un cammino ottico di 1 x 10 mm.

3.4.4. Dynamic light scattering

L'analisi al DLS di una dispersione colloidale permette di determinare il diametro idrodinamico apparente dei vari tipi di particelle presenti. La grandezza in oggetto rappresenta il diametro di un sistema di particelle sferiche che darebbe lo stesso tipo di diffusione della luce incidente del campione analizzato. In pratica sul colloide viene inviato un raggio laser pulsante, osservandone da un'angolazione prefissata le variazioni in dispersione della luce (scattering) causate nel tempo dalla fase discontinua in moto browniano (Fig. 3.6). Si ricava così il coefficiente di diffusione delle particelle, a sua volta correlato dall'equazione di Stokes-Einstein al loro diametro idrodinamico (questo in caso di sfere) [Schmitz KS 1990].

![Diagram](image)

**Figura 3.6.** Schema di apparecchiatura per DLS (Zetasizer Nano-S della Malvern Instruments).

Le soluzioni iniziali di HEWL (0,41 mg/ml; pH 2,0 per HCl) sono state fatte passare attraverso un filtro da 0,02 µm e studiate a 25°C. Durante la formazione delle fibrille amiloidi i campioni sono stati diluiti fino a una concentrazione finale in proteina pari a 10 µM.
Il peptide 49-64 è stato osservato a una concentrazione iniziale di 0,38 mg/ml in HCl a pH 4,0, sempre previa filtrazione. Di nuovo si è lavorato a 25 °C. Le fibrille corrispondenti sono state analizzate a una concentrazione pari a 100 µM. Le analisi sono state condotte anche in presenza di alcuni polifenoli.

Tutte le indagini di scattering sono state effettuate su un apparecchio Zetasizer Nano-S della Malvern Instruments (Malvern, Regno Unito), utilizzando cuvette monouso con un cammino ottico di 10 mm. Nello strumento il laser a He-Ne generava una luce monocromatica con lunghezza d’onda pari a 633 nm. Un attenuatore ne lasciava poi passare in automatico dallo 0,0003% al 100%. La diffusione veniva osservata con un angolo di 173° rispetto al raggio incidente.

3.5. ANALISI MORFOLOGICA DELLE FIBRILLE AMILOIDI

L’analisi morfologica delle fibrille amiloidi è attualmente effettuata, oltre che con la microscopia elettronica, con quella a forza atomica. La tecnica sfrutta le interazioni elettrostatiche che s’instaurano tra una piccolissima punta ed il campione, permettendo di risolvere strutture, anche con dimensioni nanometriche, senza mai penetrare nel materiale. La sonda è una microleva (cantilever) alla cui estremità si trova una piccola punta piramidale in silicio. Essa è messa in oscillazione alla sua frequenza di risonanza, e una volta avvicinata alla superficie in analisi segue la sua topografia con un movimento a scansione nel piano (x, y) e in z, movimento generato da un attuatore piezo-elettrico. I suoi spostamenti sono controllati e rivelati tramite un sistema ottico: un laser è focalizzato sulla microleva ed il raggio riflesso è inviato ad un foto-rivelatore. Un sistema di feedback tra la microleva ed il meccanismo di movimentazione permette di ricostruire l’andamento della superficie studiata in immagini tridimensionali (Fig. 3.7).
Per l'analisi in AFM, effettuata dal Dottor B. Tiribilli, del Consiglio Nazionale delle ricerche - Istituto dei Sistemi Complessi, Sezione di Firenze, le soluzioni di HEWL o del peptide 49-64, in presenza o meno di polifenoli, sono state scongelate e diluite con acqua fino a concentrazioni proteiche pari a 20 o 10 µM. Circa 5 µl di tale materiale sono stati agitati gentilmente e poi depositati su un dischetto di mica la cui superficie era stata appena rinnovata in seguito a sfaldamento tramite nastro adesivo. Il materiale proteico è stato fatto aderire alla mica, ricca di cariche negative, per circa 2 min, poi lavato per due volte con acqua e quindi asciugato tramite un leggero flusso di azoto.

Le scansioni AFM sono state effettuate all'aria in modalità di contatto dinamico usando un microscopio PicoSPM equipaggiato con un ACC-Mode controller, dell'Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Sono state usate non-concat cantilever in silicio modello NGS-01 della NT-MDT (Mosca, Russia), con una tipica frequenza di risonanza di 150 kHz. La calibrazione dello scanner è stata effettuata periodicamente tramite una griglia di riferimento TGZ02 della MikroMash (Tallinn, Estonia), di passo 3 µm e altezza 104 nm. I campi osservati avevano dimensioni variabili dai 450 x 450 nm² ai 30 x 30 µm². Le immagini acquisite sono state processate e analizzate tramite il software WSxM, versione 3.0 Beta 10.0, della Nanotec Electronica S. L. (Madrid, Spagna) [Horcas I et al. 2007]. In particolare le dimensioni degli aggregati proteici sono state ricavate dall'applicazione di specifiche funzionalità del software ai profili in altezza delle varie immagini topografiche, avendo cura di considerare un numero significativo.

Figura 3.7. Schema di un’apparecchiatura per AFM.
(diverse decine) di particelle. Normalmente questi calcoli statistici hanno coinvolto campi di osservazione di 3 x 3 µm.

3.6. SOLUBILIZZAZIONE DEI POLIFENOLI E LORO STUDIO PRELIMINARE

Poiché scarsamente solubili, alcuni polifenoli sono stati preventivamente dischiolti in dimetilsolfossido (DMSO), procedendo così a incubazioni in presenza di quantitativi finali di tale solvente pari allo 0,2-5%. L’impiego di queste ridotte concentrazioni di DMSO non ha rivelato nessun effetto degno di nota sui processi di aggregazione studiati. Sulle problematiche di solubilizzazione dei polifenoli con attività anti-amiloidogenica non erano del resto disponibili molti lavori scientifici.

Nel caso dell’estratto di rosmarino è stato necessario portare a secco, riprendere con un minimo volume di DMSO (solvente risultato pari al 5% v/v nei campioni incubati con la proteina modello) e diluire infine con una soluzione d’acido cloridrico a pH 2,0. Talvolta si è proceduto anche a centrifugazioni, che comunque non hanno alterato la composizione globale in polifenoli, come controllato tramite HPLC/DAD dal gruppo di ricerca della Professoressa N. Mulinacci.

Prima dell’impiego nei test contro l’aggregazione amiloide, sono state verificate, per ciascun polifenolo, eventuali interferenze con il saggio della ThT: in pratica sono stati acquisiti gli spettri d’emissione fra 450 e 500 nm delle varie molecole a fronte di un’eccitazione costante a 440 nm.

3.7. VERIFICA DELLA STABILITÀ DEI POLIFENOLI NELLE CONDIZIONI D’IMPIEGO

Visti i dati un po’ frammentari disponibili in letteratura, la stabilità a pH acido (fino a 2,0) e a caldo (fino a 65 °C) delle principali sostanze fenoliche impiegate è stata monitorata tramite apparecchiature HPLC/DAD e HPLC/MS, accertandosi della presenza o meno d’eventuali prodotti di degradazione. Anche in questo caso il controllo è stato eseguito dal gruppo di lavoro della Professoressa N. Mulinacci.

3.8. AGGREGAZIONE AMILOIDE IN PRESENZA DI POLIFENOLI

La formazione di fibrille di HEWL o del peptide 49-64 è stata studiata in presenza di quantità per lo più stechiometriche dei vari polifenoli.
Negli esperimenti con HEWL e miscele di due polifenoli, ciascuno di questi è stato usato in genere alla concentrazione 1 mM.

Lavorando con gli estratti, normalmente portati a secco in rotavapor e ripresi con una soluzione di acido cloridrico a pH 2,0, sono state usate concentrazioni in polifenoli totali pari di nuovo a 1 mM.

3.9. VALUTAZIONE DELLA DOSE-DIPENDENZA DEGLI EFFETTI ANTI-AMILOIDOGENICI

La dose-dipendenza dell’effetto anti-amiloidogenico di alcuni polifenoli è stata valutata tramite l’incubazione assieme all’HEWL o al peptide 49-64 a concentrazioni diverse dall’equimolare (5:1, 4:1, 2:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:7, 1:10, 1:20), sempre monitorando il processo tramite il test della ThT. Lavorando con il peptide 49-64 si è in genere ritenuto opportuno abbassare la concentrazione a 150 \( \mu M \), in modo da dilatare un po’ i tempi della sua aggregazione amiloide.

Il fitting dei dati è stato in ogni caso realizzato tramite la funzione:

\[
y = \frac{Bx}{K + x}
\]

dove B rappresenta l’inibizione massima ottenibile nel processo di aggregazione amiloide e K la concentrazione polifenolica alla quale l’effetto inibitorio risulta metà di quello massimo.

3.10. TEST DI DISAGGREGAZIONE DELLE FIBRILLE AMILOIDI

Gli studi sull’effetto disaggregante di alcune sostanze polifenoliche sono stati eseguiti sempre tramite il test fluorimetrico della ThT. Campioni di proteina modello sono stati incubati per varie ore e addizionati poi di quantità equimolari di polifenoli. L’incubazione è stata quindi monitorata per qualche altro giorno.

3.11. MOLECULAR MODELING

Gli studi preliminari di molecular modeling sono stati eseguiti dal Professor F. Melani, del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell’Ateneo fiorentino. Sono state scelte diciassette delle molecole testate. Ciascuna di esse è stata sottoposta ad analisi conformazionale con la metodica denominata \textit{simulated annealing}. Questa è una tecnica che si basa sulla simulazione dei moti molecolari con i principi della dinamica
molecolare. Il simulated annealing è stato condotto nel vuoto ad una temperatura massima di 900 K.

A tale scopo si è utilizzato il force-field CFF91 implementato nel programma DISCOVER, versione 2006, dell’Accelrys (San Diego, USA).

Il simulated annealing usato prevedeva un rapido riscaldamento simulato fino alla temperatura di 900 K; le molecole sono state tenute a questa temperatura per 10 ps e successivamente lasciate raffreddare per 3 ps, ed infine rilassate (con minimizzazione dell’energia conformazionale) con l’algoritmo conjugate gradient fino a quando il valore massimo del gradiente d’energia fosse risultato minore di 0,05 kcal/A. Questo ciclo di riscaldamento-raffreddamento-minimizzazione è stato ripetuto 200 volte, ed ad ogni ciclo è stata raccolta una conformazione. Si sono pertanto ottenute duecento conformazioni per molecola, raggruppate poi in cluster con un RMS (root mean square) relativo ai gruppi farmacoforici (atomi donatori - Do - o accettori - Ac - d’idrogeno) inferiore a 2 Å. Come gruppi donatori sono stati considerati solo gli ossidrili fenolici, indispensabili per l’attività anti-amiloidogenica. Per ogni composto sono state considerate, nelle elaborazioni successive, almeno il 50% delle conformazioni ottenute. Per ogni cluster è stata calcolata la conformazione media. Nelle conformazioni medie sono state poi cercate le combinazioni di farmacofori comuni a tutte le molecole. Per tale ricerca è stata presa come molecola di riferimento il cumestrolo, sostanza assai attiva contro l’aggregazione amiloide del peptide 49-64 e con pochi gruppi farmacoforici ed elevata rigidità strutturale. Fra tutte le possibili soluzioni ne sono state scelte due, entrambe con un gruppo accettore e due gruppi donatori (Fig. 3.8). Tali soluzioni avevano come riferimenti i due -OH fenolici (donatori di legame a idrogeno Do1 e Do2) e i due ossigeni del gruppo lattoneico (accettori di legame a idrogeno Ac(a) e Ac(b)).

Figura 3.8. Struttura chimica del cumestrolo. Le lettere (a) e (b) mettono in evidenza gli ossigeni del gruppo lattoneico utilizzati come accettori di legame a idrogeno nelle due soluzioni prescelte.

Sono state misurate le distanze fra i tre farmacofori. Infine è stato verificato attraverso un’opportuna analisi statistica se le distanze osservate nelle molecole attive fossero significativamente diverse da quelle rilevate nei composti inattivi. In questo
caso sono state considerate attive le sostanze in grado di inibire l'aggregazione amiloide del peptide 49-64 per almeno il 30%. Per verificare le differenze tra i due gruppi (molecole attive e inattive) è stato effettuato il \textit{t-test} per comparare le medie e calcolato il relativo \( p \) per verificare se l'ipotesi dell'uguaglianza dei due gruppi fosse da ritenersi nulla (\( p<0,05 \)). Poiché il calcolo del \( t \) di Student prevede che la varianza delle due popolazioni a confronto sia significativamente uguale (\( p>0,05 \)), sono state comparate le deviazioni standard dei due gruppi attraverso l'\textit{F-test} e la valutazione della probabilità \( p \). Per visualizzare le differenze tra i due gruppi è stato costruito il "\textit{Box-and-Whisker Plot}".

I calcoli relativi al \textit{t-test} e all'\textit{F-test} e i grafici "Box-and-Whisker" sono stati realizzati con il programma d'elaborazione statistica STATGRAPHICS Plus della Manugistics (Rockville, USA).
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. AGGREGAZIONE AMILOIDE DELL’HEWL E DEL PEPTIDE 49-64

Le cinetiche di aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide di sintesi 49-64 sono state ricostruite tramite un numero notevole di prove (alcune decine), lavorando in genere in duplicato o triplicato, e monitorando i processi tramite il test della ThT (Par. 3.4.1). Le curve di fitting (Par. 3.4.1.1) ottenute sono riportate in Fig. 4.1.

![Cinetiche di aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide](image)

**Figura 4.1.** Cinetiche di aggregazione amiloide dell’HEWL (A) e del peptide 49-64 (B), monitorate tramite il test della ThT.

Utilizzando l’SDS-PAGE (Par. 3.2) è stato possibile confermare la correlazione fra la fase di latenza di 2-3 giorni mostrata dalla curva A della Fig. 4.1 e la proteolisi cui va incontro l’HEWL in ambiente acido a caldo (Fig. 4.2). La banda più scura della seconda lane da sinistra nel gel, corrispondente alla proteina nativa, è risultata gradualmente scomparire al procedere dell’incubazione, lasciando il posto a vari frammenti di peso molecolare inferiore a 10 kDa. Dopo 65 h di riscaldamento il fenomeno può considerarsi già in fase avanzata. Anche in questo caso, oltre che alla proteolisi, lo stadio di latenza deve essere correlato ai fenomeni di nucleazione preliminari all’accrescimento delle strutture β-amiloide. Dopo la fase di elongazione, il processo ha raggiunto rapidamente un plateau (intorno al settimo giorno). I valori di fluorescenza registrati a questo livello sono risultati abbastanza dispersi. Ciò può essere imputato sia alle difficoltà di prelievo delle fibrille (del tutto insolubili) che alla graduale comparsa di fenomeni di scattering. Utile si è comunque rivelato l’impiego di punte per pipette opportunamente tagliate all’estremità.
Figura 4.2. SDS-PAGE di soluzioni di HEWL in vari momenti della sua aggregazione amiloide. In ogni pozzetto sono stati depositati 2 µg di proteina. La corsa elettroforetica ha avuto una durata di 50 min.

Nel caso del peptide 49-64 (curva B) il processo di aggregazione è apparso molto più breve (si è giunti ad un plateau abbastanza definito già dopo 8-12 h). La lag phase è risultata praticamente assente (non si ha infatti la necessità della frammentazione iniziale), per cui la cinetica complessiva dell’aggregazione è stata riprodotta con una curva esponenziale.

La progressiva formazione di fibrille amiloidi mature è stata successivamente indagata tramite AFM (Par. 3.5), in genere su campioni precongelati (Fig. 4.3). Dal confronto fra le immagini di preparati freschi o conservati a -20 °C è emerso che il congelamento non ha praticamente influenza su questo tipo di analisi. Le strutture fibrillari di HEWL (sul piano statistico circa il 7% degli aggregati presenti nel campo A3) sono risultate lunghe da 0,3 a 3 µm e con un diametro di 4-8,5 nm.
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Figura 4.3. Immagini AFM di un preparato di HEWL (A1, dopo 70 h di incubazione, A2, dopo 99 h di incubazione, A3, dopo 242 h di incubazione) e del peptide 49-64 (B, incubato 24 h). Per ottenere campi di osservazione con un ridotto numero di aggregati tutti i campioni sono stati diluiti fino a una concentrazione finale pari a 20 µM.

Questi valori possono considerarsi in buon accordo con altri dati già riportati in letteratura: diametri di circa 4 nm e lunghezze di oltre 5 µm nelle fibrille di HEWL formatesi in 69 h a pH 2,0 e 57 °C [Arnaudov LN et al. 2005]. D'altra parte proprio quest'ultimo lavoro sottolinea come i tempi e i prodotti dell'aggregazione amiloide siano fortemente influenzati dal pH e dalla temperatura. Le fibrille amiloidi ottenute dal peptide 49-64 (oltre il 19% degli aggregati presi in considerazione) hanno rivelato dimensioni (lunghezza: 0,1-6,5 µm; diametro: 6-8,5 nm) paragonabili a quelle già descritte (lunghezza superiore a 1 µm e diametro di 10 nm) tramite la microscopia elettronica [Krebs MR et al. 2000].

L'organizzazione spaziale degli aggregati ottenuti dall'HEWL e dal peptide 49-64 è stata confermata anche dal test del Congo red (Par. 3.4.2). Questi risultati sono raccolti nella Fig. 4.4. La presenza di una “spalla” intorno a 540 nm nello spettro 3 e di un corrispondente massimo nello spettro differenza (di colore blu) hanno indicato la formazione di materiale con struttura β. Prove ulteriori hanno mostrato come tali segnali si possano ritrovare anche nelle soluzioni preparate a fresco, ma in misura minore (spettri non riportati). Nel caso dell’HEWL potrebbero formarsi aggregati con struttura β già nel corso della sua purificazione e/o liofilizzazione; nel caso del peptide 49-64 la presenza di tale materiale è di fatto imputabile all'elevata propensione all’aggregazione amiloide in ambiente acquoso. L’impiego di campioni congelati o meno non è sembrato influenzare l’indagine spettrofotometrica in questione.
Figura 4.4. Spettri di assorbimento di preparati di HEWL e di peptide 49-64 giunti al termine delle rispettive incubazioni.

Un ulteriore supporto strumentale all’analisi dell’aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide 49-64 è venuto dal DLS (Par. 3.4.4). Anche in questo caso sono stati presi in considerazione preparati provenienti o meno da scongelamento, senza notare sostanziali differenze. Nel caso dell’HEWL, dopo filtrazione il diametro idrodinamico apparente è risultato di pochi nm, come prevedibile per una proteina globulare. Dopo 123 h di incubazione a pH = 2,0 e a 65 °C tale diametro è salito a circa 100 nm (Fig. 4.5).

Per il peptide 49-64 il DLS ha mostrato una popolazione abbastanza eterogenea già al momento dell’allestimento dei preparati (dimensioni a partire da circa 1 nm), probabilmente a causa della rapidità con cui si innescano in questo caso i processi di aggregazione amiloide. Tuttavia dopo poche ore di incubazione, quando il segnale della ThT si è innalzato notevolmente, il diametro idrodinamico medio delle particelle è risultato spostato verso valori superiori ai 100 nm (Fig. 4.6).
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Figura 4.5. Distribuzione statistica delle popolazioni di particelle di HEWL nativo (A, concentrazione finale 50 µM) e sottoposto a prolungata incubazione (B, concentrazione finale 10 µM).

Figura 4.6. Distribuzione dei diametri idrodinamici degli aggregati di peptide 49-64 dopo 7 h di incubazione (concentrazione utilizzata: 200 µM).

Nel caso del peptide 49-64 la cinetica di aggregazione amiloide è stata seguita anche tramite CD, acquisendo spettri a tempi diversi e procedendo alla loro deconvoluzione tramite opportuno software (Par. 3.4.3). I dati raccolti hanno mostrato il progressivo evolversi del sistema da una condizione prevalentemente destrutturata...
(random) a una ricca di strutture β, come desumibile anche dal profilo generale degli spettri della Fig. 4.7.

**Figura 4.7.** Spettri CD del peptide 49-64 durante il processo di aggregazione amiloide. Concentrazioni usate: 0,067 mM.

In particolare l’incremento del segnale a 216 nm è stato considerato indicativo della comparsa di struttura β. In relazione al tempo tale parametro è risultato seguire una legge di tipo esponenziale (Fig. 4.8).

**Figura 4.8.** Aumento del valore assoluto di ellitticità in campioni 0,067 mM di peptide 49-64 al procedere dell’aggregazione amiloide.
In previsione del ricorso al DMSO per disciogliere preliminarmente i polifenoli con più elevata lipofilica, sono state eseguite prove di aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide 49-64 in presenza di varie concentrazioni del solvente in oggetto. Con l’HEWL si sono testate concentrazioni di DMSO pari anche al 5% v/v; con il peptide 49-64, per il quale erano necessarie concentrazioni dei reattivi cinque volte minori, si è arrivati fino all’1%. Nel caso dell’HEWL non si sono notate sostanziali variazioni nella cinetica dell’aggregazione amiloide (Fig. 4.9).

![DMSO effect on HEWL amyloid aggregation](image)

**Figura 4.9.** Effetto della presenza di un 5% di DMSO sull’aggregazione amiloide dell’HEWL.

Anche lavorando con il peptide 49-64, in genere più sensibile alle variazioni del mezzo, l’andamento del processo di aggregazione amiloide (curva esponenziale) non è risultato alterato, sebbene si siano registrati valori di fluorescenza leggermente più alti. Ogni attività anti-amiloidogenica è stata comunque normalizzata usando come controlli soluzioni di proteina modello contenenti le stesse quantità di DMSO dei preparati polifenolici testati.
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.2. ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DI MOLECOLE POLIFENOLICHE

La selezione dei composti fenolici da sottoporre a screening ha tenuto conto sia della loro distribuzione negli alimenti e nelle piante medicinali che della struttura chimica. Rifacendosi alla tradizionale classificazione di J. B. Harborne sono stati pertanto testati acidi tannici e idrossicinnamici, composti appartenenti a diverse sottoclassi dei flavonoidi (flavonoli, flavoni, isoflavoni, antocianidine e flavanoli) e un derivato stilbenico. Nessuna di queste molecole era stata precedentemente impiegata nello studio dell’aggregazione amiloide dell’HEWL. Le varie sostanze sono state testate in entrambi i sistemi modello, o, in caso di solubilità molto bassa (si vedano ad esempio i flavoni e gli isoflavoni), solo su quello peptidico.

Per tutti i composti gli studi preliminari di stabilità non hanno evidenziato, nei range di temperatura e di pH di impiego, processi di degradazione degni di nota. D’altra parte è noto da tempo che le soluzioni acide dei polifenoli sono mediamente assai stabili, tanto da poter essere sottoposte in alcuni casi a decozione.


4.2.1. Tannini

I tannini costituiscono i polifenoli a più elevato peso molecolare, e quindi presentano molteplici possibilità di interazione con le molecole proteiche. Sulla base di queste considerazioni l’acido tannico, un tannino idrolizzabile, miscela di esteri del glucosio con una o più molecole di acido gallico, è stata una delle prime sostanze testate (Fig. 4.10).

L’acido tannico è ampiamente diffuso nell’alimentazione umana: si ritrova infatti in frutta, tè, vino rosso.
Data la sua buona solubilità, il prodotto è stato testato sull’aggregazione amiloide sia dell’HEWL che del peptide 49-64.

Prima di essere utilizzato in prove da monitorare con il test della ThT il polifenolo è stato discolto negli opportuni solventi, eccitato a 440 nm e osservato in fluorescenza intorno ai 485 nm. Questo per accertarsi che un suo eventuale segnale non interferisse con quello della ThT. Di fatto nelle soluzioni di acido tannico, HCl e ThT si sono registrati segnali leggermente superiori a quelli dei solventi di controllo (Fig. 4.11). La sottrazione di volta in volta del bianco correlato ha in ogni modo reso le singole misure corrette e riproducibili.

![Fig. 4.10. Struttura di una delle molecole polimeriche che costituiscono l’acido tannico (PM = 1701 g/mol).](image)

![Fig. 4.11. Spettri in fluorescenza di soluzioni di acido tannico e dei relativi bianchi in seguito a eccitazione a 440 nm.](image)

Nei saggi con ThT questo polifenolo è risultato uno degli inibitori più efficaci dell’aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide 49-64. I valori di fluorescenza sono
stati normalizzati rispetto ai segnali dei controlli al termine della formazione di fibrille. A processo completato le percentuali di inibizione si sono attestate su valori di oltre l’80% (Fig 4.12). Nel caso dell’HEWL il polifenolo non ha modificato sostanzialmente la prima parte della cinetica di aggregazione (fase di latenza e inizio della fase esponenziale): si veda a tale proposito la parte A della figura.

**Figura 4.12.** Cinetiche di aggregazione amiloide dell’HEWL (A) e del peptide 49-64 (B) in assenza o in presenza di acido tannico.

Per valutare quali specie molecolari potevano essere responsabili dell’attività residua nel test della ThT, e soprattutto per escludere la presenza di oligomeri, in genere citotossici, sono state acquisite anche immagini AFM dei campioni di HEWL e di peptide 49-64 incubati in presenza del polifenolo in analisi (Fig. 4.13). Sul piano statistico un 20-40% delle particelle presenti nei campi osservati sono risultate fibrille mature (diametri fino a 8-11 nm e lunghezze di alcuni µm). Si è così ipotizzato che l’acido tannico si leghi fin dall’inizio dell’incubazione ai precursori amiloidi e ne blocchi l’allungamento, come ampiamente testimoniato dal test della ThT, ma che alcune molecole proteiche riescano comunque a sfuggire all’inibitore, trasformandosi con il tempo in entità fibrillari.
Figura 4.13. Immagini AFM di fibrille amiloidi ottenute dall’HEWL (A) e dal peptide 49-64 (B) in presenza di acido tannico. I campioni di HEWL sono stati incubati per 282 h, quelli di peptide 49-64 24 h. Per l’osservazione al microscopio sono stati poi diluiti rispettivamente 100 e 10 volte.

La residuale presenza di materiale proteico con struttura a foglietti β in campioni di HEWL o peptide 49-64 incubato con acido tannico è stata confermata anche dal test del Congo red (Fig 4.14). Gli spettri differenza (in blu) hanno infatti evidenziato un caratteristico picco intorno a 540 nm.

Figura 4.14. Test del Congo red per l’HEWL e il peptide 49-64 incubati in presenza di acido tannico.
Nel caso del peptide 49-64 anche il DLS ha fornito ulteriori indicazioni circa la progressiva comparsa di strutture macromolecolari in campioni incubati con acido tannico (Fig. 4.15).

![Graph A]

**Figura 4.15.** Distribuzione dei diametri idrodinamici degli aggregati di peptide 49-64 dopo 2 (A), 6 (B) e 24 h (C) di incubazione con acido tannico. Prima dell’analisi a 24 h il campione è stato diluito 1:2 con acqua.

Sempre con il peptide 49-64 sono state effettuate anche alcune analisi in dicroismo circolare. La tipologia degli spettri acquisiti ha messo in luce un progressivo aumento della percentuale di struttura $\beta$ nel corso dell’incubazione. Tale incremento è
stato comunque inferiore a quello osservabile durante l’aggregazione amiloide del peptide 49-64 da solo, come testimoniato del resto dal segnale a 216 nm (Fig 4.16).

Figura 4.16. Spettri CD del peptide 49-64 durante l’incubazione in presenza di acido tannico (A). Concentrazioni usate: 0,067 mM. Nell’immagine B la variazione di ellitticità a 216 nm è stata messa a confronto con quella del peptide 46-64 da solo: entrambi i tracciati ottenuti hanno mostrato un decadimento esponenziale del segnale.

La dose-dipendenza dell’effetto anti-amiloidogenico dell’acido tannico è stata saggia lavorando con il peptide 49-64 a concentrazioni leggermente inferiori a quelle ordinarie (150 µM anziché 200 µM). Rallentando un po’ il processo si è probabilmente
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

dato modo al polifenolo di prendere contatto, anche quando molto diluito, con le nascenti strutture amiloidi. L’andamento iperbolico dell’inibizione osservata è riportato nella Fig. 4.17. La concentrazione alla quale il processo di aggregazione amiloide risulta inibito per il 50% (IC$_{50}$, Par. 3.9) è in questo caso pari a 12,7 µM.

![tannic acid effect on HEWL peptide amyloid aggregation](diagram)

**Figura 4.17.** Dose - dipendenza dell’effetto inibitorio dell’acido tannico sull’aggregazione amiloide del peptide 49-64. A 27 h tale processo è risultato pressoché completo.

### 4.2.2. Acidi idrossicinnamici e derivati

All’interno di questa classe di polifenoli sono stati testati l’acido rosmarinico, la curcumina, l’acido cicorico, l’acido caffeico, la cinarina, il verbascoside e l’acido clorogenico. (Fig. 4.18).

Figura 4.18. Strutture dei vari composti idrossicinnamici impiegati: acido rosmarinico (A), curcumina (B), acido cicorico (C), acido caffeico (D), cinarina (E), verbascoside (F), acido clorogenico (G).

L’impiego di questo gruppo di sostanze nello studio dell’aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide 49-64 non è risultato sempre facile. Per motivi di solubilità la cinarina è stata testata solo con il peptide 49-64, e anche in questo caso dopo una prima dissoluzione in DMSO. Il quantitativo finale del solvente nella miscela incubata è risultato pari all’1% v/v. Anche nel caso della curcumina, ben poco solubile in ambiente acquoso, si è fatto ricorso al DMSO (l’1% lavorando con l’HEWL e lo 0,2% lavorando con il peptide 49-64).

Nessuno dei composti ha mostrato un comportamento in fluorescenza in grado di interferire con il test della ThT.

Usando tale metodo di indagine il derivato idrossicinnamico più attivo contro la formazione di fibrille amiloidi è risultato l’acido rosmarinico (percentuali di inibizione pari all’84% nel caso dell’HEWL e al 63% nel caso del peptide 49-64). L’aggregazione amiloide dell’HEWL è stata in parte frenata anche dalle altre sostanze: per l’82% dall’acido cicorico, per il 58% dal verbascoside, per il 46% dalla curcumina, per il 28% dall’acido caffeico e per il 20% dall’acido clorogenico. Di nuovo in presenza di polifenoli la prima parte della cinetica dell’aggregazione non si è discostata molto da quella dei controlli. Nelle prove sul peptide 49-64 l’effetto anti-amiloidogenico è risultato generalmente più basso: la curcumina ha inibito il processo per il 60%, l’acido cicorico per il 33%, la cinarina per l’1%, mentre acido caffeico, verbascoside e acido
clorogenico si sono rivelati completamente inefficaci. Esempi di curve di fitting relative a tali cinetiche di inibizione sono riportati nella Fig. 4.19.

![Graph A](image)

**Figura 4.19.** Cinetiche di aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide 49-64 in assenza e in presenza, rispettivamente, di acido cicorico (A) o di acido rosmarinico (B).

La scarsa attività dell’acido caffeoico e dell’acido clorogenico sull’aggregazione di entrambi i sistemi modello ha fatto subito pensare che la presenza di due distinti anelli fenolici costituisca un requisito importante per un buon effetto inibitorio.

La maggior parte dei campioni contenenti le sostanze idrossicinnamiche (in particolare quelle risultate più attive) al termine del periodo di incubazione è stata diluita e osservata in AFM, in modo da caratterizzare sul piano morfologico le strutture presenti. A seconda dei casi sono state identificate particelle abbastanza diverse tra loro. Non sono comunque risultate presenti protofibrille raggruppate in strutture anulari, che rappresentano alcune delle formazioni più sospette dal punto di vista della citotossicità. Nel caso dell’HEWL incubato con acido rosmarinico le specie predominanti (sul piano statistico il 95% circa di quelle presenti nei campi osservati) sono risultate con diametri inferiori ai 4 nm, ma con forma allungata (0,8 \( \mu \text{m} \) circa); in presenza di acido cicorico è comparso un 80% circa di protofilamenti, sebbene con lunghezza inferiore al \( \mu \text{m} \). Il peptide 49-64 in presenza di acido rosmarinico è sembrato formare alcune strutture con diametro di 10 nm, lunghe però solo 0,2 \( \mu \text{m} \); in presenza poi di curcumina sono comparse specie protofibrillari o più piccole (complessivamente il 98%), di lunghezza di nuovo intorno agli 0,2 \( \mu \text{m} \). Anche una sostanza inefficace, secondo il test della ThT, nell’inibire l’aggregazione amiloide del peptide 49-64 (l’acido clorogenico) è stata oggetto di indagine AFM: il dato interessante che ne è emerso è la comparsa non tanto di fibrille, ma mediamente di aggregati con diametri inferiori ai 5 nm e lunghezze massime di 0,2-0,3 \( \mu \text{m} \). Tutto ciò lascia presupporre che anche questo
polifenolo interagisca con il peptide 49-64, modificandone in qualche modo il processo di aggregazione amiloide, sebbene non impedendo la formazione di materiale strutturato (positivo al test della ThT). Alcuni esempi di immagini AFM raccolte sono presentati in Fig. 4.20.

Figura 4.20. Scansioni AFM di preparati di HEWL (immagini A) o del peptide 49-64 (immagini B) contenenti acido rosmarino (A1), acido cicorico (A2), curcumina (B1) o acido clorogenico (B2). I campioni di HEWL sono stati incubati rispettivamente per 282 e 233 h, quelli di peptide 49-64 48 o 32 h. Prima dell’osservazione al microscopio la proteina nativa è stata diluita 100 o 200 volte, il peptide di sintesi 40 o 20 volte.

L’effetto anti-amiloidogenico dei derivati idrossicinnamici più interessanti è stato indagato anche tramite il test del Congo red. Sono stati presi in considerazione acido rosmarino e acido cicorico incubati con HEWL, e acido rosmarino, curcumina e acido clorogenico incubati con il peptide 49-64. In genere il test ha rivelato la presenza di aggregati con struttura β. Solo nel caso del campione contenente peptide 49-64 e acido rosmarino il caratteristico picco a 540 nm è venuto a mancare (Fig. 4.21),
attestando così una predominanza del materiale amorfo (o almeno senza foglietti β). Questo sembra indicare l’acido rosmarinico come uno dei polifenoli più promettenti e sicuri, dal punto di vista della citotossicità, nell’inibizione dell’amiloidosi.

Figura 4.21. Test del Congo red sul peptide 49-64 incubato per 24 h in presenza di acido rosmarinico.

Nel caso del peptide 49-64 incubato con curcumina il picco a 540 nm è risultato presente, ma poco intenso. Di nuovo è stato ipotizzato un parziale reindirizzamento del processo amiloidogenico verso la formazione di materiale amorfo.

Per quanto concerne le analisi al DLS, si è ritenuto opportuno controllare solo l’aggregazione amilide dell’HEWL in presenza o meno del derivato idrossicinnamico più attivo, l’acido rosmarinico. Mentre in fase iniziale le dimensioni medie delle particelle sono risultate praticamente indistinguibili nei controlli e nei campioni addizionati di polifenolo, al procedere dell’incubazione i diametri idrodinamici sono apparsi maggiori nei preparati contenenti la sola proteina (Fig. 4.22).

Con il peptide 49-64 sono state effettuate anche alcune analisi al CD, sempre nel corso dell’incubazione con l’acido rosmarinico (Fig 4.23). La tipologia degli spettri acquisiti ha indicato un aumento della percentuale di struttura β nel corso dell’incubazione sensibilmente minore rispetto a quello rilevato per l’acido tannico (si veda la Fig. 4.16).
Figura 4.22. Distribuzione dei diametri idrodinamici degli aggregati di HEWL dopo 114 h di incubazione in assenza (A) o in presenza di acido rosmarinico (B). Prima dell’analisi i campioni sono stati diluiti 1:100 con acqua.

Figura 4.23. Spettri CD del peptide 49-64 durante l’incubazione in presenza di acido rosmarinico. Concentrazioni usate: 0,067 mM.
L’incremento è stato per altro assai meno consistente di quello osservabile durante l’aggregazione amiloide del peptide 49-64 da solo, come testimoniato del resto dal segnale a 216 nm.

### 4.2.3. Flavonoli

Fra i primi flavonoidi a essere testati si ricordano i flavonoli rutina, quercetina e quercetina-3-galattoside o iperoside (Fig. 4.24).

La quercetina e i suoi mono e diglicosidi (rutina) sono stati introdotti nello studio in quanto presenti in una grande varietà di frutti e vegetali [Erlund I et al. 2006]. Del resto la quercetina era già stata scelta in vari lavori come uno dei capostipiti delle sostanze fenoliche attive contro la formazione di fibrille amiloidi [Hirohata M et al. 2007; Zhu JT et al. 2007].

Dato il loro carattere abbastanza idrofobico, i tre composti sono stati dissciolti preliminarmente in DMSO. Nonostante questo, nelle condizioni di impiego delle prove con l’HEWL solo la quercetina-3-galattoside è risultata solubile. Il quantitativo di DMSO presente nelle miscele incubate è stato pari al 5% v/v. Nelle cinetiche con il peptide 49-64 il solvente organico è stato invece usato, nel caso di tutti e tre i flavonoli, alla concentrazione dell’1%.

Gli spettri registrati al fluorimetro di varie soluzioni delle tre sostanze hanno escluso la possibilità di interferenze nel test della ThT.

Dai saggi con tale fluoroforo è emersa una media attività della quercetina-3-galattoside contro la formazione di fibrille amiloidi di HEWL (effetto inibitorio pari al 50%); lavorando con il peptide 49-64 tale attività si è ridotta al 15%. Rutina e
4. Risultati e discussione

Quercetina hanno inibito il processo di aggregazione amiloide della molecola peptidica rispettivamente del 40 e del 39%. Un esempio di cinetica di inibizione è riportato in Fig. 4.25.

![Figura 4.25. Effetto anti-amiloidogenico della quercetina-3-galattoside incubata con il peptide 49-64.](image)

4.2.4. Flavoni e biflavoni

Un secondo gruppo di flavonoidi sottoposto a screening contro l'aggregazione amiloide è stato quello dei flavoni. A rigore si sono testati un unico flavone, la scutellareina, e due analoghi strutturali in forma dimera, l'hinokiflavone e l'amentoflavone (Fig. 4.26).

![Figura 4.26. Strutture del flavone e dei biflavoni testati: scutellareina (A), hinokiflavone (B) e amentoflavone (C).](image)
La scutellareina è presente nelle foglie di varie piante, soprattutto del genere *Scutellaria*, ed è già stata oggetto di molti studi nel campo della medicina cinese. L’hinokiflavone si ritrova invece nelle bacche di ginepro [Innocenti M *et al.* 2007]. L’amentoflavone, infine, è stato isolato dalle foglie di *Ginkgo biloba* [Van Beek TA 2002]. I due biflavoni sono stati selezionati per estendere lo screening ad altri composti ad alto peso molecolare oltre all’acido tannico.

A causa della loro scarsa idrofilia, scutellareina, hinokiflavone e amentoflavone sono stati testati solo sul peptide 49-64, e anche in questo caso dopo una prima dissoluzione in DMSO. Nei campioni incubati tale solvente è risultato pari allo 0,2%.

Mentre la scutellareina non ha mostrato un comportamento in fluorescenza in grado di interferire con il test della ThT, nelle soluzioni di amentoflavone, e soprattutto di hinokiflavone, assieme a HCl e ThT si sono registrati segnali leggermente superiori a quelli dei solventi di controllo. Nuovamente la sottrazione caso per caso degli opportuni bianchi ha reso le singole misure corrette e riproducibili. Un esempio di spettro in fluorescenza con possibili interferenze con la ThT è riportato nella figura 4.27.

![spettri in fluorescenza dell'hinokiflavone](image)

**Figura 4.27.** Fluorescenza di soluzioni di hinokiflavone e del relativo bianco in seguito a eccitazione a 440 nm.

Dalle misure effettuate tramite ThT è emersa una notevole attività anti-amiloidogenica da parte dell’hinokiflavone (66% di inibizione). L’effetto è risultato inferiore nel caso dell’amentoflavone e della scutellareina (rispettivamente 39% e 32% di inibizione). Questi dati hanno fornito un’ulteriore indicazione dell’importanza del numero di anelli fenolici e del loro reciproco orientamento ai fini dell’interazione con le proteine amiloidogeniche. La Fig. 4.28 riporta un esempio delle cinetiche di inibizione ottenute.
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Figura 4.28. Cinetica di aggregazione amiloide del peptide 49-64 in assenza e in presenza di hinokiflavone.

Nel caso dell’hinokiflavone, la sostanza più attiva, l’interferenza con l’aggregazione amiloide è stata oggetto anche di indagini morfologiche tramite AFM. Anche in questo caso si è registrata la presenza, a fine processo, di aggregati assai diversi dalle fibrille amiloide, ma comunque con dimensioni superiori a quelle delle protofibrille e dei protofilamenti (Fig. 4.29).

Figura 4.29. Scansione AFM di preparato di peptide 49-64 in presenza di hinokiflavone. Il campione è stato incubato per 48 h. Prima dell’osservazione al microscopio si è proceduto a diluire 40 volte.

Sul piano statistico, infatti, il 75% delle particelle presenti nei campi osservati ha mostrato diametri superiori ai 5 nm (e lunghezze medie intorno agli 0,3 µm).

Il carattere strutturato di tali specie ha ricevuto conferma dal test del Congo red. Lo spettro di assorbimento registrato presentava infatti il picco a 540 nm tipico delle strutture β, in accordo con la fluorescenza residua nel test della ThT.
4.2.5. Isoflavoni e derivati

All'interno del gruppo degli isoflavoni sono state prese in considerazione due molecole abbastanza simili, la genisteina e la daidzeina. A queste è stato poi affiancato un fitoestrogeno, il cumestrolo, che rappresenta un cumestano derivante dalla struttura isoflavoronica. D'altra parte attività estrogeniche risultano da tempo descritte anche per la genisteina e la daidzeina [Valachovicova T et al. 2004; Moutsatsou P 2007]. Le formule delle tre sostanze sono riportate in Fig. 4.30.

![Figura 4.30. Strutture degli isoflavoni e derivati sottoposti allo screening: genisteina (A), daidzeina (B) e cumestrolo (C).](image)

Le fonti principali di questi composti sono le leguminose. In particolare la soia e i suoi derivati ne apportano un quantitativo rilevante [Nielsen IL et al. 2007]. In ogni modo le tre molecole sono state introdotte nello screening soprattutto per valutare se la posizione di attacco dell’anello B al corpo del flavonoide sia in grado di modularne l’attività anti-amiloidogenica.

Questi flavonoidi sono risultati poco solubili in ambiente acquoso, per cui si è potuto testarli solo sull’aggregazione amiloide del peptide 49-64, e solo dopo averli inizialmente dischiolti in DMSO. Il solvente organico è risultato pari, nella miscela di incubazione, allo 0,2% nel caso della genisteina e della daidzeina, e all’1% nel caso del cumestrolo.

Dal punto di vista del comportamento in fluorescenza solo la daidzeina ha mostrato una sia pur modesta capacità di interferire con il test della ThT (dati non riportati). In ogni modo lavorando con tale molecola le letture fluorimetriche fatte sono state sistematicamente corrette sottraendo i segnali dei vari bianchi.

Dai dati raccolti tramite il saggio della ThT il cumestrolo è risultato una delle sostanze più attive contro la formazione di fibrille amiloidi del peptide 49-64 (64% di inibizione, come facilmente rilevabile dalla Fig. 4.31).
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Figura 4.31. Effetto anti-amiloidogenico del cumestrolo incubato con il peptide 49-64.

Del tutto inefficaci sono risultate invece la genisteina e la daidzeina.
Il preparato contenente peptide 49-64 e cumestrolo al termine dell’incubazione è stato osservato in AFM (Fig. 4.32).

Figura 4.32. Immagine AFM di fibrille amiloidi ottenute dal peptide 49-64 in presenza di cumestrolo. Il campione è stato incubato per 48 h. Prima dell’osservazione al microscopio si è proceduto a diluire 40 volte.

Le strutture allungate presenti nei campi osservati (mediamente di 1,9 \( \mu \)m) hanno rivelato per la maggior parte (in oltre il 90% dei casi) diametri tipici di protofilamenti e protofibrille. In qualche zona tuttavia l’analisi delle immagini topografiche ha indicato la presenza di vere e proprie fibrille. Come nel caso dell’acido tannico si può pertanto ipotizzare che il segnale residuo nel test della ThT sia dovuto non tanto a oligomeri, ma a materiale maggiormente strutturato, e quindi con una presunta minore citotossicità.
4.2.6. Antocianine

Le antocianidine e i relativi glicosidi (antocianine) rappresentano dei polifenoli ancora poco studiati, soprattutto nel campo delle malattie amiloidi. Per tale motivo nel presente screening ne sono state inserite ben tre: la keracianina, la kuromanina e la malvina, tutte impiegate nella forma di cloruri (Fig. 4.33).

Figura 4.33. Strutture delle tre antocianine impiegate: keracianina (A), kuromanina (B) e malvina (C).

Si tratta di pigmenti fenolici largamente diffusi nel mondo vegetale, responsabili del colore rosso di bacche, uva e vino [McGhie TK et al. 2007]. Differiscono fra loro per la struttura dell’aglicone o per il grado di glicosilazione, ma tutte contengono il caratteristico ione flavilio, con una carica positiva sul sistema coplanare di queste molecole. Tale carica sull’atomo di ossigeno assicura la solubilità in ambiente acquoso. Queste molecole sono assai stabilì a pH acido, come richiesto nell’incubazione dell’HEWL e del peptide 49-64.

Gli spettri in fluorescenza dei tre polifenoli non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

Globalmente le antocianine studiate hanno mostrato una buona attività anti-amiloidogenica nei confronti dell’HEWL: 82% di inibizione nel caso della keracianina, 57% in quello della kuromanina e 15% in quello della malvina. Lavorando sul peptide 49-64, invece, solo la keracianina ha rivelato un sia pur modesto effetto inibitorio (9%). Un esempio di cinetica di inibizione è riportato in Fig. 4.34.
Figura 4.34. Cinetica di aggregazione amiloide dell’HEWL in assenza e in presenza di keracianina.

Per la keracianina e la malvina la cinetica di aggregazione amiloide è stata studiata anche a pH 2,0, cioè in condizioni di indubbia stabilità dello scheletro antocianidinico (cinetiche non riportate). Questo al fine di escludere la possibilità che una così forte diminuzione del loro effetto anti-amiloidogenico nel passare dai test sull’HEWL a quelli sul peptide 49-64 fosse dovuta a eventuali decomposizioni della struttura flavonoidica a pH 4,0. Di fatto entrambi i polifenoli si sono rivelati sostanzialmente inattivi anche a pH 2,0.

Per quanto concerne la proteina intera, l’effetto anti-amiloidogenico della keracianina e della kuromanina è stato investigato anche tramite l’AFM (Fig. 4.35).

Figura 4.35. Immagini AFM di soluzioni di HEWL contenenti keracianina (A) o kuromanina (B), dopo incubazione, rispettivamente, per 233 e 240 h. Prima dell’osservazione al microscopio entrambi i campioni sono stati diluiti 200 volte.
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel caso della keracianina il 76% delle formazioni presenti nei campi osservati è apparso allungato (0,8 µm), e con diametro tipico dei protofilamenti e delle protofibrille. Una piccola percentuale del materiale è risultata classificabile come fibrilla amiloide matura. Il campione contenente kuromanina ha rivelato strutture con diametri mediamente più grandi (per l’8% superiori ai 7 nm), e con lunghezze di circa 0,5 µm. Tutto questo materiale ha fornito una spiegazione del segnale residuo nel test della ThT, ed è risultato di dimensioni sostanzialmente superiori a quelle degli oligomeri considerati più citotossici (in particolare i solubili).

Nel caso della kuromanina la presenza di aggregati con struttura β è stata confermata anche dal test del Congo red.

4.2.7. Flavanoli

All’interno delle strutture flavanoliche, così diffuse in natura e nell’alimentazione umana, sono state sottoposte a screening l’epigallocatechina gallato, la (+)catechina e la (-)epicatechina (Fig. 4.36).

![Figura 4.36. Strutture dei flavanoli testati: epigallocatechina gallato (A), (+)catechina (B) e (-)epicatechina (C).](image)


Durante il lavoro sperimentale nessuna delle tre sostanze ha creato problemi di solubilizzazione.

Anche gli spettri registrati al fluorimetro delle loro soluzioni hanno escluso la possibilità di interferenze con il test della ThT.
Come nel caso degli antociani, le misure fluorimetriche in presenza di ThT hanno rivelato per i fenoli in questione un buon effetto anti-amiloidogenico negli esperimenti con l’HEWL, e attività pressoché trascurabili in quelli con il peptide 49-64. In particolare l’effetto inibitorio sulla formazione di fibrille amiloidi di HEWL è risultato pari all’86% nel caso dell’epigallocatechina gallato, al 46% in quello della (+)catechina e al 37% in quello della (-)epicatechina. Lavorando con il peptide 49-64 solo l’epigallocatechina gallato ha mostrato una qualche inibizione, sebbene modesta (6%). Un esempio degli effetti anti-amiloidogenici registrati si trova in Fig. 4.37.

**Figura 4.37.** Cinetica di aggregazione amiloide dell’HEWL in assenza o in presenza di (+)catechina.

Per la sostanza più attiva fra i flavanoli testati, l’epigallocatechina gallato, si sono raccolti anche alcuni dati morfologici (tramite AFM), in modo da interpretare meglio il suo modesto effetto sull’aggregazione amiloide del peptide 49-64 (Fig. 4.38).

**Figura 4.38.** Scansione AFM di una miscela di peptide 49-64 ed epigallocatechina gallato incubata 31 h. Prima dell’osservazione al microscopio si è proceduto a diluire 20 volte.
Dal punto di vista statistico nei campi AFM osservati la maggior parte degli aggregati presenti (82%) sono risultati con diametri compresi fra 2 e 5 nm, e lunghi mediamente 0,7 µm.

Tale materiale, pur non potendo venire classificato come fibrillare, ha mostrato di possedere già una certa quota di struttura β: ne è venuta infatti conferma dal test del Congo red (oltre che ovviamente dai saggi stessi con ThT). Per poter escludere ogni possibile effetto di citossicità da parte degli aggregati osservati sarebbero stati necessari opportuni test su cellule. In ogni modo in recenti esperimenti con l’α-sinucleina e il peptide Aβ l’epigallocatechina gallato è sembrata inibire la fibrillogenesi reindirizzando il processo verso la formazione di oligomeri non strutturati, ma comunque stabili e atossici [Ehrnhoefer DE et al. 2008].

L’analisi con il DLS è stata effettuata solo sui preparati di HEWL ed epigallocatechina gallato, la molecola più promettente fra le tre studiate. Anche in questo caso è emersa la progressiva formazione, nei giorni, di strutture macromolecolari insolubili, ragionevolmente più grandi di eventuali oligomeri con sospetta citotossicità (Fig. 4.39).

Figura 4.39. Distribuzione dei diametri idrodinamici degli aggregati di HEWL dopo 68 (A) e 162 h (B) di incubazione con epigallocatechina gallato. Prima dell’analisi i campioni sono stati diluiti 1:100 con acqua.
4.2.8. Stilbeni

In questa categoria di sostanze, meno rappresentate nella dieta umana rispetto agli acidi fenolici e ai flavonoidi, è stato preso in considerazione solo l’isomero trans del resveratrolo (Fig. 4.40).

![Struttura chimica del resveratrolo (isomero trans).](image)


Sul piano pratico la ridotta solubilità in acqua del polifenolo in questione ha costretto di nuovo all’impiego preliminare del DMSO. Tale solvente è risultato l’1% v/v nelle soluzioni di HEWL sottoposte a incubazione, e lo 0,2% v/v in quelle del peptide 49-64.

Gli spettri registrati al fluorimetro di varie soluzioni di resveratrolo hanno escluso la possibilità di interferenze del composto nel test della ThT.

Sia nelle prove con l’HEWL che in quelle con il peptide 49-64 il polifenolo stilbenico non ha mostrato alcun effetto anti-amiloidogenico. Questo ha messo in luce anzitutto la specificità della proteina modello nell’interazione con i possibili inibitori dell’aggregazione amiloide, fatto non del tutto scontato, data la somiglianza morfologica e strutturale di tutte le fibrille fino a oggi studiate. La mancata attività, inoltre, ha di nuovo confermato l’importanza nelle molecole oggetto dello screening di altri punti di interazione oltre ai due anelli fenolici già individuati. Il che ovviamente è stato di stimolo per programmare alcune simulazioni di molecular modeling.
4.3. ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DI ASSOCIAZIONI DI POLIFENOLI

Prima di saggiare l’effetto anti-amiloidogenico di estratti vegetali, in genere con all’interno una miscela assai complessa di sostanze fenoliche, si è ritenuto opportuno incubare l’HEWL con alcune associazioni di due dei polifenoli testati. Si sono scelte coppie di molecole appartenenti o meno alle stesse classi chimiche. Lo scopo di queste prove preliminari è stato quello di verificare se le attività anti-amiloidogeniche dei singoli composti presentassero caratteristiche additive o addirittura sinergiche a livello di miscela, e se l’eventuale azione combinata fosse correlabile all’appartenenza a specifiche categorie chimiche. Ciò anche nell’ottica di ricavare utili indicazioni su quali estratti vegetali già caratterizzati dal punto di vista analitico sottoporre a screening contro l’aggregazione amiloide.

All’interno del medesimo raggruppamento chimico (quello degli acidi idrossicinnamici e derivati) si sono testate le seguenti coppie di sostanze:

1) verbascoside / acido clorogenico;
2) verbascoside / acido caffeico.

Lavorando invece con classi diverse di composti si sono provate le associazioni:

1) (+)catechina (flavanolo) / verbascoside (derivato idrossicinnamico);
2) (+)catechina (flavanolo) / acido caffeico (derivato idrossicinnamico);
3) (+)catechina (flavanolo) / acido clorogenico (derivato idrossicinnamico);
4) acido clorogenico (derivato idrossicinnamico) / malvina (antocianina).

Mediamente da questi studi preliminari è emerso un incremento di attività anti-amiloidogenica solo per le associazioni di polifenoli appartenenti a classi chimiche diverse. Ad esempio all’interno dei derivati idrossicinnamici l’acido clorogenico (responsabile di un 20% di inibizione quando usato da solo) e il verbascoside (fonte di un 58% di inibizione in analoghe condizioni) hanno rivelato un’attività in miscela pari a circa il 40%; analogamente verbascoside (per l’attività si veda sopra) e acido caffeico (responsabile di un’inibizione del 28%) quando impiegati assieme hanno mostrato un effetto anti-amiloidogenico globale del 50% circa.

Viceversa il derivato idrossicinnamico acido clorogenico (si veda sopra) e il flavonoide malvina (sostanza in grado di frenare l’aggregazione amiloide solo per il 15%) hanno fornito un’attività inibitoria complessiva pari a oltre il 50% (Fig. 4.41).
Figura 4.41. Effetto di un’associazione equimolare di acido clorogenico e malvina sull’aggregazione amiloide dell’HEWL.

Negli altri casi studiati non sono emerse sinergie, ma se mai parziali additività degli effetti. Per esempio il flavonoide (+)catechina (effetto inibitorio pari al 46%) e il derivato idrossicinnamico verbascoside (si veda sopra) sono risultati in grado di ridurre di oltre il 65% la formazione di fibrille di HEWL.

Per quanto il fenomeno in oggetto non sia stato studiato in modo sistematico in funzione di concentrazioni crescenti dei singoli polifenoli, i dati raccolti hanno fatto ipotizzare che classi diverse di sostanze non agiscano in modo competitivo fra loro.

Tutti queste considerazioni hanno perciò spinto a testare estratti contenenti possibilmente sia derivati idrossicinnamici che flavonoidi (in particolare antociani).
4.4. ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DI ESTRATTI VEGETALI


I dati raccolti hanno un valore di studio preliminare, ma sono importanti, vista la scarsa letteratura attualmente reperibile sugli estratti vegetali e i loro impieghi nel campo delle amiloidosi. In particolare fino ad oggi mancano studi specifici sull’azione diretta del materiale ottenuto da estrazioni di piante sul processo di formazione delle fibrille amiloidi. D’esisteva finora va considerato che con l’alimentazione vengono continuamente assunti polifenoli, in quantitativi non elevati, ma sempre in miscela fra loro. Le informazioni raccolte dai nostri primi esperimenti sono già state presentate ad un convegno di chimica degli alimenti (“VII Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti, Perugia, 23-26 giugno 2008), i cui atti andranno in stampa a breve.

4.4.1. Estratto di radicchio rosso

Questo estratto è stato ottenuto a partire dalle foglie fresche di radicchio rosso di Treviso o Cichorium intybus silvestre [Innocenti M et al. 2005].

La miscela idroalcolica ha mostrato un contenuto totale di polifenoli pari a 0,7 mmol/l. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno inoltre individuato come predominanti due acidi idrossicinnamici, l’acido cicorico e l’acido clorogenico, ed un’antocianidina, la cianidina malonil-glucoside (Fig. 4.42). Per le determinazioni quantitative sono stati usati i seguenti standard esterni: acido clorogenico (per gli acidi idrossicinnamici, curva a 330 nm) e keracianidina (per gli antociani, curva a 520 nm).
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Figura 4.42. Analisi HPLC/DAD d’estratto idroalcolico di radicchio rosso. Nel cromatogramma sono stati evidenziati i picchi corrispondenti all’acido clorogenico (A), all’acido cicorico (B) e alla cianidina malonil-glucoside (C, di cui è stata riportata anche la formula chimica).

La presenza d’acido cicorico e di antociani, molecole mediamente con spiccata attività anti-amiloidogenica nei test con l’HEWL, è stata alla base della selezione di questo preparato fra i vari disponibili.

Prima dell’impiego con l’HEWL, l’estratto è stato portato a secco e ripreso con una soluzione d’acido cloridrico a pH 2,0.

Gli spettri in fluorescenza di quest’ultima miscela non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

Pertanto si è passati ad incubare preparato polifenolico e HEWL in quantità equimolari (calcoli riferiti ai polifenoli totali), seguendo il processo con ThT. Anche in questo caso i valori di fluorescenza sono stati normalizzati rispetto ai segnali dei controlli al termine della formazione di fibrille. N’è emersa un’ottima attività anti-amiloidogenica (89% d’inibizione della comparsa di fibrille). La cinetica dell’aggregazione amiloide è risultata di nuovo sigmoidale, ma rispetto alla curva di controllo solo la lag phase è apparsa immodificata, mentre la pendenza della fase
esponenziale ha evidenziato una notevole riduzione. Come con molti polifenoli puri l’effetto inibitorio sull’aggregazione amiloide del peptide 49-64 si è rivelato un po’ più basso, pari al 75% (Fig. 4.43).

Gli elevati valori d’inibizione emersi da queste prove hanno confermato l’ipotesi di possibili effetti additivi fra le varie componenti polifenoliche presenti in un estratto vegetale. Nel caso specifico, tra l’altro, i principali fenoli in gioco sono risultati appartenere ad almeno due classi chimiche diverse.

L’attività anti-amiloidogena del radicchio rosso è stata oggetto anche d’indagini tramite AFM. Al termine dell’incubazione i preparati di HEWL ed estratto idroalcolico hanno rivelato, nei campi osservati, la presenza di una vasta gamma di particelle, una buona parte delle quali (a livello statistico oltre il 25%) con diametri superiori ai 2 nm, classificabili indicativamente come protofibrille, protofilamenti o fibrille amiloidi mature (Fig. 4.44). Molti degli aggregati sono risultati comunque di forma allungata (assi mediamente di 0,7 µm). Queste osservazioni si sono rivelate in buon accordo con quelle fatte testando l’acido cicorico da solo.

La formazione di materiale con struttura β è stata confermata anche dalla positività al test del Congo red.

**Figura 4.43.** Cinetiche d’aggregazione amiloide dell’HEWL (A) e del peptide 49-64 (B) in assenza e in presenza d’estratto di radicchio rosso.
Il notevole effetto anti-amiloidogenico dell’estrauto di radicchio rosso è stato infine oggetto di prove di dose-dipendenza. L’andamento iperbolico dell’inibizione osservata è riportato nella Fig. 4.45.

L’IC\textsubscript{50} è risultata in questo caso pari a 110 µM.

### 4.4.2. Estratto di rosmarino

Questo estratto etanolo è stato preparato a partire dalle foglie di *Rosmarinus officinalis* L., tipica pianta aromatica della macchia mediterranea (Giaccherini C et al. in “Atti del 6° Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti”, a cura di Coisson J.D., Arlorio M., Martelli A., Alba, (CN), 7-10 Novembre 2006).

La miscela ottenuta ha rivelato un contenuto totale di polifenoli pari a 1,5 mmol/l. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno mostrato come predominante l’acido rosmarinico (Fig. 4.46). L’altro grande picco presente sulla destra del cromatogramma
è risultato ascrivibile al carnosolo, fenolo complesso, con spiccato carattere lipofilo. Per le determinazioni quantitative è stato usato come standard esterno l’acido rosmarinico (curva a 330 nm).

Figura 4.46. Analisi HPLC/DAD d’estratto alcolico di rosmarino. Nel cromatogramma sono stati indicati i picchi corrispondenti al carnosolo (A, di cui è stata riportata anche la formula chimica) e all’acido rosmarinico (B).

L’elevato contenuto in acido rosmarinico, ottimo inibitore dell’aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide 49-64, è stato fondamentale per la scelta di questa miscela.

Prima dell’impiego con la proteina modello l’estratto è stato portato a secco e ripreso con DMSO. Alla successiva aggiunta di acido cloridrico a pH 2,0 è comparso un precipitato, che ulteriori analisi HPLC/DAD hanno rivelato essere quasi esclusivamente carnosolo (cromatogrammi non riportati). Tale fase insolubile è stata pertanto allontanata per centrifugazione.

Gli spettri registrati al fluorimetro della soluzione rimasta, contenente un 5% v/v di DMSO, non hanno mostrato sostanziali interferenze con il test della ThT.

Incubato con l’HEWL, l’estratto in analisi ha rivelato una discreta attività anti-amiloidogenica (46% di inibizione della comparsa di fibrille). La classica cinetica sigmoidale del processo, monitorata tramite ThT, è riportata in Fig. 4.47.
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

**Figura 4.47.** Cinetiche di aggregazione amiloide dell’HEWL in assenza e in presenza di estratto di rosmarino.

Anche in questo caso si è ritenuto opportuno verificare il tipo di aggregati presenti nei campioni al termine dell’incubazione. A tale scopo sono state fatte anzitutto scansioni in AFM dei preparati (Fig. 4.48).

**Figura 4.48.** Scansione AFM di preparato di HEWL ed estratto di rosmarino dopo 257 h di incubazione. Prima dell’analisi il campione è stato diluito 1:100 con acqua.

Sul piano statistico, nonostante le immagini AFM acquisite non fossero sempre nitide, si sono potuti osservare di nuovo vari tipi di particelle allungate (assi mediamente di 1,4 µm), oltre il 25% delle quali con diametri superiori ai 2 nm, classificabili in linea di massima come protofibrille, protofilamenti o anche fibrille amiloidi mature. Tale materiale strutturato è comunque apparso meno abbondante rispetto a quello presente in analoghi preparati di HEWL incubato da solo (Fig. 4.3, immagine A3).
La presenza di struttura $\beta$ nei prodotti d'incubazione di estratto di rosmarino e HEWL è stata confermata anche dal test del Congo red.

4.4.3. Estratto di carciofo

Questo prodotto è stato ottenuto da capolini di carciofo empolese o Cynara scolymus L. [Pinelli PP et al. 2007].

La miscela ha mostrato un contenuto totale di polifenoli pari a 47,75 mg/g di peso secco di matrice vegetale. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno inoltre individuato come predominanti due derivati idrossicinnamici, l’acido clorogenico e l’acido 1,5-di-caffeoilchinoico. Sono risultati presenti anche alcuni flavonoidi, come ad esempio l’apigenina 7-O-glucuronide, ma in quantità molto minori (Fig. 4.49). Per le determinazioni quantitative si sono impiegati i seguenti standard: acido clorogenico (per i derivati idrossicinnamici, curva a 330 nm) e luteolina 7-O-glucoside (per i flavonoidi, curva a 350 nm).

Figura 4.49. Analisi HPLC/DAD di estratto idroalcolico di carciofo. Nel cromatogramma sono stati evidenziati i picchi corrispondenti all’acido clorogenico (A), all’acido 1,5-di-caffeoilchinoico (B) e all’apigenina 7-O-glucuronide (C, di cui è stata riportata anche la formula chimica).

L’elevata presenza di acidi di-idrossicinnamici è stata l’elemento principale che ha guidato nella scelta di preparati a base di carciofo. Del resto era anche noto che le loro componenti di-caffeoilchinoiche a caldo danno vita, per isomerizzazione, ad un altro derivato di-caffeoilchinoico già testato, la cinarina (si veda Par. 4.2.2).

Prima dell’impiego con l’HEWL l’estratto è stato portato a secco e ridisciolto in una soluzione di acido cloridrico a pH 2,0.
Gli spettri in fluorescenza di quest’ultima miscela non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

L’incubazione con l’HEWL, monitorata appunto tramite ThT, ha rivelato una buona attività anti-amiloidogenica (46% di inibizione della comparsa di fibrille). In Fig. 4.50 è riportata la consueta cinetica sigmoidale del processo.

![Cinetica di aggregazione amiloide dell’HEWL in assenza o in presenza di estratto di carciofo](image1.png)

**Figura 4.50.** Cinetiche di aggregazione amiloide dell’HEWL in assenza o in presenza di estratto di carciofo.

L’effetto anti-amiloidogenico del carciofo è stato oggetto anche di indagini in AFM. Al termine dell’incubazione i preparati osservati hanno rivelato la presenza di una vasta gamma di particelle, l’82% delle quali con diametri compresi fra 2 e 5 nm, classificabili presumibilmente come protofibrille o protofilamenti (Fig. 4.51). Gli aggregati sono comunque risultati di forma allungata (assi mediamente di 0,7 µm). È stato possibile identificare anche alcune fibrille amiloidi mature.

![Scansione AFM di preparato di HEWL ed estratto di carciofo dopo 264 h di incubazione](image2.png)

**Figura 4.51.** Scansione AFM di preparato di HEWL ed estratto di carciofo dopo 264 h di incubazione. L’analisi microscopica è stata preceduta da una diluizione 1:100 con acqua.
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Anche il test del Congo red ha confermato la presenza di materiale con struttura β.

4.4.4. Estratto commerciale di carciofo

Oltre all'estratto idroalcolico di carciofo empolese è stato preso in considerazione un analogo prodotto commerciale in forma purificata e liofilizzata. Questo al fine di valutare anche la variabilità di composizione e/o di effetti biologici di campioni differenti degli stessi fitopreparati.

Il prodotto è stato rianalizzato tramite HPLC/DAD e HPLC/MS. La miscela ha rivelato un contenuto totale di polifenoli pari a 0,524 mmol/g di estratto. Sono stati individuati come predominanti due acidi idrossicinnamici, l'acido clorogenico e l'acido 1,5-di-caffeoilchinico. Sono risultati presenti anche alcuni flavonoidi, come ad esempio la luteolina 7-O-glucoside, sebbene in quantità minori (Fig. 4.52). Per le determinazioni quantitative sono stati usati i seguenti standard esterni: acido clorogenico (per i derivati idrossicinnamici, curva a 330 nm) e luteolina 7-O-glucoside (per i flavonoidi, curva a 350 nm).

**Figura 4.52.** Analisi HPLC/DAD di estratto commerciale di carciofo. Nel cromatogramma sono stati evidenziati i picchi corrispondenti all'acido clorogenico (A), all'acido 1,5-di-caffeoilchinico (B) e alla luteolina 7-O-glucoside (C, di cui è stata riportata anche la formula chimica).

Per poter procedere con il test *in vitro* contro la formazione di fibrille amiloidi, l'estratto è stato sospeso in una soluzione d'acido cloridrico a pH 2,0. Il materiale è stato poi completamente chiarificato tramite centrifugazione, senza per altro modificare il contenuto in polifenoli, come confermato da ulteriori analisi HPLC/DAD (dati non riportati).
Gli spettri in fluorescenza della miscela ottenuta non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

Incubato con l’HEWL, l’estratto in questione ha rivelato una buona attività anti-amiloidogenica (83% di inibizione della comparsa di fibrille). La cinetica del processo di aggregazione amiloide è risultata di nuovo sigmoidale, anche se con una variabilità dei dati un po’ maggiore. Il tratto di lag phase non è apparso modificato.

La presenza, al termine dell’incubazione, di materiale con struttura β è stata in questo caso confermata solo tramite il test del Congo red.

In conclusione l’estratto commerciale di carciofo, per quanto sottoposto a poche analisi, ha confermato un comportamento analogo a quello del preparato proveniente dalla varietà empolese della pianta. Ciò è risultato per altro in buon accordo con la composizione in polifenoli, molto simile nei due estratti, soprattutto a livello di derivati idrossicinammici.

### 4.4.5. Estratto di ciliegia dolce


La miscela idroalcolica ha mostrato un contenuto totale di polifenoli pari a 8,33 mmol/l. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno individuato come predominanti gli antociani, e in particolare la keracianina e la cianidina 3-O-glucoside (Fig. 4.53). Per le determinazioni quantitative si è fatto uso, come standard esterno, della keracianina (curva a 520 nm).
**Figura 4.53.** Analisi HPLC/DAD di estratto idroalcolico di ciliegia dolce. Nel cromatogramma sono stati evidenziati i picchi corrispondenti alla keracianina (A) e alla cianidina 3-O-glucoside (B, di cui è stata riportata anche la formula chimica).

Prima dell’impiego con l’HEWL l’estratto è stato portato a secco e ridisciolto in una soluzione d’acido cloridrico a pH 2,0.

Gli spettri in fluorescenza di quest’ultima miscela non hanno manifestato interferenze con il test della ThT.

L’incubazione con l’HEWL, monitorata appunto tramite ThT, ha rivelato un’ottima attività anti-amiloidogenica (97% di inibizione della comparsa di fibrille). In Fig. 4.54 è riportata la consueta cinetica sigmoidale del processo.

![HEWL + sweet cherry extract amyloid aggregation kinetics](image)

**Figura 4.54.** Cinetiche di aggregazione amiloide dell’HEWL in assenza e in presenza di estratto di ciliegia dolce.

In questo caso l’inibizione è risultata così pronta da far quasi sparire la fase di latenza iniziale. Sicuramente si può parlare di additività fra gli effetti dei singoli antociani presenti. La rapidità dell’azione è emersa soprattutto dal confronto con la cinetica di inibizione dell’estratto di radicchio rosso, di per sé già molto efficace: i livelli massimi di fluorescenza sono stati raggiunti nell’arco di poche ore.

Di fronte a un preparato così attivo è risultato particolarmente importante indagare la natura delle particelle presenti al termine dell’incubazione con l’HEWL. Il loro aspetto morfologico è stato messo in luce, al solito, tramite l’AFM (Fig. 4.55). Nei campi osservati è risultata presente una vasta gamma di strutture, oltre il 33% delle quali con diametri superiori al 2 nm, classificabili indicativamente come protofibrille, protofilamenti o, in qualche caso, fibrille amiloidi mature. Molte delle particelle sono
risultate comunque di forma allungata (assi mediamente di 1 μm). Inoltre il loro numero complessivo è apparso assai inferiore a quello evidenziato da analoghi preparati di controllo (Fig. 4.3, immagine A3), in linea per altro con la fluorescenza registrata nel saggio della ThT. Queste osservazioni si sono rivelate abbastanza in accordo con quelle fatte testando la keracianina da sola.

![Immagine AFM](image)

**Figura 4.55.** Immagine AFM di preparato di HEWL ed estratto di ciliegia dolce dopo 257 h di incubazione. Prima dell’analisi il campione è stato diluito 1:100 con acqua.

Anche il test del Congo red ha confermato la presenza, al termine dell’incubazione, di materiale con struttura β.

**4.4.6. Estratto di ciliegia acida**

Quest’ultima miscela sottoposta a screening è stata preparata dalla drupa del *Prunus cerasus*, pianta abbastanza diffusa in Italia, anche se tipica per lo più dell’Europa settentrionale (Mulinacci N. et al. in “Polyphenols Communications”, Helsinki, 2004, 309-310).

L’estratto idroalcolico ha rivelato un contenuto totale di polifenoli pari a 2,61 mmol/l. Le analisi HPLC/DAD e HPLC/MS hanno di nuovo mostrato come predominanti gli antociani, e in particolare la cianidina 3-O-glucosirutinoside e la keracianina (Fig. 4.56). Per le determinazioni quantitative si è utilizzata, come standard esterno, la keracianina (curva a 520 nm).

Prima di procedere all’incubazione con l’HEWL l’estratto è stato portato a secco e ripreso con una soluzione di acido cloridrico a pH 2,0. Il materiale è stato poi completamente chiarificato tramite centrifugazione, senza per altro modificare il contenuto in polifenoli, come confermato da ulteriori analisi HPLC/DAD (dati non riportati).
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Figura 4.56. Analisi HPLC/DAD di estratto idroalcolico di ciliegia acida. Nel cromatogramma sono stati indicati i picchi corrispondenti alla cianidina 3-O-glucosi-rutinoside (A, di cui è stata riportata anche la formula chimica) e alla keracianina (B).

Gli spettri in fluorescenza della miscela recuperata non hanno mostrato interferenze con il test della ThT.

L’incubazione con l’HEWL, monitorata tramite il classico saggio della ThT, ha indicato un’attività anti-amiloide veramente notevole (98% di inibizione della comparsa di fibrille). La cinetica del processo è riportata in Fig. 4.57.

Figura 4.57. Cinetica di aggregazione amiloide dell’HEWL in assenza e in presenza di estratto di ciliegia acida.
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo caso l’effetto è risultato così rapido e intenso da far in pratica scomparire la fase di latenza. Questi dati, assieme a quelli relativi alla ciliegia dolce e, anche se in modo meno evidente, a quelli del radicchio rosso, confermano come gli antocianosidi, fino a oggi non impiegati nella ricerca contro le amiloidosi (né in vitro né in vivo), potrebbero costituire molecole molto promettenti per il futuro.

Vista l’entità dell’effetto inibitorio, si è ritenuto opportuno analizzare a fondo le particelle presenti in campioni di HEWL incubati per tempi diversi con la miscela polifenolica. A tale scopo sono state anzi tutte acquisite alcune immagini AFM (Fig. 4.58).

**Figura 4.58.** Scansioni AFM di preparati di HEWL ed estratto di ciliegia acida: (A) campione addizionato di estratto alla settantesima ora di incubazione e osservato al microscopio dopo altre 29 h; (B) campione addizionato di estratto alla novantanovesima ora e poi subito sottoposto alla scansione. In entrambi i casi l’analisi microscopica è stata preceduta da una diluizione 1:100 con acqua.

Nella prima immagine non sono state identificate strutture fibrillari, e da un punto di vista statistico solo un 8% circa delle particelle è risultato classificabile come protofilamento e/o protofibrilla. La lunghezza media degli aggregati è apparsa pari a 0,3 μm. Nella seconda immagine sono state rilevate alcune fibrille amiloidi mature e un certo numero protofilamenti e/o protofibrille (oltre metà degli aggregati presenti). Inoltre le dimensioni medie delle particelle sono apparse decisamente maggiori (circa 1 μm). Questi dati nel loro insieme hanno dimostrato l’importanza del fattore tempo per l’efficacia della miscela polifenolica contro la formazione di materiale amiloide.

Il test del Congo red eseguito al termine dell’incubazione ha confermato la presenza, sebbene con un picco a 540 nm non molto intenso, di aggregati con struttura β.
Il notevole effetto anti-amiloidogenico dell’estratto di ciliegia acida è stato oggetto anche di studi di dose-dipendenza. L’andamento iperbolico dell’inibizione osservata è riportato nella Fig. 4.59.

Figura 4.59. Dose - dipendenza dell’effetto inibitorio dell’estratto di ciliegia acida sulla formazione di fibrille amiloide di HEWL. La normalizzazione delle fluorescenze dei vari campioni su quelle dei rispettivi controlli è stata effettuata a 138 h.

L’IC₅₀ ricavata dal grafico in questione è pari a 50 µM.

Un’ultima serie di studi effettuati sull’estratto di ciliegia acida ha permesso di evidenziarne il potere disaggregante nei confronti del materiale amiloide. L’aggiunta di miscela polifenolica a tempi diversi del processo di formazione delle fibrille di HEWL ha determinato infatti una rapida caduta del segnale della ThT (Fig. 4.60). Nel caso dell’aggiunta a 70 h, abbastanza precoce, la formazione di fibrille è sembrata arrestarsi alla fase iniziale. L’effetto disaggregante dell’aggiunta a 99 h ha trovato conferma anche nei dati morfologici. A tale proposito sono state infatti confrontate l’immagine B della Fig. 4.59 e l’immagine A2 della Fig. 4.3: in presenza d’antociani gli aggregati di piccole dimensioni sembrano essere aumentati di numero. Anche i dati relativi all’aggiunta a 259 h sono apparsi chiari, nonostante la variabilità delle letture fluorimetriche in genere associate al plateau della cinetica di aggregazione amiloide dell’HEWL: il segnale della ThT si è rapidamente abbassato.
Figura 4.60. Andamento del segnale della ThT in campioni di HEWL addizionati di estratto di ciliegia acida. Le frecce indicano il momento dell’aggiunta della componente polifenolica (concentrazione finale: 1 mM).
4.5. SIMULAZIONI DI MOLECULAR MODELING

I dati già presenti in letteratura sull’effetto anti-amiloidogenico di alcuni polifenoli su proteine modello quali il peptide Aβ e l’α-sinucleina hanno già messo in luce l’importanza, per l’attività in oggetto, di due donatori di protone in legami a ponte d’idrogeno posizionati a 8-16 Å fra loro. Sull’HEWL e sul peptide 49-64, tuttavia, il resveratrolo, fenolo in grado di contrastare la formazione di fibrille amiloidi da peptide Aβ, si è dimostrato completamente inefficace.

Questa evidenza sperimentale è stata alla base della ricerca a livello teorico d’altri gruppi farmacoforici comuni alla maggior parte delle molecole studiate e in grado di spiegare i dati raccolti (soprattutto quelli relativi al peptide 49-64). Nella fattispecie è emersa la necessità, per l’effetto biologico, di possedere anche un accettore di protone in un legame a idrogeno. Alcuni composti sono stati esclusi da questo studio o perché privi di uno degli anelli fenolici (ad esempio l’acido caffeico e l’acido clorogenico) o per motivi di complessità (ad esempio l’acido tannico), o, infine, per la presenza di una carica esplicita (si vedano a questo proposito le antocianine). I polifenoli presi in considerazione sono stati pertanto i seguenti: acido rosmarinico, acido cicorico, verbascoside, curcumina, quercetina-3-galattoside, epigallocatechina gallato, (+)catechina, (-)epicatechina, cinarina, rutina, quercetina, hinokiflavone, amentoflavone, scutellareina, cumestrolo, genisteina e daidzeina.

In pratica per tutte le conformazioni molecolari medie generate via software sono state calcolate le distanze fra i tre farmacofori (Do1, Do2 e Ac), ottenendo due serie di misure, una per l’accettore in posizione (a) e una per l’accettore in posizione (b), come indicato nel Par. 3.11. I dati raccolti sono presentati in Fig. 4.61.
### Molecole attive sul peptide 49-64

<table>
<thead>
<tr>
<th>Molecola</th>
<th>D1</th>
<th>D2</th>
<th>D3</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>CUM-a</td>
<td>11,44</td>
<td>7,05</td>
<td>7,08</td>
</tr>
<tr>
<td>CUM-b</td>
<td>11,44</td>
<td>8,03</td>
<td>4,79</td>
</tr>
<tr>
<td>ROS-a</td>
<td>4,79</td>
<td>6,95</td>
<td>8,47</td>
</tr>
<tr>
<td>ROS-b</td>
<td>8,66</td>
<td>5,73</td>
<td>8,5</td>
</tr>
<tr>
<td>CUR1-a</td>
<td>6,56</td>
<td>8,34</td>
<td>9</td>
</tr>
<tr>
<td>CUR1-b</td>
<td>6,56</td>
<td>9,34</td>
<td>7,98</td>
</tr>
<tr>
<td>CUR2-a</td>
<td>11,43</td>
<td>7,87</td>
<td>9,14</td>
</tr>
<tr>
<td>CUR2-b</td>
<td>11,43</td>
<td>7,98</td>
<td>9,34</td>
</tr>
<tr>
<td>HIN-a</td>
<td>10,95</td>
<td>6,52</td>
<td>8,82</td>
</tr>
<tr>
<td>HIN-b</td>
<td>11,87</td>
<td>7,77</td>
<td>9,26</td>
</tr>
<tr>
<td>CIC1-a</td>
<td>17,42</td>
<td>7,77</td>
<td>10,26</td>
</tr>
<tr>
<td>CIC1-b</td>
<td>17,42</td>
<td>7,77</td>
<td>10,26</td>
</tr>
<tr>
<td>CIC2-a</td>
<td>11,82</td>
<td>7,61</td>
<td>8,22</td>
</tr>
<tr>
<td>CIC2-b</td>
<td>11,82</td>
<td>7,52</td>
<td>8,53</td>
</tr>
<tr>
<td>QUE-a</td>
<td>10,92</td>
<td>6,28</td>
<td>7,84</td>
</tr>
<tr>
<td>QUE-b</td>
<td>10,92</td>
<td>7,84</td>
<td>6,28</td>
</tr>
<tr>
<td>SCU-a</td>
<td>12,05</td>
<td>5,57</td>
<td>6,49</td>
</tr>
<tr>
<td>SCU-b</td>
<td>12,05</td>
<td>6,28</td>
<td>7,84</td>
</tr>
<tr>
<td>RUT1-a</td>
<td>10,84</td>
<td>6,67</td>
<td>7,47</td>
</tr>
<tr>
<td>RUT1-b</td>
<td>10,91</td>
<td>6,2</td>
<td>7,82</td>
</tr>
<tr>
<td>RUT2-a</td>
<td>10,94</td>
<td>6,26</td>
<td>7,84</td>
</tr>
<tr>
<td>RUT2-b</td>
<td>10,88</td>
<td>5,69</td>
<td>8,16</td>
</tr>
<tr>
<td>AME-a</td>
<td>11</td>
<td>6,16</td>
<td>7,06</td>
</tr>
<tr>
<td>AME-b</td>
<td>11,29</td>
<td>4,89</td>
<td>8,67</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### Molecole inattive sul peptide 49-64

<table>
<thead>
<tr>
<th>Molecola</th>
<th>D1</th>
<th>D2</th>
<th>D3</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>CAT-a</td>
<td>10,47</td>
<td>6,82</td>
<td>7,33</td>
</tr>
<tr>
<td>CAT-b</td>
<td>10,47</td>
<td>6,39</td>
<td>4,76</td>
</tr>
<tr>
<td>GEN-a</td>
<td>12,16</td>
<td>6,39</td>
<td>6,49</td>
</tr>
<tr>
<td>GEN-b</td>
<td>12,16</td>
<td>4,76</td>
<td>7,86</td>
</tr>
<tr>
<td>CIN1-a</td>
<td>4,53</td>
<td>7,61</td>
<td>7,75</td>
</tr>
<tr>
<td>CIN1-b</td>
<td>4,53</td>
<td>8,58</td>
<td>7,39</td>
</tr>
<tr>
<td>VER1-a</td>
<td>12,52</td>
<td>6,93</td>
<td>7,52</td>
</tr>
<tr>
<td>VER1-b</td>
<td>12,52</td>
<td>5,55</td>
<td>8,34</td>
</tr>
<tr>
<td>VER2-a</td>
<td>16,68</td>
<td>7,98</td>
<td>9,68</td>
</tr>
<tr>
<td>VER2-b</td>
<td>16,68</td>
<td>7,98</td>
<td>9,68</td>
</tr>
<tr>
<td>VER3-a</td>
<td>14,41</td>
<td>7,58</td>
<td>7,72</td>
</tr>
<tr>
<td>VER3-b</td>
<td>14,41</td>
<td>6,5</td>
<td>9,47</td>
</tr>
<tr>
<td>DAI-a</td>
<td>12,15</td>
<td>6,44</td>
<td>6,43</td>
</tr>
<tr>
<td>DAI-b</td>
<td>12,15</td>
<td>4,77</td>
<td>7,86</td>
</tr>
<tr>
<td>EGG-a</td>
<td>10,81</td>
<td>6,4</td>
<td>6,55</td>
</tr>
<tr>
<td>EGG-b</td>
<td>10,77</td>
<td>4,76</td>
<td>8,01</td>
</tr>
<tr>
<td>ECA-a</td>
<td>10,45</td>
<td>6,41</td>
<td>7,07</td>
</tr>
<tr>
<td>ECA-b</td>
<td>10,45</td>
<td>4,75</td>
<td>6,43</td>
</tr>
<tr>
<td>QUUG-a</td>
<td>10,87</td>
<td>6,71</td>
<td>6,83</td>
</tr>
<tr>
<td>QUUG-b</td>
<td>10,96</td>
<td>6,21</td>
<td>7,84</td>
</tr>
</tbody>
</table>

![Diagram](image-url)

Figura 4.61. Distanze medie fra i tre farmacofori dei composti policenolici studiati: in alto le definizioni grafiche e in tabella i valori numerici in Å. Il nome delle varie molecole policenoliche è stato abbreviato con una sigla di tre lettere seguite da un numero progressivo che indica il cluster preso di volta in volta in considerazione.

Per verificare se le due popolazioni (sostanze attive o inattive sull’aggregazione amiloide del peptide 49-64) fossero significativamente diverse è stato effettuato il t-test, per i due gruppi, sulle varie distanze. Tale test ha permesso di determinare se la
differenza tra le due medie di valori delle distanze fosse uguale a 0 contro l'ipotesi alternativa che non lo fosse.

Le distanze D1 (fra i due gruppi donatori di protone in legami a ponte d'idrogeno) e D2 (fra un gruppo donatore e il gruppo accettore) non sono risultate statisticamente diverse tra le due popolazioni (sostanze attive o inattive sull'aggregazione amiloide del peptide 49-64). Per D1, con varianze dei due gruppi significativamente uguali (F = 0,616845, \( p\)-value = 0,268724), l'ipotesi che la differenza delle distanze tra i raggruppamenti atomici fosse significativa non ha trovato conferma nel calcolo del t-value, che è risultato molto basso (-0,301817), con una probabilità elevata (\( p\)-value = 0,764281). In questo caso l'ipotesi che la media delle distanze delle molecole attive fosse uguale alla media delle molecole inattive (ipotesi nulla) non ha potuto essere considerata falsa (e quindi tale ipotesi è risultata vera), in quanto il valore del \( p\) non era inferiore a 0,05 (95% del livello di confidenza).

Per D2 valgono le stesse affermazioni fatte a proposito delle distanze D1: \( t = 0,692835, p\)-value = 0,492227 (per un F = 0,922 \( p\)-value = 0,84363).

La distanza D3 si è rivelata invece significativamente diversa nei due gruppi di molecole. Infatti, a fronte di una varianza significativamente uguale (F = 0,780863, \( p\)-value = 0,566657), il valore di t (2,23004) e della probabilità \( p\) inferiore a 0,05 (\( p\)-value = 0,0311458) ha confermato che l'ipotesi nulla (uguaglianza delle medie) poteva essere respinta.

La Fig. 4.62 riassume in modo grafico l'analisi statistica. Nel Box-and-Whisker Plot i valori sono divisi in quattro aree uguali di frequenza (quartili). Il box contiene il 50% dei valori mediani. La mediana è rappresentata dalla linea verticale all'interno del box. Le linee orizzontali (whiskers) sono disegnate nel seguente modo: quella a sinistra (o più bassa) a partire dal quartile più basso fino al punto con valore minore; quella a destra a partire dal quartile più alto fino al punto con valore maggiore.

Collocando i composti verbascoside ed epigallocatechina gallato, attivi sull'HEWL e inattivi sul peptide 49-64, nel gruppo delle molecole attive la differenza per le distanze D3 è risultata più significativa. Di contro D1 e D2 hanno continuato a apparire statisticamente non diverse nelle due popolazioni, anche se in modo meno marcato. I grafici relativi a queste rielaborazioni non sono stati riportati.
Il lavoro di molecular modeling ha dunque sottolineato l’importanza per l’attività anti-amiloidogenica dei legami a ponte di idrogeno instaurabili con le proteine modello. Nel caso specifico la distanza fra i farmacofori donatori non è risultata discriminante, e compresa fra 10 e 13 Å. Analoghe conclusioni sono state tratte per D2, mediamente compresa fra 4,5 e 8 Å. Un ruolo più importante è stato invece attribuito alla distanza D3, distanza tra un gruppo donatore (-OH fenolico) e un gruppo accettore, che è risultata significativamente maggiore nelle molecole attive che in quelle inattive (7,6-8,9 Å contro i 6,5-7,9 Å). Questo dato suggerisce che un gruppo accettore di legame a idrogeno sia basilare per l’attività anti-amiloidogenica nei confronti dell’HEWL e del peptide 49-64.

**4.5.1. Conferme sperimentali**

A parziale conferma delle correlazioni attività-struttura ricavate tramite il molecular modeling è stato testato sull’HEWL e sul peptide 49-64 un altro polifenolo scelto *ad hoc*, l’acido nordidroguaiaretico (Fig. 4.63).
Questo composto può essere isolato ad esempio dalla Larrea tridentata, pianta originaria dell’America settentrionale [Arteaga S et al. 2005]. Si tratta di un derivato fenolico che, come il resveratrolo, non presenta il gruppo accettore di protone Ac. Nonostante la sua minore rigidità strutturale rispetto al derivato stilbenico, la molecola si è rivelata sostanzialmente inattiva nei confronti dell’aggregazione amiloide dell’HEWL e del peptide 49-64.

Data la sua ridotta solubilità, la sostanza è stata discolta inizialmente in DMSO. Tale solvente è risultato l’1% nelle prove di incubazione con l’HEWL e lo 0,2% in quelle con il peptide 49-64.

Gli spettri registrati al fluorimetro di varie soluzioni di acido nordiidroguaiaretico hanno escluso la possibilità di interferenze del composto nel test della ThT.

Monitorata tramite la ThT, l’aggregazione amiloide dell’HEWL in presenza del polifenolo è risultata inibita solo per il 9% circa. Nel caso del peptide 49-64 l’effetto inibitorio è apparso ancora più piccolo, praticamente nullo (Fig. 4.64).
Questi dati confermano dunque come per l’attività inibitoria studiata non siano sufficienti i due gruppi donatori di protoni Do1 e Do2 (gli ossidrili fenolici), ma risulti invece determinante la presenza di un terzo farmacofo, l’accettore Ac.
5. CONCLUSIONI

Il presente progetto sperimentale è nato da alcune considerazioni preliminari sulla ricerca nel campo delle amiloidosi. In primo luogo si è osservato come negli ultimi anni l’aggregazione amiloide delle proteine sia risultata coinvolta in un elevato numero di patologie, apparentemente molto diverse fra loro. Una buona parte di queste malattie si è per altro rivelato di tipo sistemico. Pertanto, parallelamente al crescere dell’interesse scientifico e dei finanziamenti nel settore, si è andata sempre più affermando l’esigenza di trovare sostanze in grado di contrastare alla base, o meglio ancora di prevenire, un fenomeno così rilevante di misfolding delle proteine.

I polifenoli sono apparsi un buon soggetto di studio in proposito, sia per la loro notevole distribuzione nel mondo vegetale e nei cibi e nelle bevande stesse consumate dall’uomo (fatto quest’ultimo che ne attesta di per sé la non tossicità), sia per le evidenze sperimentali accumulatesi negli anni dei loro effetti protettivi e anti-invecchiamento a livello dei vari tessuti (in particolare di quello nervoso). Del resto l’assunzione di tali molecole con l’alimentazione rappresenta già un buon presupposto per un loro eventuale impiego anche in patologie di tipo sistemico.

Pertanto mediante collaborazioni con più gruppi di ricerca universitari è stata valutata l’attività anti-amiloidogenica di vari composti polifenolici o di loro miscele ampiamente rappresentate nelle piante dell’area mediterranea.

5.1. ASPETTI GENERALI DELL’ATTIVITÀ ANTI-AMILOIDOGENICA DEI POLIFENOLI

Nello screening effettuato sono stati scelti come sistemi modello l’HEWL e il peptide 49-64 per un discreto numero di motivi. Anzitutto l’HEWL è reperibile con facilità, a un elevato grado di purezza, a costi molto contenuti. Inoltre l’uso di questa proteina o del peptide 49-64 comporta rischi molto minori per il ricercatore rispetto all’impiego di peptide Aβ o α-sinucleina, le molecole maggiormente usate negli studi in vitro sull’amiloidosi. A livello operativo va poi considerato che con entrambi i modelli si è potuto lavorare in ambiente acido, nel quale la maggior parte dei polifenoli ha una buona stabilità, anche se riscaldata a medie temperature.

Anche dal punto di vista della selezione dei polifenoli si è tenuto conto di alcuni rilevanti fattori. Anzitutto della loro solubilità, alle volte assai ridotta (da cui l’importanza, in questi casi, di una pre-dissoluzione in solventi organici quali il DMSO). Tenendo presente questo si è cercato di scegliere, fra i polifenoli in commercio o disponibili...
presso altri gruppi di ricerca universitaria, sostanze che rappresentassero le quattro seguenti categorie strutturali:

1) molecole con un anello fenolico semplice (acido caffeico, acido clorogenico);
2) molecole con due anelli fenolici (acido rosmarinico, curcumina, acido cicorico, cinarina, verbascoside, resveratrolo);
3) molecole con due anelli fenolici appartenenti ad un sistema flavonoidico (cumestrolo, genisteina, daidzeina, rutina, quercetina, quercetina-3-galattoside, scutellareina, keracianina, kuromanina, malvina, epigallocatechina gallato, (-)epicatechina, (+)catechina);
4) molecole con più di due anelli fenolici (acido tannico, hinokiflavone, amentoflavone).

Ogni sostanza è stata comunque impiegata solo se reperibile ad un elevato grado di purezza.

Lavorando con l'HEWL i composti più attivi come inibitori dell'aggregazione amiloide sono risultati l'acido tannico e l'acido rosmarinico fra gli acidi fenolici, e l'epigallocatechina gallato e la keracianina fra i flavonoidi. L'acido tannico è stato considerato rappresentativo della cinetica dell'inibizione, nonché fra i casi più lineari a livello di morfologia degli aggregati ottenuti. Un quadro sinottico dell'attività dei vari polifenoli testati sull'HEWL è riportato nella Tab. 5.1, dove sono stati messi in evidenza altri interessanti parametri cinetici o strutturali.

Lavorando con il peptide 49-64 le sostanze più attive sono risultate di nuovo l'acido tannico e l'acido rosmarinico fra gli acidi fenolici, e l'hinokiflavone e il cumestrolo fra i derivati flavonoidici (Tab. 5.2).
### Tabella 5.1. Effetti inibitori dei polifenoli testati sull’aggregazione amiloide dell’HEWL.

Le sostanze più attive sono state evidenziate in grigio.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Polifenoli</th>
<th>Acidi fenolici</th>
<th>Acidi idrossicinnamici</th>
<th>Flavonoli</th>
<th>Antocianidine</th>
<th>Flavanoni</th>
<th>Stilbeni</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Tannini</td>
<td>ACIDO TANNICO</td>
<td>88%</td>
<td>91</td>
<td>n</td>
<td>x</td>
<td>y (n)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>ACIDO ROSMARINICO</td>
<td>84%</td>
<td>67</td>
<td>2</td>
<td>5</td>
<td>8</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>ACIDO CICORICO</td>
<td>82%</td>
<td>79</td>
<td>2</td>
<td>6</td>
<td>12</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>VERBASCOSIDE</td>
<td>58%</td>
<td>164</td>
<td>2</td>
<td>9 (5)</td>
<td>15 (10)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>CURCUMINA</td>
<td>1%</td>
<td>46%</td>
<td>106</td>
<td>2</td>
<td>2</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>ACIDO CAFFEICO</td>
<td>28%</td>
<td>218</td>
<td>1</td>
<td>3</td>
<td>4</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>ACIDO CLOROGENICO</td>
<td>20%**</td>
<td>280</td>
<td>1</td>
<td>6</td>
<td>9</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>QUERCETINA-3-GALATTOSIDE</td>
<td>5%</td>
<td>50%**</td>
<td>168</td>
<td>1</td>
<td>8 (4)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>KERACIANINA</td>
<td>82%</td>
<td>82</td>
<td>1</td>
<td>10 (6)</td>
<td>15 (10)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>KUROMANINA</td>
<td>57%</td>
<td>114</td>
<td>1</td>
<td>8 (4)</td>
<td>10 (6)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>MALVINA</td>
<td>15%</td>
<td>258</td>
<td>1</td>
<td>10 (8)</td>
<td>17 (12)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>EPIGALLOCATECHINA GALLATO</td>
<td>86%</td>
<td>66</td>
<td>2</td>
<td>8</td>
<td>11</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>(+)CATECHINA</td>
<td>46%</td>
<td>151</td>
<td>1</td>
<td>5</td>
<td>6</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>(-)EPICATECHINA</td>
<td>37%</td>
<td>237</td>
<td>1</td>
<td>5</td>
<td>6</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>RESVERATROLO</td>
<td>1%</td>
<td>-</td>
<td>232</td>
<td>2</td>
<td>3</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* I numeri in parentesi indicano -OH in porzioni glicidiche
** Calcolato senza fitting
Tabella 5.2. Effetti inibitori dei polifenoli testati sull’aggregazione amiloide del peptide 49-64. Le sostanze più attive sono state evidenziate in grigio.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Acidi fenolici</th>
<th>Effetti (%)</th>
<th>Inibizione con peptide 49-64 (%)</th>
<th>Time course completo (h)</th>
<th>Anelli benzenici in grado di ruotare</th>
<th>Donatori per ponti idrogeno *</th>
<th>Accettori per ponti idrogeno *</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Tannini</td>
<td>ACIDO TANNOCO 80%</td>
<td>28 n x y (n)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>ACIDO ROSMARINICO 63%</td>
<td>27 2 5 8</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>CURCUMINA 0.2%</td>
<td>60% 2 2 6</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>ACIDO CICORICO 33%</td>
<td>12 2 6 12</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>ACIDO CAFFEICO -</td>
<td>21 1 3 4</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>CINARINA 1%</td>
<td>1% 18 2 7 12</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>VERBASCOSIDE -</td>
<td>27 2 9 (5) 15 (10)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>ACIDO CLOROGENICO -</td>
<td>16 1 6 9</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Acidi idrossicinnamici</td>
<td>RUTINA 1%</td>
<td>40% 9 1 10 (6) 16 (10)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>QUERCETINA 1%</td>
<td>39% 11 1 5 7</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>QUERCETINA-3-GALATTOSIDE 1%</td>
<td>15% 23 1 8 (4) 12 (8)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Flavonoli</td>
<td>HINOKIFLAVONE*** 0.2%</td>
<td>66% 11 2 5 10</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>AMENTOFLAVONE*** 0.2%</td>
<td>39% 9 2 6 10</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>SCUTELLAREINA 0.2%</td>
<td>32% 12 1 4 6</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Flavonoidi</td>
<td>CUMESTROLO**** 1%</td>
<td>64% 20 - 2 5</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>GENISTEINA 0.2%</td>
<td>- 29 1 3 5</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>DAIDZIEINA 0.2%</td>
<td>- 28 1 2 4</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Isoflavoni</td>
<td>KERACIANINA 9%**</td>
<td>25 1 10 (6) 15 (10)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>KUROMANINA -</td>
<td>20 1 8 (4) 10 (6)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>MALVINA -**</td>
<td>8 1 10 (8) 17 (12)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Antocianidine</td>
<td>EPICALCATECHINA-GALLATO 6%</td>
<td>8 2 8 11</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>(-)EPICATECHINA -</td>
<td>16 1 5 6</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>(+)CATECHINA -</td>
<td>15 1 5 6</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Flavanoli</td>
<td>RESVERATROLO 0.2%</td>
<td>- 19 2 3 3</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

* I numeri in parentesi indicano -OH in porzioni glicidiche
** Calcolato senza fitting
*** Biflavoni
**** Fitoestrogeno derivante da struttura isoflavonica
In linea generale gli effetti inibitori sono risultati più bassi sul peptide 49-64 che non sull’HEWL (si vedano ad esempio la keracianina e l’epigallocatechina gallato). D’altra parte nel caso del peptide 49-64 l’aggregazione amiloide è stata assai più rapida (la nucleazione ha avuto luogo in pochi minuti, tanto che la cinetica del processo è risultata più di tipo esponenziale che di tipo sigmoidale). Pertanto, nonostante alcune analisi ESI-MS abbiano dimostrato una rapida interazione peptide-polifenolo (dati non riportati), si è ipotizzato che negli esperimenti fatti non tutte le molecole fenoliche avessero avuto il tempo di legarsi con gli oligomeri, i protofilamenti o le fibrille amiloidi, impedendone poi l’allungamento. Inoltre è possibile che gli aggregati amiloidi derivanti dall’HEWL presentino un maggior numero di siti d’interazione con le molecole polifenoliche che non le strutture pre-fibrillari e fibrillari generate dal peptide 49-64.

Dal punto di vista delle correlazioni attività-struttura sono emersi i seguenti elementi. I composti con un unico anello fenolico hanno mostrato un effetto anti-amiloidogenico poco significativo, addirittura nullo nel caso del peptide. La coesistenza di più di una struttura fenolica è sembrata essere pertanto un requisito indispensabile per l’inibizione studiata. Tale osservazione è stata confermata anche dagli studi di molecular modeling. D’altra parte l’acido tannico, miscela di molecole con vari anelli fenolici, ha rivelato un’ottima attività anti-amiloidogenica nei confronti sia dell’HEWL che del peptide 49-64.

Nel gruppo di sostanze con due anelli fenolici, che includeva alcune fra le molecole più attive, l’effetto inibitorio è apparso correlato alla presenza di:

1. due anelli fenolici;
2. almeno un gruppo ossidrilico in ciascuno di essi (preferibilmente in posizione para rispetto al legame con il resto della molecola);
3. una catena flessibile di 6-10 carboni fra gli anelli fenolici stessi, catena contenente almeno un atomo accettore di legami a ponte d’idrogeno, secondo quanto emerso dagli studi di molecular modeling.

Ciò che si è potuto notare è che nelle prove con l'HEWL si è lavorato ai limiti della solubilità della sostanza.

Nel gruppo dei composti flavonoidici l’effetto anti-amiloidogenico è risultato maggiore in presenza di:

1) due anelli fenolici;

2) due ossidrili (preferibilmente in meta fra loro) nell’anello A e un ossidrile in quello B (per lo più in posizione para rispetto alla connessione con il resto della molecola).

Gli studi di molecular modeling non hanno individuato le posizioni degli ossidrili come parametri determinanti per l’attività inibitoria. Tuttavia è apparsa fondamentale la presenza di due donatori di protone in legami a ponte d’idrogeno collocati ad una distanza non del tutto vincolante, ma comunque compresa in un certo range (10-13 Å). Per questo la coesistenza sugli anelli aromatici di più di un gruppo –OH (ciascuno libero di ruotare intorno al legame C-O) è sembrata condurre a conformazioni più idonee all’interazione con la proteina modello. D’altra parte più ossidrili sullo stesso ciclo aromatico permettono di modulare anche le distanze con il gruppo accettore d’idrogeno previsto dal molecular modeling stesso. Una di queste distanze è infatti risultata discriminante fra polifenoli attivi e polifenoli inattivi contro l’aggregazione amiloide studiata.

In generale l’attività anti-amiloidogenica è dunque apparsa correlata, soprattutto a livello di HEWL, al numero d’accettori e donatori di protone disponibili nel polifenolo per la formazione di legami a idrogeno con l’aggregato proteico. Questo escludendo comunque i punti d’aggancio presenti nell’eventuale porzione glicidica del fenolo (magari importante invece a livello di solubilizzazione del sistema).

La coesistenza d’anelli fenolici e di possibilità di formare legami a ponte d’idrogeno è apparsa dunque come la condizione più importante per assicurare alle molecole polifenoliche testate attività anti-amiloidogenica. Il che ha trovato per altro conferma nell’elevato effetto inibitorio mostrato dai composti appartenenti al quarto gruppo della schematizzazione precedentemente proposta (in particolare dall’acido tannico, complesso derivato galloidico).

Nel loro insieme tutti questi dati possono considerarsi in accordo con l’ipotesi già formulata secondo cui i legami a ponte d’idrogeno risultano fondamentali nello stabilizzare le interazioni idrofobiche che s’instaurano fra anelli fenolici e residui aminoacidici delle fibrille amiloide, inibendo la loro formazione [Rivière C et al. 2008; Reinke AA et al. 2007; Richard T et al. 2006].

Ovviamente ulteriori conferme delle correlazioni attività-struttura codificate dal molecular modeling potranno in futuro derivare da uno screening mirato su altre
molecole prive di almeno uno dei gruppi ritenuti fondamentali o caratterizzate da distanze non ottimali fra di loro (in particolare fra donatori e accettore di protoni in legami a ponte d'idrogeno).

I test eseguiti sugli estratti vegetali hanno fatto impiego quasi esclusivamente dell'HEWL. In media tutti i preparati hanno mostrato una buona attività anti-amiloidogenica. In particolare sono risultati molto promettenti gli estratti di ciliegia e di radicchio rosso, come sintetizzato nella Tab. 5.3, dove sono indicate anche le quantità delle varie frazioni fenoliche coinvolte.

<table>
<thead>
<tr>
<th>estratti</th>
<th>derivati fenolici o cinnamici</th>
<th>flavonoidi</th>
<th>µmoli/ml estratto</th>
<th>effetti su HEWL*</th>
<th>effetti su HEWL**</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>RRC (radicchio rosso)</td>
<td>acido clorogenico; acido cicorico</td>
<td>cianidina-3-O-glucoside; cianidina-malonil-glucoside; quercetina-3-O-glucuronide</td>
<td>antociani totali 0,05</td>
<td>89</td>
<td>240</td>
</tr>
<tr>
<td>RRC (radicchio rosso)</td>
<td>acido clorogenico; acido cicorico</td>
<td>cianidina-3-O-glucoside; cianidina-malonil-glucoside; quercetina-3-O-glucuronide</td>
<td>caffeol derivati 0,65</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>RF (rosmarino foglie)</td>
<td>acido rosmarino</td>
<td>vari in tracce</td>
<td>acido rosmarino 1,5</td>
<td>46</td>
<td>240</td>
</tr>
<tr>
<td>CC (carciofo capolini)</td>
<td>mono e dicaffeol derivati dell’acido chinico</td>
<td>luteolina-7-O-rutinoside; luteolina-7-O-glucoside</td>
<td>derivati caffeol chinici 4,5</td>
<td>83</td>
<td>228</td>
</tr>
<tr>
<td>CCc (carciofo capolini commerciale)</td>
<td>mono e dicaffeol derivati dell’acido chinico</td>
<td>luteolina-7-O-rutinoside; luteolina-7-O-glucoside</td>
<td>derivati caffeol chinici 2,58</td>
<td>83</td>
<td>94</td>
</tr>
<tr>
<td>CD (ciliegie dolci)</td>
<td>acidi fenolici</td>
<td>keracianina; cianidina-3-O-glucoside</td>
<td>antociani totali 8,3</td>
<td>97</td>
<td>16</td>
</tr>
<tr>
<td>CA (ciliege acide)</td>
<td>acidi fenolici</td>
<td>keracianina; cianidina-3-O-glucosilrutinoside</td>
<td>antociani totali 2,6</td>
<td>98</td>
<td>12</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* inibizione % nel ThT test
** h prima dell’arrivo a plateau

Tabella 5.3. Effetti inibitori degli estratti testati sull’aggregazione amiloide dell’HEWL. Le miscele più attive sono state evidenziate in grigio.

Questi dati hanno complessivamente confermato l’effetto inibitorio di alcune sostanze già testate da sole (ad esempio la keracianina e l’acido cicorico).
A livello di classi chimiche è senz’altro emerso il ruolo significativo che le antocianine potrebbero in futuro svolgere in questo settore in così forte espansione. La stessa attività dell’estrazione di radicchio rosso potrebbe infatti dipendere oltre che dai derivati idrossicinnamici, e in particolare dall’acido cicorico, dalle non trascurabili quantità di glicosidi della cianidina che lo caratterizzano.

5.2. PROSPETTIVE FUTURE

L’aggregazione amiloide è un processo che sembra essere coinvolto in un numero di patologie di giorno in giorno crescente.

I polifenoli, così diffusi nel mondo vegetale e anche nella dieta umana, si sono ormai rivelati, in test su varie proteine modello, dei buoni inibitori della formazione di fibrille amiloide.

L’HEWL e il peptide 49-64 possono costituire validi ed economici strumenti per testare l’attività anti-amiloidogenica delle molecole fenoliche e ricavarne alcune semplici correlazioni attività-struttura (quali il ruolo dei potenziali legami a ponte d’idrogeno e/o delle interazioni fra anelli aromatici). Lavorando con questi modelli proteici si usano concentrazioni, temperature e pH che permettono di saggire anche molecole con scarsa solubilità o stabilità.


Queste considerazioni sono molto importanti per un futuro impiego dei preparati fenolici, in campo nutraceutico o anche farmaceutico, contro l’aggregazione amiloide. In particolare gli antociani, stabili a livello gastrico, dove sono in parte già assorbiti, e in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, costituiscono una categoria di sostanze assai promettenti a livello di prevenzione e terapia delle amiloidosi, comprese quelle di tipo sistemico.

Ovviamente le varie molecole polifenoliche, anche quando utilizzate da tempo in medicina popolare, dovranno essere sottoposte a opportuni test su cellule (per valutarne ad esempio l’effettiva tossicità), è più in generale in vivo su animali da laboratorio.
6. BIBLIOGRAFIA


Shahidi FS and Naczk MN, 2003. "Phenolics in food and nutraceuticals". (): PAGES.


ADDENDA ET CORRIGENDA

Pag. 1, riga 11: “immunoglobulin” anziché “immunoglobulin”.
Pag. 3, riga 23: “1859 Friedereich” anziché “1959 Friedereiche”.
Pag. 12, riga 1: “sovrassaturo” anziché “sovrasaturo”.
Pag.19, riga 23: “idrossibenzoici” anziché “benzoici”.
Pag. 26, riga 31: “et” anziché “Et”.
Pag. 38, riga 37: “SGLT-1” anziché “SULT-1”.
Pag. 70, riga 15: “clorogenico” anziché “clorogenico”.
Pag. 83, riga 5: “amiloide del peptide 49-64 è” anziché “amiloide è”.
Pag. 93, riga 21: “Alba” anziché “Alba,”.
Pag. 97, riga 4: “83%” anziché “46%”.
Pag. 123, riga 40: “polyphenols” anziché “polyphenols”.