

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

*RUOLO DEI PRODOTTI FINALI DELLA GLICAZIONE AVANZATA PRESENTI NELLA
DIETA NELLE DISFUNZIONI METABOLICHE*

RELATORE: CHIAR.MO PROF MARIA TERESA CONCONI

LAUREANDO: FRANCESCA MARCHI VIDDI

ANNO ACCADEMICO: 2021/2022

INDICE

CAPITOLO 1. Gli AGEs

1.2 Formazione degli AGE

1.2.1 La reazione di Maillard

1.2.2 La via dei polioli

1.2.3 La via della perossidazione lipidica

1.3 Nomenclatura degli AGE

CAPITOLO 2. RECETTORI PER GLI AGE

2.1 RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products) e i suoi ligandi

2.2 Struttura di RAGE

2.3 Meccanismo d'azione

2.4 Altri recettori

CAPITOLO 3. LA RETE DI DETOSSIFICAZIONE DEGLI AGE

3.1 Introduzione

3.2 Gliossalasi: GLO1 e GLO2

3.3 Altri enzimi

CAPITOLO 4. EFETTI DEGLI AGE_s NELLO SVILUPPO PATOLOGICO DI DIVERSE MALATTIE: CITOTOSSICITA'

4.1 I TAGE

4.2 Citotossicità dei TAGEs nel diabete

4.2.1 Meccanismi molecolari degli AGE nelle complicazioni microvascolari del diabete (DM)

4.2.2 AGEs e le alterazioni macrovascolari nel diabete

4.3 Citotossicità dei TAGEs nel sistema nervoso

4.3.1 Effetti extracellulari e intracellulari di TAGE nelle cellule neuronali

4.3.2 Meccanismi con cui TAGE intracellulari causano danni nelle cellule neuronali

4.3.3 Segnalazione cellulare dei TAGEs nei neuroni

4.4 Citotossicità dei TAGEs nel fegato

4.4.1 TAGEs intracellulari e morte delle cellule epatiche

4.4.2 Meccanismi indotti dai TAGE intracellulari nella morte cellulare degli epatociti

4.4.3 Gli effetti extracellulari dei TAGEs sugli epatociti e sulle cellule stellate epatiche

4.5 Citotossicità dei TAGEs nel cuore

4.5.1 TAGEs intracellulari e danno cellulare ai cardiomiociti

4.5.2 TAGEs intracellulari e morte cellulare dei fibroblasti cardiaci

4.6 TAGEs e la progressione del cancro

4.7 COVID-19 e il recettore dei prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE)

4.7.1 Meccanismo d'azione di COVID-19

4.7.2 Ruolo di RAGE nelle comorbilità del COVID-19

4.7.3 RAGE nella gravità del COVID-19

4.7.4 RAGE e il sistema Renina-Angiotensina (RAS)

4.8 Gli inibitori degli AGEs

CAPITOLO 5. GLI AGEs E LA DIETA OCCIDENTALE

5.1 Introduzione

5.2 Strutture dei dAGEs

5.3 Generazione di dAGEs durante il processamento degli alimenti

5.4 Metodi analitici per caratterizzare i dAGEs

5.4.1 Pre trattamento dei campioni

5.4.2 Metodi analitici- identificazione, quantificazione e caratterizzazione

5.5. Contenuto dei dAGEs negli alimenti processati

5.5.1 Contenuto dei prodotti finali di glicazione avanzata nella carne e nei suoi sostituti

5.5.2 Contenuto dei prodotti finali di glicazione avanzata nel pane

5.5.3 Contenuto dei prodotti finali di glicazione avanzata nei prodotti di pasticceria

5.5.4. Contenuto dei prodotti finali di glicazione avanzata nel grano e nei legumi

5.5.5 Contenuto dei prodotti finali della glicazione avanzata nelle verdure e nella frutta

5.5.6 Contenuto dei prodotti finali della glicazione avanzata nella frutta secca

5.6 Metabolismo in vivo dei dAGEs

CAPITOLO 6. GLI EFFETTI DEI dAGEs SULLA SALUTE UMANA

6.1 Insulino-resistenza e diabete mellito di tipo 2

6.2 Gli effetti dei dAGEs sull'obesità

6.3 Gli effetti dei dAGEs sull'invecchiamento

6.4 Gli effetti dei dAGEs sull'intestino e sulla microflora batterica

6.5 I dAGEs sono correlati alle allergie alimentari?

6.6 Limitazioni degli studi animali dei dAGEs

CAPITOLO 7. STRATEGIE PER RIDURRE I DANNI SULLA SALUTE CONNESSI AI dAGEs

7.1 Restrizione durante la lavorazione degli alimenti: fattori chiave che influenzano la formazione di dAGEs

7.2 Controllo dell'assunzione di AGEs con la dieta

CAPITOLO 8. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Capitolo 1. Gli AGEs

1.1 I prodotti della glicazione avanzata (AGEs)

I prodotti della glicazione avanzata (AGEs) rappresentano un gruppo complesso ed eterogeneo di composti che si formano mediante una reazione non enzimatica tra zuccheri riducenti e loro derivati, gruppi amminici liberi di proteine, acidi nucleici e lipidi. Si formano come normale conseguenza dei processi metabolici, ma anche diverse fonti esogene, come la dieta, la cottura di cibi, gli alimenti trasformati e il fumo di tabacco, possono contribuire al loro assorbimento e alimentare il loro accumulo nell'organismo. Sono stati descritti per la prima volta nel 1912, periodo in cui furono inizialmente identificati in alimenti e bevande come il risultato dell'effetto della reazione di imbrunimento non enzimatico, la reazione di Maillard. L'identificazione degli AGE *in vivo* non si è verificata per i successivi 60 anni fino a quando la loro formazione è stata riconosciuta come parte del normale processo di invecchiamento con un accumulo irreversibile di AGE nei tessuti contenenti proteine a lunga emivita, come il collagene nella matrice extracellulare, le cristalline nella lente e nella cornea dell'occhio e la membrana basale nel rene. Molti studi suggeriscono che l'accumulo di tali composti contribuisca all'invecchiamento, in particolare perché la loro formazione altera la struttura e la funzione delle proteine, sviluppando così le caratteristiche distintive dell'invecchiamento. Tuttavia, studi più recenti dimostrano che la presenza di AGEs, nelle cellule e nei tessuti, è strettamente legata all'iperglicemia. Infatti, in pazienti diabetici, le molecole AGEs (libere, legate a peptidi o a proteine), si trovano nel plasma sanguigno in alte concentrazioni a causa della presenza di elevati livelli di substrati glucidici circolanti, quali glucosio e i suoi derivati. Oltre alla malattia diabetica e alle sue complicazioni microvascolari, l'accumulo prolungato di AGEs può essere correlato a diversi meccanismi patologici che sono alla base dello sviluppo di diverse malattie come l'artrite reumatoide, disordini neurologici, quali morbo di Alzheimer e morbo di Parkinson, malattie renali, malattie cardiovascolari, come aterosclerosi ed ipertensione e diversi tipi di cancro. La *tabella I* mostra un elenco delle condizioni patologiche associate agli AGE con una breve descrizione della relazione tra glicazione e malattia.

Uno dei meccanismi più importanti di danno tissutale mediato dagli AGE è la loro capacità di formare ponti intermolecolari abnormi (cross-links) a carico delle proteine, ed in tal senso il collagene è stata la proteina più studiata. La formazione di questi legami è ritenuta essere la causa delle alterate proprietà meccaniche (diminuita elasticità e solubilità) riscontrate nel collagene dei soggetti diabetici e dell'irrigidimento delle pareti arteriose, tutte alterazioni tipiche dell'aterosclerosi. Studi recenti hanno evidenziato come diverse cellule siano in grado di legare gli AGE con una cinetica di tipo saturativo. Uno dei primi recettori evidenziati in grado di legare le proteine modificate dagli AGE è il recettore "scavenger", espresso a livello dei monociti/macrofagi e dei linfociti T. Il recettore scavenger ha la funzione di degradare le molecole senescenti; nel diabete vi è una alterata regolazione di tale recettore per cui il legame tra esso ed i prodotti glicosilati innesca

una serie di reazioni in grado di determinare una serie di danni tissutali caratteristici delle complicanze croniche del diabete. Più recentemente è stato isolato il recettore RAGE, una proteina di 35 kDa che fa parte della superfamiglia delle immunoglobuline. Il legame degli AGE ai recettori dei linfociti T stimola la produzione di γ -interferone che determina a sua volta danno tissutale. Un altro meccanismo di danno degli AGE è rappresentato dal loro accumulo intracellulare, accumulo documentato nei macrofagi, in cellule muscolari lisce modificate, nella stria lipidica e nella placca aterosclerotica. I meccanismi coinvolti sono essenzialmente due: la formazione intracellulare rapida di AGE indotta dall'iperglicemia che può determinare alterazioni sia a carico delle strutture citoplasmatiche che nucleari e l'endocitosi degli AGE mediata da recettori specifici.

Studi successivi hanno identificato gli AGE, e riconosciuto il loro ruolo, come dei mediatori molecolari nell'insorgenza e nella progressione della disfunzione metabolica, attraverso l'attivazione di vie intracellulari che promuovono l'infiammazione e l'aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

A causa degli effetti tossici osservati su cellule e tessuti, alcuni AGE sono considerati delle glicotossine, che vengono ampiamente identificate con il termine "TAGE" (*toxic advanced glycation end-product*). Queste molecole inducono reazioni principalmente attraverso l'interazione con specifici recettori per i prodotti della glicazione avanzata (RAGE), ed esercitano i loro effetti tossici nei vasi sanguigni, nel fegato, nella retina, promuovendo anche lo sviluppo di diversi tipi di cancro. Tuttavia, resta ancora molto da imparare sui meccanismi biologici alla base della formazione degli AGE, la natura causale di queste associazioni e se nuovi interventi potrebbero essere sviluppati per prevenire o ridurre l'impatto negativo dei danni legati agli AGE.

Tabella I. Effetti degli AGE in varie patologie. RAGE: recettori per gli AGE; TAGE: AGE tossici; VEGF: fattore di crescita dell'endotelio vascolare

(KUZAN

et

all,2021)

Malattie/ condizioni	Tipi di AGE implicati nella malattia	Ruolo degli AGE
Retinopatia diabetica	AGE derivati da gliceraldeide, AGE derivati da glicolaldeide	Accelerano la retinopatia attraverso una sovra-regolazione dei livelli di espressione di VEGF, stimolano la sintesi di DNA e la formazione di tubuli da parte delle cellule endoteliali microvascolari che interagiscono con i RAGE

Nefropatia diabetica	TAGE	Inducono morte cellulare (apoptosi) nelle cellule mesangiali umane, e causano una iperfiltrazione e una microalbuminuria attraverso la secrezione di VEGF e proteina-1 chemiotattica dei monociti
Neuropatia diabetica	AGE derivati da MGO	Sono associati allo sviluppo di disfunzioni delle fibre grandi e piccole
Altre neuropatie (inclusa la malattia di Parkinson)	AGE-albumina	Sono associati alla neurodegenerazione attraverso una sovraregolazione di RAGE e la via di MAPK; AGE inoltre, inducono l'aggregazione di proteine e formazione di legami crociati tra molecole.
Melanoma maligno	AGE derivati da gliceraldeide, AGE derivati da glicolaldeide	Stimolano la crescita e la migrazione delle cellule del melanoma umano
Altri tipi di cancro	CML, CEL, e agripirimidina e altri ligandi per RAGE	AGE, attraverso il legame con i RAGE, provocano infiammazione, che porta ad una riprogrammazione metabolica e una instabilità genomica; possono provocare una trasformazione oncogenica, l'allungamento dei telomeri e aumentare l'angiogenesi
Malattia di Alzheimer e aterosclerosi	AGE derivati dal glucosio AGE derivati da MGO TAGE e altri AGE	Possono influenzare i neuroni dell'ippocampo, e aumentare la percentuale di neuroni apoptotici, scatenare infiammazione e la proliferazione cellulare, contribuendo allo sviluppo di una disfunzione vascolare; la glicazione dell'apolipoproteina B100 aumenta l'aterogenicità delle lipoproteine a bassa densità; AGE inducono attivazione piastrinica, trombosi e ipercoagulazione.
Disturbi cardiovascolari e ipertensione	AGE derivati da glicolaldeide AGE derivati da MGO	Causano fibrosi, ipertrofia, stress ossidativo e aggravano la risposta infiammatoria. Inducono danno vascolare all'endotelio attraverso un aumento dello stress ossidativo; aumentano la rigidità di arterie attraverso la formazione di legami crociati con le proteine della matrice extracellulare.

Osteoporosi, osteoartrite e saecopenia	AGE non definiti	AGE si accumulano nelle ossa, nelle giunzioni e nei muscoli scheletrici; possono indurre un' infiammazione cronica stimolando gli osteoblasti, gli osteoclasti e i miociti, causando una degenerazione delle ossa, delle cartilagini e dei muscoli.
--	------------------	---

1.2 Formazione degli AGE

I prodotti finali della glicazione (AGE) sono proteine o lipidi che subiscono una reazione di glicazione non enzimatica da parte del glucosio, o altri zuccheri riducenti e loro derivati, come gliceraldeide, glicolaldeide, metilgliossale e acetaldeide.

Esistono tre differenti modalità di formazione degli AGE (**Figura 1**):

- 1) La reazione di Maillard
- 2) La via dei polioli
- 3) La via della perossidazione lipidica

1.2.1 La reazione di Maillard

La reazione di Maillard è una complessa reazione non enzimatica multistadio che coinvolge inizialmente un processo di glicazione/condensazione di gruppi carbonilici di zuccheri riducenti, come glucosio e fruttosio, e il gruppo amminico o guanidinico di proteine, lipidi e acidi nucleici. Schematicamente si può considerare tale reazione, come un processo che avviene in 3 fasi: iniziale, intermedia e terminale.

Nella fase iniziale il glucosio (o altri zuccheri riducenti) si lega ad un gruppo amminico libero di proteine, acidi nucleici, componenti lipidiche, per formare un composto aldiminico labile, una base di Schiff. L'aldimina, attraverso un riarrangiamento intramolecolare, si trasforma in un composto chetoamminico stabile, il prodotto di Amadori. Si tratta di una reazione presente in tutti i tessuti e fluidi che avviene quando una significativa concentrazione di glucosio, fruttosio o composti dicarbonilici (a-DC) più reattivi, come il metilgliossale (MGO), gliossale (GO) e il 3-deossiglucosone (3DG), reagisce con le proteine. Il prodotto di Amadori raggiunge l'equilibrio dopo 15-20 giorni e tende ad accumularsi sia sulle proteine a breve emivita che su quelle ad emivita più lunga. L'accumulo del prodotto di Amadori sulle proteine è in grado di alterare le proprietà fisico-chimiche delle stesse alterandone la funzionalità. Un esempio nel nostro corpo di un prodotto di Amadori,

derivante da questo processo, è l'emoglobina glicata (HbA1c), considerata come un marcatore accurato dell'esposizione a lungo termine a un alto livello di glucosio in circolazione.

Nella fase intermedia, il prodotto di Amadori va incontro a reazioni di ossidazione e disidratazione e viene degradato in una serie di composti dicarbonilici molto reattivi che agiscono come propagatori della reazione. Tali composti, quali i deossiglucosoni, il gliosale ed il metilgliosale reagiscono nuovamente con i gruppi amminici liberi delle proteine e, nella fase finale, una serie di reazioni di ossidazione, disidratazione, ciclizzazione, dà luogo alla formazione degli AGE, composti termodinamicamente stabili, spesso giallo-bruni e fluorescenti, che si accumulano soprattutto sulle proteine a lunga emivita. Il glucosio è stato sino ad ora considerato il più importante iniziatore *in vivo* di tale reazione, sia perché rappresenta il principale zucchero dell'organismo, sia perché la sua concentrazione aumenta in condizioni di iperglicemia. Tuttavia, ci sono comunque studi che evidenziano come anche il galattosio, il fruttosio, il ribosio, altri pentosi ed alcuni intermedi della glicolisi possono iniziare la reazione di Maillard.

1.2.2 La via dei polioli

Oltre alla reazione di Maillard, la via dei polioli rappresenta un ulteriore meccanismo che porta alla formazione degli AGE. Un aumento rilevante della concentrazione di glucosio come conseguenza di una iperglicemia risulta essere tossico e, grazie ad una serie di segnali cellulari, viene indirizzato verso la via del metabolismo dei polioli. Il primo step di tale via è rappresentato dalla conversione del glucosio in sorbitolo mediata dall'enzima aldoso reductasi. Il sorbitolo viene poi convertito in fruttosio dall'enzima sorbitolo deidrogenasi. L'iperattivazione di tale meccanismo provoca un esaurimento delle scorte di NAD, cofattore essenziale della sorbitolo deidrogenasi, che inibisce l'attività dell'enzima glicolitico gliceraldeide trifosfato deidrogenasi con conseguente accumulo di metaboliti, compresi fruttosio e triosio fosfati. L'accumulo di tali metaboliti successivamente dà origine a molecole altamente reattive tra cui fruttosio-3-fosfato e derivati dicarbonilici, i quali rappresentano potenti precursori nella formazione degli AGE.

1.2.3 La via della perossidazione lipidica

Anche i prodotti della perossidazione lipidica formano composti carbonilici reattivi come la malondialdeide e il metilgliosale, derivati dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi.

Si può dunque desumere che i gruppi carbonilici reattivi sono costantemente prodotti attraverso il normale metabolismo e quando la sintesi supera la loro detossificazione, si verifica un accumulo di AGE.

Oltre ai residui amminici arginina, lisina e, in misura minore, cisteina, anche specifici nucleotidi, come guanosina e deossiguanosina, sono particolarmente vulnerabili alla modifica dicarbonilica formando i cosiddetti DNA-AGE, tra cui N²(1-carbossietil)-2'-deossiguanosina (CEdG). I DNA-AGE sono stati descritti come un potenziale biomarcatore di iperglicemia cronica nei topi. I livelli di

CEdG sono risultati significativamente elevati nelle urine raccolte da topi iperglicemici Leprdb/db rispetto ai topi di controllo normoglicemici. Poiché molti degli stessi composti vengono prodotti in cibi cotti e arrostiti, la somministrazione di AGE dietetici nei topi suggerisce che gli AGE consumati attraverso cibi cotti a secco potrebbero potenzialmente aumentare il rischio di malattie legate all'età attraverso l'attivazione del recettore degli AGE (RAGE).

Tuttavia, la biochimica della formazione degli AGE e i suoi effetti a valle sono complessi e non sono ancora stati completamente compresi.

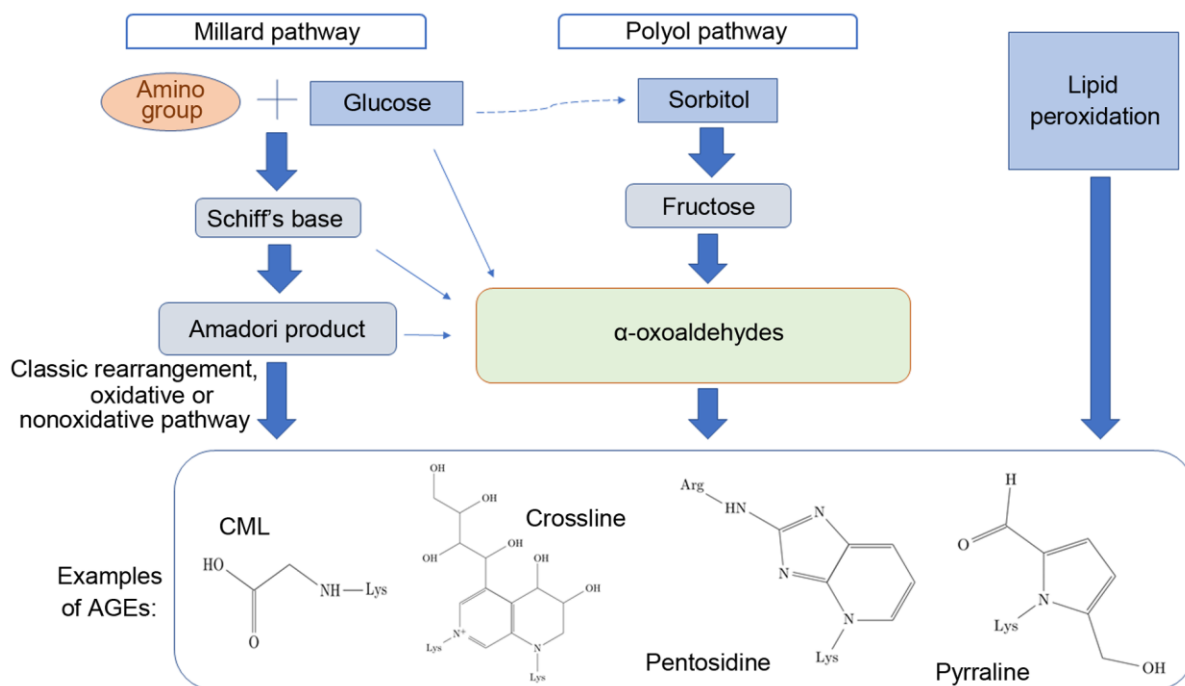


Figura 1: Le vie di formazione degli AGE, tra cui la via di Maillard, la via dei polioli e la via della perossidazione lipidica. Sono mostrate anche le formule strutturali dei tipi più comuni di AGE. CML: carbossimetil-lisina. (Kuzan et al, 2021)

1.3 Nomenclatura degli AGE

Gli zuccheri e i composti dicarbonilici coinvolti nella reazione di Maillard influenzano profondamente i tipi di AGE prodotti (Figura 2). A causa della loro eterogeneità strutturale, tutt'oggi risulta ancora problematico determinare con una certa sensibilità e specificità gli AGE nei tessuti. La loro identificazione sino a qualche anno fa veniva eseguita con metodiche quali la cromatografia accoppiata alla spettroscopia di massa e la fluorimetria. Più recentemente sono stati sviluppati metodi ELISA con anticorpi poli e monoclonali che, pur essendo caratterizzati da una più elevata specificità, comunque valutano gli AGE in toto. Poiché le strutture degli AGE *in vivo* variano

notevolmente e le reazioni richieste per la loro produzione sono complesse, le strutture di solo pochi AGE fino ad oggi sono state chiarite.

Per poter comunemente categorizzare e classificare tali composti e con il fine di ricercare un sistema di nomenclatura chiaro e comprensibile, sono stati proposti due sistemi, che si basano o sulla struttura chimica degli AGE o sulle proteine che vengono modificate. Nel primo sistema di classificazione, il primo gruppo di AGE identificati include N-carbossimetillisina (CML), la pentosidina, la crossline, la pirralina e l'idromidazolone. Il secondo gruppo comprende Glu-AGE: AGE derivati dal glucosio; Fru-AGE: AGE derivati dal fruttosio; 3-DG-AGE: AGE derivati dal 3-deossiglucosone; Glycer-AGEs: AGE derivati dalla gliceraldeide; TAGE: AGE tossici; MGO-AGEs: AGE derivati dal metilgliossale; Glycol-AGEs: AGE derivati dalla glicolaldeide; GO-AGEs: AGE derivati dal gliossale; DOLD: dimero di 3-deossiglucosone-lisina; 3-DH-H1: 3-deossiglucosone derivato dall'idromidazolone; GLAP: gliceraldeide derivato dalla pirimidina; CEL: N ϵ -(carbossietil)-lisina; GA-piridina: piridina derivata dalla gliceraldeide; ORO: dimero gliossale-lisina; G-H1: idromidazolone 1 derivato dal gliossale.

Il secondo sistema invece prende in considerazione specifiche modificazioni di proteine derivanti dall'interazione con gli AGE; per esempio, l'emoglobina (HbA1c, considerata come un prodotto di Amadori), l'albumina, la cristallina dell'occhio, il collagene tipo IV e l'apolipoproteina B100.

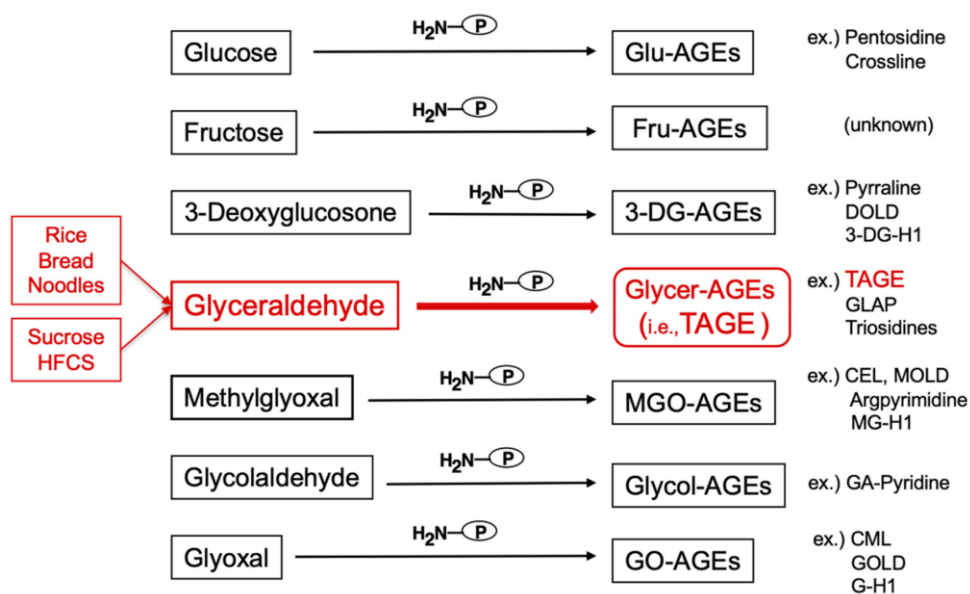


Figura 2. Varie vie per la formazione in vivo dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGE).

Gli zuccheri riducenti, tra cui il glucosio, il fruttosio e la gliceraldeide, reagiscono in modo non enzimatico con i gruppi aminol/guanidino delle proteine, con conseguente formazione di basi di Schiff reversibili e prodotti di Amadori. Ulteriori reazioni complesse che coinvolgono questi primi prodotti di glicazione, come il riarrangiamento, la disidratazione e le reazioni di condensazione, portano a derivati fluorescenti eterogenei irreversibilmente reticolati, chiamati AGE.

Glu-AGE: AGE derivati dal glucosio; Fru-AGE: AGE derivati dal fruttosio; 3-DG-AGE: AGE derivati dal 3-deossiglucosone; Glycer- AGEs: AGE derivati dalla gliceraldeide; TAGE: AGE tossici; MGO-AGEs: AGE derivati dal metilgliosale; Glycol-AGEs: AGE derivati dalla glicolaldeide; GO-AGEs: glyoxal-derived AGEs; DOLD: 3-deoxyglucosone-lysine dimer; 3-DG-H1: 3-deoxyglucosone-derived hydroimidazolone; GLAP: glyceraldehyde-derived pyridinium; CEL: N ϵ -(carbossietil)lisina; MOLD: dimero metilgliosale-lisina; MG-H1: idroimidazolone 1 derivato dal metilgliosale; GA-piridina: piridina derivata dalla gliceraldeide; CML: N ϵ -(carbossimetil)lisina; ORO: dimero gliosale-lisina; G-H1; idroimidazolone 1 derivato dal gliosale; HFCS: sciroppo di mais ad alto contenuto di fruttosio; P-NH2: residuo amminico libero di una proteina.

(Takeuchi et al,2021)

Capitolo 2. Recettori per gli AGE

2.1 RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products) e i suoi ligandi

Sono stati identificati diversi tipi di proteine (recettori) leganti gli AGE e le reazioni biologiche mediate da tali recettori sono state ampiamente studiate. Un recettore pro-infiammatorio chiave è il recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE), una proteina multi-ligando scoperta e isolata dal polmone bovino. Il recettore RAGE è una molecola di superficie appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline. Grazie alla sua capacità di riconoscere strutture tridimensionali piuttosto che specifiche sequenze di aminoacidi, RAGE può interagire con una vasta gamma di ligandi endogeni come la S100/calgranuline, la proteina high mobility group box 1 (HMGB1), peptidi amiloidi- β ($A\beta$) e acidi nucleici (DNA, RNA); ligandi esogeni come i lipopolisaccaridi batterici (LPS) e gli AGE alimentari; e ligandi legati all'adesione cellulare, vale a dire collagene I/IV e antigene 1 dei macrofagi (Mac)-1. Questi ligandi hanno in comune caratteristiche strutturali simili, in particolare foglietti multipli β -sheets, grazie ai quali vengono riconosciuti da RAGE. Studi precedenti hanno mostrato come, dopo il legame con il ligando, RAGE dà inizio ad una sostenuta attivazione cellulare, mediata da un meccanismo di trasduzione del segnale recettore-dipendente, che può infine sfociare in un'attivazione cellulare cronica e danno tissutale. Il gene RAGE nell'uomo si estende per 3080 coppie di basi (bp) ed è localizzato sul cromosoma 6, nella regione dell 'MHC-III. È noto che il gene RAGE viene trascritto a bassi livelli in numerosi di tipi cellulari, quali linfociti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, fagociti mononucleati, neuroni, miociti cardiaci, epatociti, cellule dei gangli bipolari della retina. Tuttavia, il livello aumenta in certe condizioni di infiammazione cronica, tra cui diabete, malattie cardiovascolari (CVD), obesità, artrite reumatoide, osteoartrite, aterosclerosi, malattia renale cronica, sepsi, vasculite, cancro, Alzheimer (AD), distrofie muscolari, durante l'invecchiamento o in presenza di quantità elevate di ligandi RAGE, determinando un'aumentata espressione del recettore stesso. Si viene così a delineare un "feedback loop" positivo, in cui l'interazione ligando-recettore incrementa l'espressione del recettore stesso a livello di membrana, amplificando in tal modo l'attivazione cellulare indotta da RAGE e contribuendo allo sviluppo, alla progressione e alle complicazioni degli stati patologici.

2.2 Struttura di RAGE

La struttura completa di RAGE è composta da tre domini. Un dominio N-terminale extracellulare, costituito da 332 aa, che include tre regioni di tipo immunoglobulinico: una regione variabile V seguita da due regioni costanti C chiamate C e C'. Sebbene le regioni C e C' non leghino direttamente il ligando, esse hanno un ruolo fondamentale nello stabilizzare la regione V, al fine di mediare la sua

interazione con il ligando. Vi sono poi un dominio idrofobico transmembrana di 21 aa ed una coda citosolica di 43 aa. La coda citosolica manca di motivi segnale (ad es. siti di fosforilazione, domini chinasi), ma è fondamentale per l'attivazione cellulare RAGE-dipendente. Tramite la sua porzione extracellulare, RAGE media il legame dei ligandi alla membrana cellulare, mentre, grazie alla coda citosolica, è in grado di innescare un meccanismo di attivazione cellulare specifico. Sono state identificate venti varianti di splicing del RAGE nell'uomo e diciassette nei topi; il tipo di tessuto determina quale forma di splicing è espressa. In particolare, vi sono due isoforme circolanti di RAGE, che presentano solo la porzione extracellulare tramite la quale riconoscono i ligandi. Queste due isoforme derivano o da splicing alternativo dell'mRNA (esRAGE), oppure dalla scissione proteolitica dei domini C-terminali (sRAGE). Esperimenti condotti sull'uomo e su modelli animali hanno dimostrato che nel plasma sono già presenti quantità modeste di queste isoforme, le quali sono in grado di antagonizzare l'effetto del recettore di membrana. Infatti, è stato dimostrato che in presenza di un eccesso di sRAGE, isoforma solubile, i ligandi si associano con una maggior preferenza, inibendo l'attivazione cellulare di RAGE. Il recettore sRAGE è considerato così un recettore esca, che blocca l'interazione RAGE/ligando dimostrando di avere un ruolo protettivo contro l'accumulo di ligandi RAGE. Studi approfonditi sui topi hanno dimostrato che sRAGE, se somministrato per via sistemica o direttamente agli organi bersaglio, è in grado di contrastare la patogenesi mediata dal RAGE.

2.3 Meccanismo d'azione

Il ruolo di RAGE e dei suoi ligandi nel sostenere la risposta infiammatoria è stato ampiamente documentato ed il danno tessutale mediato da questi recettori, è stato implicato in patologie infiammatorie croniche a carico di diversi organi.

RAGE inizia una cascata di segnalazione con l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare kB (NF-kB), un fattore di trascrizione con un ruolo cruciale in una varietà di processi immunitari ed infiammatori (**Figura 3**). In particolare, RAGE media una moltitudine di vie di segnalazione che includono principalmente: la fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI-3K), Ki-Ras e le MAPK, Erk1 e Erk2. Queste vie promuovono la traslocazione di NF-kB dal citoplasma al nucleo causando infiammazione e danno ai tessuti ad opera di mediatori pro-infiammatori come la proteina chemioattrattiva dei monociti 1 (MCP-1) e la molecola di adesione cellulare vascolare-1 (VCAM-1), con una conseguente aumentata adesività dei monociti all'endotelio. Pertanto, attraverso queste vie, l'attività di RAGE è associata a complicazioni microvascolari diabetiche, tra cui nefropatie, retinopatie e neuropatie. Oltre ad attivare le vie infiammatorie, l'attivazione di RAGE è anche implicata nella promozione dello stress ossidativo. Un ruolo da protagonista è assunto dalla nicotinamide adenina dinucleotide fosfato ridotto, NAD(P)H ossidasi, che aumenta la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS a loro volta promuovono la formazione di AGE. Inoltre, i ROS potenziano la risposta infiammatoria attivando NF-kB, che, una volta attivato, migra al nucleo e induce non solo l'espressione di mediatori infiammatori, ma anche l'up-regulation di RAGE, stabilendo così un ciclo di feedback positivo.

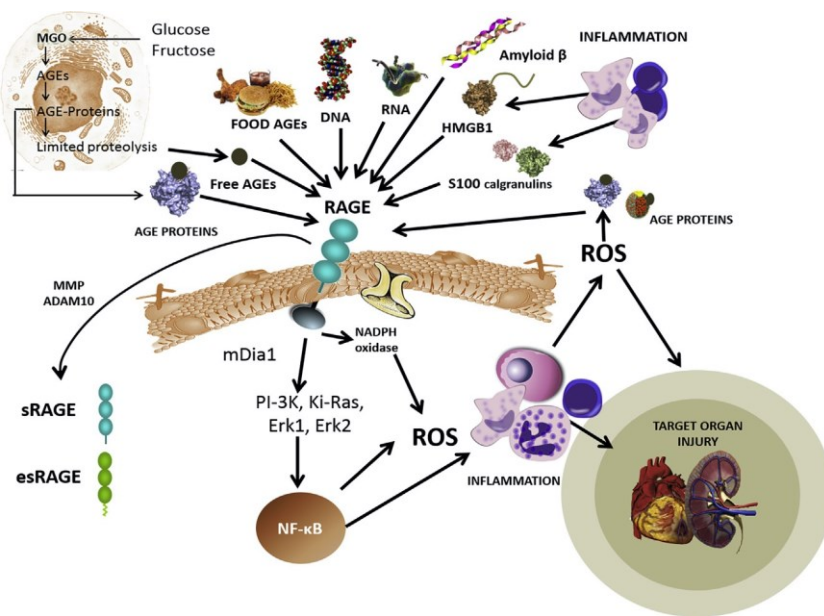


Figura 3. Il recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE) è un recettore chiave nell'innescare complicazioni infiammatorie nell'invecchiamento e nelle malattie croniche. (Chaudhuri et al, 2018)

2.4 Altri recettori

Gli AGE possono anche legarsi ad altri recettori della superficie cellulare oltre al RAGE. Questi recettori sono coinvolti in un altro aspetto del metabolismo degli AGE: la disintossicazione e la clearance, svolgendo così un ruolo importante nell'omeostasi degli AGE. Sono stati identificati i seguenti recettori: i recettori specifici per gli AGE (AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3) e alcuni membri della famiglia degli scavenger (SR), espressi a livello dei monociti/macrofagi e dei linfociti T (classe A tipo I (SR-A1) e tipo II (SR-A2), classe B tipo I (SR-B1) e CD-36).

AGE-R1 è una proteina integrale di membrana di tipo I, presente in quasi tutte le cellule e tessuti. È coinvolta nell'assorbimento, nella degradazione e nella rimozione degli AGE. Dopo l'interazione con i ligandi, AGE-R1 stimola l'endocitosi del recettore inibendo così l'attivazione di NF-κB e contrastando lo stress ossidativo. Tuttavia, questo meccanismo protettivo fallisce con la presenza di elevate concentrazioni di AGE, i quali portano ad una sottoregolazione di AGE-R1. AGE-R2 e AGE-R3 che hanno mostrato attività, dirette o indirette, di legame agli AGE, ma il loro ruolo biologico nella segnalazione cellulare mediata dagli AGE non è ancora stato compreso. I recettori scavenger di classe A (SR-A) sono delle glicoproteine transmembrana trimeriche, il cui ruolo è di legare le sostanze di degradazione o di accumulo metabolico, tra cui LDL e i prodotti terminali glicosilati, coinvolgendo così gli AGE nello sviluppo precoce dell'aterosclerosi.

Capitolo 3. La rete di detossificazione degli AGE

3.1 Introduzione

Numerose evidenze dimostrano che l'accumulo di proteine danneggiate è un segno distintivo specifico dell'invecchiamento e di molte malattie legate all'età. Tali proteine compromettono l'omeostasi cellulare formando aggregati, non funzionali e tossici, che causano l'inattivazione non solo della proteina danneggiata ma anche la funzione delle altre proteine essenziali. In questo contesto, i prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) rappresentano uno dei meccanismi principali per la formazione di proteine alterate. I composti dicarbonilici più reattivi che si generano dalle diverse vie metaboliche citate precedentemente, quali ad esempio il metilgliossale (MG) ed il gliossale, sono normalmente mantenuti a bassi livelli nell'organismo in condizioni omeostatiche, ma i processi legati all'invecchiamento, un'elevata concentrazione di glucosio, il consumo di una dieta ricca di zuccheri o la presenza di condizioni diabetiche, tendono ad aumentare questi reattivi glicati a livelli patologici, alimentando la formazione di AGE tossici ed, infine, causando una compromissione della funzionalità dei tessuti. In tale contesto, la necessità, da parte dell'organismo, di detossificare i composti dicarbonilici reattivi il più velocemente possibile, al fine di prevenire la glicazione delle proteine e del DNA, risulta essere di estrema importanza.

La tossicità dei precursori dicarbonilici degli AGE è sottolineata dall'esistenza di diversi enzimi coinvolti nella loro detossificazione. Il sistema della gliossalasi rappresenta il meccanismo principale per inibire la formazione degli AGE e una delle vie principali per detossificare gli intermedi della glicazione.

3.2 Gliossalasi: GLO1 e GLO2

Il sistema delle gliossalasi rappresenta la principale via di disintossicazione per i composti dicarbonilici reattivi nel citosol di tutte le cellule dei mammiferi. Comprende due enzimi: la gliossalasi 1 (GLO1) e la gliossalasi 2 (GLO2). I geni per le gliossalasi sono evolutivamente conservati ed ampiamente distribuiti in vari sistemi viventi, come l'uomo, le piante, il lievito, i batteri, i funghi e i protisti. Le attività combinate delle gliossalasi 1 e 2 (GLO1, GLO2) catalizzano la conversione di α -ossoaldeidi acicliche reattive nei corrispondenti α -idrossiacidi. Il sistema delle gliossalasi può essere sia glutatione dipendente (GSH), ad esempio GLO1, o indipendente dal GSH.

Nella fase iniziale, GLO1 converte il suo substrato, l'emioacetale, formato da una reazione spontanea tra l'aldeide del dicarbonile MG e del GSH, in S-D-lattoilglutazione. Successivamente, GLO2 idrolizza il S-D-lattoilglutazione in D-lattato e riforma il GSH (*Figura 4*).

L'attività di GLO1 è direttamente proporzionale alla concentrazione di GSH e diminuisce quando il GSH viene rimosso, come in caso di stress ossidativo, quando il GSH viene convertito in GSSG,

glutazione ossidato. Tuttavia, altri substrati, tra cui gliossalide, fenilgliossalide e idrossipiruvaleide, vengono metabolizzati attraverso questa via.

Pertanto, poiché GLO1, l'enzima che limita la velocità nel sistema della gliossalasi, catalizza la fase primaria di disintossicazione, una sua alterazione risulta essere coinvolta in molti processi patologici dell'invecchiamento, come nel diabete, nelle malattie neurodegenerative, nel cancro e nelle malattie dell'occhio. Negli ultimi anni, una serie di studi di coorte condotti sull'uomo ha fornito la prova che eventuali polimorfismi associati ai geni che detossificano i composti dicarbonilici sono legati a tali malattie. In particolare, i polimorfismi associati al gene GLO1 della gliossalasi sono stati associati allo sviluppo di nefropatia e retinopatia nei pazienti diabetici di tipo 2. Inoltre, la genotipizzazione dei lisati di sangue intero ottenuti da pazienti diabetici di tipo 1 e 2 ha rivelato una marcata diminuzione dell'attività della gliossalasi I. Tuttavia, la regolazione dell'espressione e dell'attività di GLO1 è complessa e non ancora ben compresa.

L'attività di GLO1 può essere regolata attraverso molteplici meccanismi, compresa la regolazione trascrizionale e le modifiche post-traduzionali (*Figura 5*). Il promotore di Glo1 contiene vari elementi di regolazione: un elemento di risposta al metallo (MRE), un elemento di risposta all'insulina (IRE), una isoforma del fattore 2 del gene precoce (E2F), una proteina legante l'attivatore 2 α (AP-2 α) e un elemento di risposta antiossidante (ARE). La funzione di IRE e MRE è stata confermata in saggi reporter in cui l'insulina e il trattamento con cloruro di zinco hanno prodotto un aumento della risposta trascrizionale. Attività funzionali simili sono state osservate per E2F e AP-2 α . L'ARE, situato nell'esone 1 di GLO1, serve per unire GLO1 al sistema trascrizionale stress-reattivo del fattore nucleare eritroide 2-related factor 2 (NRF2). Diversi geni legati al metabolismo della MG e alla protezione dallo stress ossidativo sono sotto il controllo della via NRF2-ARE. In condizioni normali, il fattore nucleare eritroide 2-related factor 2 (NRF2) è complessato con KEAP1, una proteina adattatore substrato per il complesso di ubiquitina lipasi E2 dipendente da cullin-3, che dirige NRF2 verso la degradazione da parte del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). In condizioni di stress ossidativo, il complesso NRF2-KEAP1 viene destabilizzato causando il distacco di NRF2 che viene traslocato nel nucleo dove innesca una sovraregolazione di diversi geni antiossidanti. Il legame di NRF2 al GLO1-ARE aumenta l'espressione di GLO1. Diversi studi dimostrano che NRF2 aumenta l'attività di GLO1 e allevia lo stress intracellulare causato da MG, portando ad una diminuzione degli addotti proteici MG e MG-derivati sia nelle cellule che nei tessuti. Nelle cellule endoteliali bovine, la sovraespressione di GLO1 riduce l'accumulo intracellulare di AGE in condizioni iperglicemiche. Gli episodi iperglicemici e quindi il diabete e le sue complicanze, come la nefro-, retino- e neuropatia, sono stati frequentemente collegati ad un aumento dei livelli di MG a causa di una minore espressione di GLO1 negli esseri umani. Anche differenti modificazioni post-traduzionali nel citosol possono avere un impatto sulla stabilità di GLO1. GLO1 è acetilato dalla sirtuina-2 citosolica e la sua espressione può essere diminuita dall'attivazione dei recettori degli AGE, i RAGE; tuttavia, questi meccanismi non sono chiaramente compresi. Uno studio recente ha dimostrato che la proteina GLO1 può essere modificata dalla fosforilazione della treonina 107 (T107) e dalla nitrosilazione della cisteina 139. In questo studio, la fosforilazione di T107 da parte di una chinasi specifica dipendente dalla calmodulina nella proteina GLO1 è stata riportata come un

preciso meccanismo che regola il sistema della gliossalasi. In particolare, la fosforilazione di GLO1 a T107 influenza l'efficienza cinetica della detossificazione di MG e la degradazione proteasomica. Così, il suo stato alterato è associato allo sviluppo di malattie legate all'età.

3.3 Altri enzimi

Nonostante il sistema delle gliossalasi rappresenti il meccanismo primario per la detossificazione dei composti dicarbonilici reattivi, vi sono altre vie coinvolte nel metabolismo di tali composti. Queste vie includono enzimi come DJ-1 deglicasi, la famiglia della Aldo-keto reduttasi (AKR) e dell'aldeide deidrogenasi (ALDH). Tuttavia, rimane ancora poco chiara la rilevanza fisiologica di questi sistemi e se tali enzimi svolgano effettivamente un ruolo cruciale nella detossificazione degli AGE nei tessuti. Recenti evidenze mostrerebbero che tali componenti operano in assenza di attività di gliossalasi come un meccanismo compensativo.

DJ-1 deglicasi, nota anche come proteina 7 della malattia di Parkinson (PARK7), ha dimostrato di avere numerosi ruoli e viene indicata come una proteina multifunzionale in risposta allo stress. È stato dimostrato che DJ-1 svolge due attività diverse: (1) attività gliossalasica *in vitro*, convertendo MG in lattato e prevenendo il danno tissutale indotto da MG in *Caenorhabditis elegans* e (2) attività deglicasica *in vitro*, riducendo i sottoprodotti di MG in fase iniziale. Recentemente, altri studi hanno dimostrato che DJ-1 svolge un ruolo rilevante come deglicasi del DNA, in grado di riparare i nucleotidi MG-modificati e le proteine. La capacità disintossicante di DJ-1 in assenza di glutatione (GSH) rende questa una via alternativa al sistema delle gliossalasi, che richiede invece la presenza di GSH.

AKR sono una superfamiglia di proteine in grado di ridurre aldeidi e chetoni in alcoli primari e secondari. AKR metabolizza MG in idrossiacetone o lattoaldeide. Il ruolo di AKR nella detossificazione è stato dimostrato per la prima volta in uno studio *in vivo* sui topi. Recenti studi hanno mostrato che l'espressione transgenica dell'Aldo-cheto reduttasi, sia dell'uomo che dei topi, nei fibroblasti dei roditori, protegge dal danno indotto da MG, suggerendo che AKR possa partecipare alla disintossicazione di MG riducendo così i livelli di AGE. Un'elevata attività di AKR1B3 è stata inoltre osservata nelle cellule di Schwann dei roditori con un aumento dell'espressione durante l'esposizione a MG. Questo suggerisce che AKR potrebbe giocare un ruolo importante come meccanismo compensativo indotto dalla mancanza del sistema della gliossalasi o da un eccessivo stress glicativo. Pertanto, è stato notato che la mancanza di AKR1B3 ha portato a livelli più elevati di MG ed AGE nei cuori dei topi diabetici.

ALDH sono un altro gruppo di enzimi che metabolizzano composti α -dicarbonili, ossidando, in particolare, MG a piruvato. Gli enzimi e i sistemi di detossificazione descritti fino ad ora sono responsabili della neutralizzazione dei precursori degli AGE, prevenendo o ritardando la loro formazione. Tuttavia, gli AGE, essendo irreversibili, una volta formati, possono essere eliminati solo per via proteolitica. Sono stati suggeriti due principali meccanismi per contribuire alla degradazione degli AGE: il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e il sistema proteolitico

lisosomiale autofagico (ALPS). L'UPS opera principalmente sulle proteine solubili mal ripiegate. Nell'UPS, i substrati sono riconosciuti e marcati con l'ubiquitina e indirizzati al proteasoma per la degradazione. L'ALPS, invece, consiste nell'indirizzare i substrati al compartimento lisosomiale, nel quale gli AGE vengono degradati da specifiche proteasi lisosomiali. Entrambe le vie proteolitiche sono funzionalmente cooperative e numerose evidenze supportano l'esistenza di un'interazione crociata tra le due vie. Questa interazione garantisce un meccanismo di supporto e, in caso di carenza di una delle vie, l'altra via proteolitica tende a compensare per mantenere un proteoma adeguato e funzionale. Tuttavia, l'efficacia di questi due meccanismi diminuisce con l'età, con conseguente insufficiente capacità di riconoscere e rimuovere le proteine danneggiate e, dunque, l'accumulo intracellulare di aggregati proteici e organelli disfunzionali.

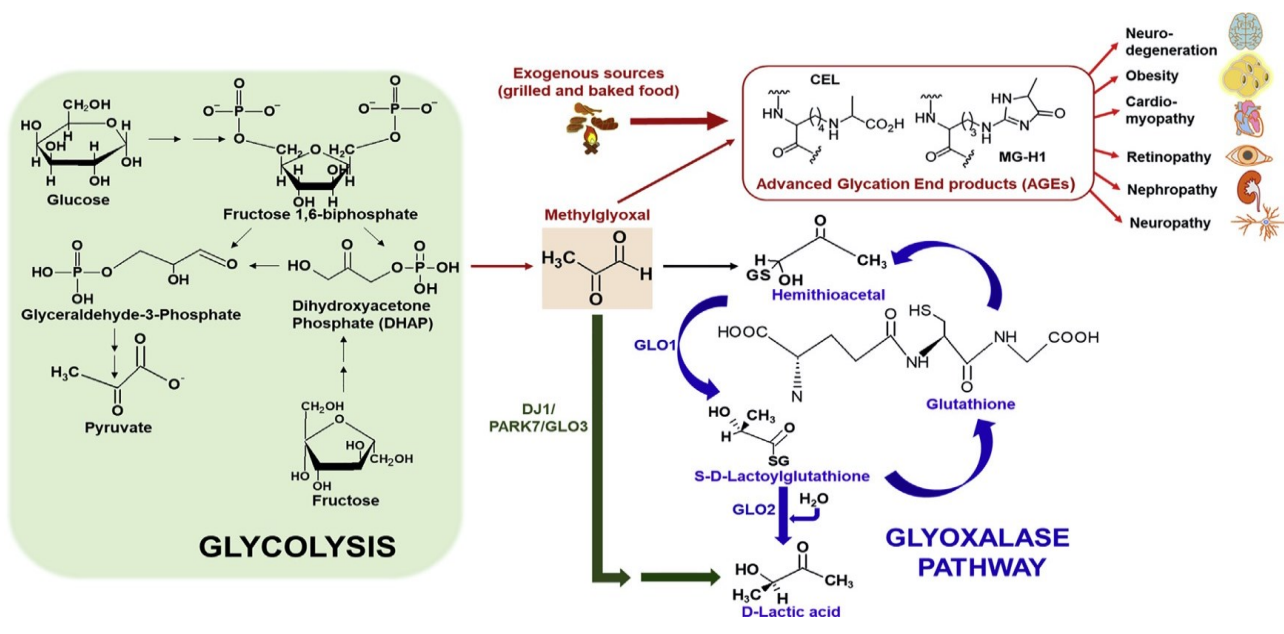


Figura 4: Formazione degli AGE e il sistema delle gliossalasi. La figura illustra la formazione e la disintossicazione di MGO, un sottoprodotto glicolitico che si forma dal glucosio o dal fruttosio. I sottoprodotti glicolitici di derivazione endogena (ad esempio, Metilgliosale o MGO) o i loro derivati AGE (ad esempio, Ne-carbossietil-lisina o CEL e idroimidazolone derivato dal Metilgliosale o MG-H1) portano a una varietà di malattie che colpiscono diversi organi (come cervello, cuore, occhi, reni, polmoni) che si complicano con l'età. Oltre alle fonti endogene come il diidrossiacetone fosfato (DHAP) derivato dal glucosio o dal fruttosio (formato durante la glicolisi), le fonti alimentari esogene come il cibo cotto a secco producono prevalentemente AGE (grande freccia rossa). La disintossicazione di MGO avviene tramite la via della glutatione (GSH) dipendente dalla gliossalasi, mediata da due enzimi mitocondriali, la gliossalasi I (GLO1) e la gliossalasi II (GLO2) che alla fine converte MGO in acido lattico. In alternativa, MGO può anche essere convertito in acido lattico in un unico passaggio mediato da un enzima citosolico indipendente da GSH, la gliossalasi III (GLO3). (Chaudhuri et al, 2018)

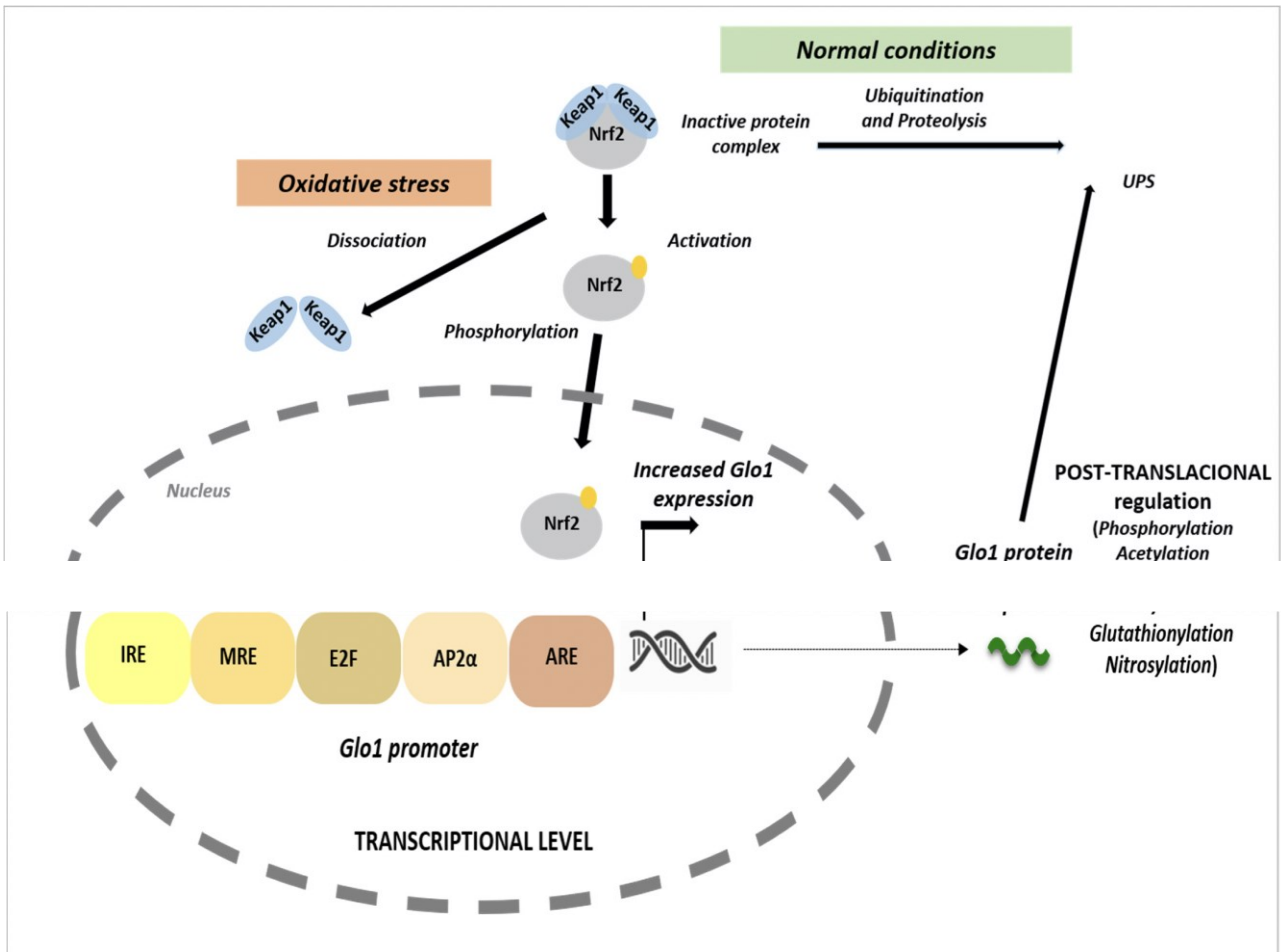


Figura 5: Meccanismi di regolazione della gliossalasi 1 (GLO1). (Chaudhuri et al,2018)

Capitolo 4. Effetti degli AGEs nello sviluppo patologico di diverse malattie: la citotossicità

4.1 I TAGE

Gli AGE derivati dalla Gliceraldeide (GA), un intermedio metabolico del glucosio e del fruttosio, e dalla carbossimetil-lisina (CML), mostrano una forte citotossicità, sia intracellulare che extracellulare, e per questo motivo vengono definiti AGE tossici (TAGE). Anche il metilgliosale (MGO), nonostante non sia classificato come un AGE tossico, ha mostrato di avere una certa citotossicità. Esso è un composto che si forma principalmente da meccanismi non ossidativi nella glicolisi anaerobica e dalla decomposizione ossidativa degli acidi grassi polinsaturi. In particolare, si forma dalla frammentazione degli intermedi glicolitici gliceraldeide 3-fosfato (GA3P) e diidrossiacetone fosfato (DHAP) (**Figura 4**). Alcuni autori hanno mostrato gli effetti citotossici di MGO sulle cellule epiteliali del pigmento retinico umano. Si è scoperto che la citotossicità indotta da MGO ha portato ad un aumento dei livelli di AGE, come CML, così come l'espressione dei recettori RAGEs e del glutathione. Inoltre, la presenza di MGO-AGE ha inibito la traslocazione di Nrf2, proteina che regola la trascrizione di enzimi antiossidanti, dal citosol al nucleo, con conseguente diminuzione dell'espressione di enzimi deputati alla detossificazione come l'eme ossigenasi-1.

Molte evidenze suggeriscono che i TAGEs sono implicati nella patogenesi di una moltitudine di malattie, quali l'Alzheimer, la malattia del fegato grasso non alcolico, la steatoepatite non alcolica, le malattie cardiovascolari, il diabete e le sue complicanze micro- e macro- vascolari. La loro generazione e il loro accumulo intracellulare inducono una serie di danni alle cellule neuronali, epatiche, danni alle cellule epiteliali duttali del pancreas, danni alle cellule del cuore con arresto della pulsazione dei cardiomiociti e morte cellulare dei mioblasti. Sono stati effettuati molti studi per poter analizzare e studiare gli effetti citotossici degli AGEs sulle cellule ed in tutti gli studi riportati sono stati dimostrati cambiamenti nei tassi di sopravvivenza delle cellule in presenza della maggior parte dei tipi di AGE. La tossicità di CML è stata studiata nei topi. La LD50 stimata ("dose letale 50") del CML era >5mg/kg. La somministrazione di 2 o 5 g/kg di CML non ha indotto la mortalità. Tuttavia, sono stati osservati alcuni cambiamenti biochimici e istopatologici: i marcatori della funzione epatica e renale erano elevati, l'attività degli enzimi antiossidanti (SOD e GSH-Px) era ridotta, i livelli di un marcatore coinvolto nella perossidazione lipidica (MDA) erano aumentati e cambiamenti istologici sono stati osservati nei polmoni, nel fegato, nei reni e nella milza.

Inoltre, sono stati studiati gli effetti dell'albumina glicata in numerose linee cellulari differenti. In particolare, è risultato determinante studiare l'impatto della sieralbumina bovina (BSA) glicata, incubata per 12 settimane con glucosio, su colture cellulari di origine amniotica ed embrionale (linee cellulari WISH e MRC-5) e su espianti di villi placentari. Gli effetti che sono stati osservati includevano: condensazione della cromatina, formazione di corpi apoptotici ed un'elevata espressione della citocheratina 18 e della caspasi 3. Da questo studio è emerso che il BSA-AGE

esercita un effetto tossico diretto sulla sopravvivenza delle cellule in modo dipendente dal tempo e dalla dose, e che alcune complicazioni della gravidanza possono sorgere a causa della presenza di AGE. L'effetto dell'albumina glicata è stato analizzato anche su altre linee cellulari di mammiferi: cellule mononucleate di sangue periferico, fibroblasti umani normali e cellule ovariche di criceto Cinese. L'albumina glicata è risultata essere significativamente più tossica dell'albumina di siero umana nativa (valori di concentrazione letale 50 (LC50) compresi rispettivamente tra 35.00-48.34 contro 5.47-9,10 µg/ml).

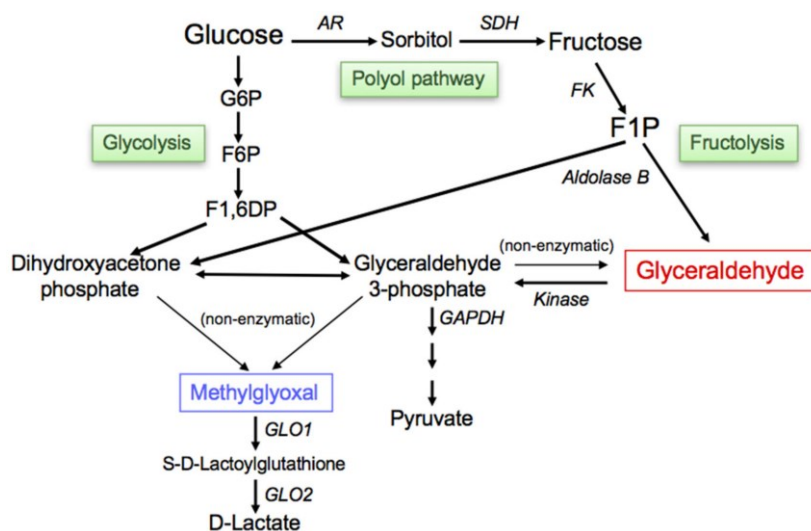


Figura 4. Vie per la produzione in vivo di gliceraldeide (GA)/metilgliossale (MGO). L'intermedio gliceraldeide 3-fosfato (GA3P) viene generalmente catabolizzato (glicolisi) dall'enzima GA3P deidrogenasi (GAPDH). Tuttavia, la diminuzione dell'attività enzimatica di GAPDH provoca l'accumulo intracellulare di GA3P. Di conseguenza, il GA3P viene metabolizzato attraverso una via alternativa, che aumenta la concentrazione di GA. La fruttosio chinasi fosforila il fruttosio in fruttosio 1-fosfato (F1P), che viene poi convertito in diidrossiacetone fosfato (DHAP) e GA dall'aldolasi B (frutticolisi). MGO è prodotto principalmente come sottoprodotto di reazioni non enzimatiche con GA3P o DHAP durante la glicolisi. La via metabolica di MGO più efficace è il sistema della gliossalasi, che converte MGO in D-lattato. G6P: glucosio 6-fosfato; F6P: fruttosio 6-fosfato; F1,6DP: fruttosio 1,6-difosfato; AR: aldoso reduttasi; SDH: sorbitolo deidrogenasi; FK: fruttosio chinasi; GLO1: gliossalasi 1; GLO2: gliossalasi 2. (Takeuchi et al, 2021)

4.2 Citotossicità dei TAGEs nel diabete

Il diabete mellito (DM) è una malattia metabolica caratterizzata da iperglicemia cronica dovuta ad una secrezione di insulina assente o inadeguata, combinata con un'azione difettosa sui tessuti bersaglio. Il diabete è attualmente considerato una delle più grandi epidemie del ventunesimo secolo. Tuttavia, è da sottolineare che la principale causa di morte non è il diabete di per sé, ma le

sue complicanze derivate che portano a disfunzioni sistemiche. Le complicanze del DM possono essere suddivise in due tipi principali, complicanze acute e croniche. Le complicanze acute comprendono l'ipoglicemia e le crisi iperglicemiche, che tendono a manifestarsi bruscamente mentre le complicanze croniche, di lenta e costante progressione nel corso degli anni, comprendono complicanze macrovascolari, che includono malattie cardiovascolari (CVD) e complicanze microvascolari, quali malattia renale cronica (CKD), neuropatia e retinopatia diabetica. Diversi studi suggeriscono un coinvolgimento dei prodotti finali della glicazione avanzata nei meccanismi fisiopatologici delle complicanze del DM. Questi AGEs derivano da reazioni non enzimatiche tra residui di carboidrati e proteine, lipidi o acidi nucleici, insieme a processi ossidativi. Il meccanismo di sviluppo delle complicanze del DM attraverso gli AGEs è ancora poco chiaro e vario, poiché queste possono generare cambiamenti strutturali in diverse macromolecole, alterandone la funzione e portando a vie di segnalazione intracellulari diversificate, che innescano risposte infiammatorie e danno endoteliale. Esistono diversi studi che confermano il ruolo prioritario svolto dal recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE) nel diabete e nelle sue complicazioni. L'interazione RAGE-ligando determina l'innescamento di un meccanismo infiammatorio cronico, che contribuisce alla patogenesi delle complicazioni diabetiche. Come risultato dell'interazione AGE-RAGE, il dominio citoplasmatico di RAGE porta a all'attivazione di diverse vie di segnalazione. In particolare, può attivare la proteina p21, innescando altri composti di segnalazione per stimolare delle chinasi, come la chinasi regolata dal segnale extracellulare (ERK), la c-Jun N-terminal kinase (JNK) e la proteina chinasi attivata dal mitogeno (MAP), insieme alla Janus kinase 1 e 2/Signal transducer e attivatori della trascrizione (JAK/STAT1). Le conseguenze di queste vie di trasduzione del segnale consistono poi nell'attivazione di fattori di trascrizione come il fattore nucleare kappa B (NF- κ B) e l'elemento di risposta sensibile all'interferone (ISRE), che portano alla sintesi di citochine proinfiammatorie come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), l'interleuchina IL-1 e IL-6, , nonché la molecola di adesione cellulare vascolare-1 (VCAM-1), che accelerano lo sviluppo di un danno tissutale.

4.2.1 Meccanismi molecolari degli AGE nelle complicazioni microvascolari del diabete (DM)

La presenza di retinopatia diabetica, neuropatia o (micro)albuminuria definisce l'esistenza di complicazioni microvascolari del DM; nonostante colpiscano organi diversi, esse si relazionano reciprocamente. Diversi studi hanno associato gli AGEs alla progressione di tali complicazioni, principalmente a causa dell'azione diretta di questi prodotti sui tessuti o tramite la stimolazione dell'asse AGE-RAGE e la conseguente risposta infiammatoria.

La malattia renale diabetica (DKD) è caratterizzata da ipertrofia renale, proteinuria, ridotta velocità di filtrazione glomerulare e fibrosi renale, che infine progredisce verso la malattia renale cronica (CKD). L'attivazione della via AGE-RAGE, derivante dall'accumulo di questi prodotti nel tessuto renale, porta ad una significativa attività infiammatoria. I pazienti con nefropatia diabetica presentano una duplice forma di danno: un aumento della formazione di AGE sierici e loro ridotta

clearance renale. Data la complessa cito-architettura del glomerulo renale, numerosi meccanismi di danno sono stati attribuiti agli AGEs. La glicazione del collagene di tipo IV e della laminina, per esempio, altera la funzione di queste proteine, provocando un aumento della permeabilità vascolare all'albumina. D'altra parte, i cambiamenti strutturali in altre proteine della matrice extracellulare indotti dagli AGEs pregiudicano la loro degradazione da parte delle metallo-proteasi, portando a un ispessimento della membrana basale. Un altro bersaglio della glicazione non enzimatica nel rene è il mesangio, un tessuto intercapillare del glomerulo renale, dove le alterazioni indotte dagli AGEs (aumento dell'apoptosi dei periciti e dell'espressione del VEGF) causano iperfiltrazione glomerulare, una disfunzione renale caratteristica delle fasi iniziali della malattia diabetica. Tuttavia si è dimostrato che pazienti con diabete di tipo 2 con micro-albuminuria presentavano livelli sierici di AGEs più elevati rispetto a pazienti senza microalbuminuria, anche con funzione renale normale. I RAGEs, infatti, sono espressi a livello dei podociti glomerulari e delle cellule tubulari. La loro interazione con gli AGEs promuove quindi modifiche patogenetiche in queste cellule (principalmente attraverso l'aumentata produzione di ROS), contribuendo alla glomerulosclerosi e fibrosi tubulo-interstiziale.

La neuropatia diabetica è definita dalla progressiva perdita di assoni all'interno dei nervi periferici, manifestata clinicamente da forte dolore e compromissione sensoriale. L'accumulo di AGEs nell'endonevrio, nelle cellule di Schwann, nella matrice extracellulare e nei capillari all'interno di queste strutture nervose, provoca la glicazione di proteine come la fibronectina e la laminina, inducendo modificazioni strutturali e funzionali che diminuiscono la capacità rigenerativa correlata all'atrofia assonale. I pazienti diabetici con nefropatia diabetica sono peraltro soggetti a un ulteriore meccanismo di accumulo circolante di AGEs, poiché in tali soggetti la clearance renale di questi composti risulta ridotta. Questo crea un graduale e inevitabile circolo vizioso, in cui il crescente pool di AGEs circolanti plasmatici altera la struttura e la funzione di proteine glomerulari, con un'ulteriore compromissione della funzionalità renale e quindi della loro clearance. Allo stesso modo, lo stress ossidativo e, di conseguenza, la citotossicità neuronale sono indotti attraverso il percorso AGE-RAGE, causati dai livelli aumentati di superossido e perossido di idrogeno e dalla diminuzione del glutatione intracellulare (GSH), un antiossidante essenziale. La perdita della sensibilità periferica e l'aumento della pressione meccanica nei piedi sono la causa principale del piede diabetico. Inoltre, lo stress ossidativo, la presenza di citochine proinfiammatorie e la glicazione di proteine come il collagene portano all'indurimento delle membrane basali delle cellule epiteliali, con conseguente fragilità del tessuto cutaneo e ridotta guarigione delle ferite.

D'altra parte, la retinopatia diabetica (DR) è caratterizzata da un processo vascolare degenerativo, che progredisce attraverso diversi stadi. In primo luogo, emerge uno squilibrio del flusso sanguigno, oltre ad una maggiore permeabilità vascolare e indurimento della membrana basale capillare, avanzando alla formazione di microaneurismi e stabilendo una lesione microvascolare. Ciò produce ischemia data dalla diminuzione del flusso sanguigno retinico e rappresenta così una causa significativa di cecità. Lo sviluppo di questi cambiamenti patologici risulta dall'apoptosi dei periciti indotta dalla via AGE-RAGE. Allo stesso modo, l'aumento dello stress ossidativo prodotto dall'espressione di NF- κ B produce radicali liberi come il perossinitrito all'interno della membrana

sottoretinica e la microvascolarizzazione, danneggiando il DNA. Inoltre, la funzione di regolazione delle cellule macrogliali (o cellule di Müller), cellule che hanno un ruolo fondamentale nella fisiologia retinica, viene compromessa in condizioni di iperglicemia, principalmente a causa dell'accumulo di AGEs e all'attivazione della via AGE-RAGE. Tutte queste alterazioni possono contribuire alla tossicità neuronale retinica. Diversi studi, inoltre, suggeriscono un legame tra l'accumulo di AGEs e lo sviluppo di aterosclerosi nei pazienti diabetici. In particolare, è stato dimostrato che le placche aterosclerotiche dei pazienti diabetici, rispetto ai soggetti non diabetici, presentano un'aumentata espressione di RAGE. Studi sulla biologia degli AGEs hanno anche messo in luce l'esistenza di una stretta correlazione con lo stress ossidativo e la produzione di radicali liberi. In particolare, è stato sottolineato che in situazioni in cui il potenziale ossidoriduttivo è alterato in modo da favorire stress ossidativi, come per esempio nei siti infiammatori, la produzione degli AGEs, ed in particolare degli addotti CML-proteine, è sostanzialmente aumentata. Dunque, lo stato di iperglicemia e di stress ossidativo, associato al diabete, può amplificare la produzione di specie reattive dell'ossigeno che si accumulano all'interno dei tessuti e stimolano l'attivazione cellulare. È stato osservato che l'induzione di una condizione di stress ossidativo inibisce l'attività dell'enzima gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), causando un aumento dei livelli di GA e successivamente la formazione di TAGEs durante il periodo postprandiale.

4.2.2 AGEs e le alterazioni macrovascolari nel diabete

Le complicanze cardiovascolari del DM sono la conseguenza del danno alle strutture vascolari di grande diametro. Sono per lo più la principale causa di morte tra i pazienti diabetici, rappresentando il 50% dei decessi correlati a questa malattia. La cardiomiopatia diabetica è caratterizzata da una disfunzione ventricolare derivante dall'ipertrofia dei miociti e dalla fibrosi miocardica. Il coinvolgimento dell'asse AGE-RAGE è stato ammesso come uno dei fattori che contribuiscono a questa complicanza cronica non ancora chiarita (**Figura 5**). Questo processo può causare il deterioramento delle funzioni cardiache attraverso l'ipertrofia dei miociti. Recentemente, è stato stabilito che questo processo di rimodellamento cardiaco si verifica attraverso la connessione tra la via AGE-RAGE e le cellule dendritiche (DC), che sono cellule presentanti l'antigene con funzioni essenziali nella regolazione e nell'omeostasi delle cellule T. Tuttavia, è stato riportato che l'accumulo di DC maturate durante l'infarto miocardico potrebbe aggravare il rimodellamento del tessuto. Allo stesso modo, durante gli studi in vitro, è stato determinato che la via AGE-RAGE promuove la maturazione delle DC e, quindi, l'espressione di geni che sviluppano l'ipertrofia, come MYH7, che codifica la catena pesante della beta-miosina cardiaca (β -MHC).

L'aumento del numero di fibroblasti in seguito all'incremento degli AGEs nella matrice extracellulare promuove le interazioni con le proteine strutturali, inducendo una reticolazione tra le fibre di collagene e la laminina, con conseguente perdita delle proprietà elastiche del tessuto cardiaco, rigidità e aumento del volume cardiaco, causando così una disfunzione diastolica. La via AGE-RAGE interviene anche nella proliferazione dei fibroblasti stimolando geni proinfiammatori e

TGF- β , amplificando l'effetto negativo sulle proprietà elastiche cardiache. Contestualmente, l'accumulo di AGE nel tessuto cardiaco è anche legato all'inibizione dell'espressione della proteina sirtuina-1 (SIRT1). La SIRT1, membro della famiglia delle deacetilasi di classe III, è una proteina antiossidante in grado di ritardare la fibrosi e l'apoptosi delle cellule cardiache attraverso la sua attivazione da parte del NAD⁺. Inoltre, la proteina chinasi attivata dall'adenosina monofosfato (AMPK) mantiene l'equilibrio energetico cellulare e aumenta i livelli di NAD⁺ e può anche regolare le funzioni di SIRT1. In merito a ciò, è stato stabilito che le alterazioni della Na⁺⁺/K⁺ ATPasi sono dovute alla disregolazione della via SIRT1/AMPK, che modifica l'omeostasi ionica cellulare. Inoltre, i livelli di Ca²⁺ diminuiscono a causa dell'aumento dell'attività dei recettori della rianodina indotti dall'AGE-RAGE. Questi recettori riescono a bilanciare i livelli di ioni durante la diastole e la sistole; tuttavia, la loro iperattività permette una fuoriuscita di Ca²⁺ dal reticolo sarcoplasmatico durante la diastole, diminuendo i livelli di Ca²⁺ durante la sistole e, quindi, disturbando il ciclo cardiaco, portando così a una disfunzione cardiaca.

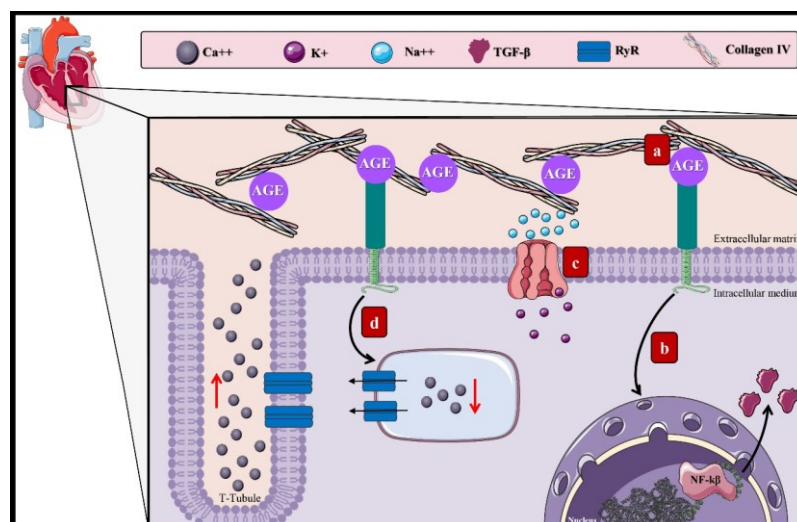


Figura 5. AGEs nella cardiomiopatia diabetica. Gli effetti degli AGEs nella cardiomiopatia diabetica generati attraverso vari meccanismi. (a) Accumulo nella matrice extracellulare del tessuto cardiaco a causa dell'interazione con le proteine strutturali, inducendo una reticolazione tra le fibre di collagene e la laminina e diminuendo le proprietà elastiche del tessuto cardiaco. (b) Attivazione della via AGE-RAGE con l'induzione di TGF- β e altre citochine proinfiammatorie che permettono la proliferazione dei fibroblasti favorendo l'ipertrofia miocardica. (c) Attivazione della via AGE-RAGE e squilibrio ionico dovuto all'inibizione della via SIRT1/NAD⁺, che disturba la funzione della Na⁺⁺/K⁺ ATPasi. (d) Sovra stimolazione del RyR, generazione di una modificazione irregolare dei livelli di Ca⁺⁺, favorendo la sua uscita e causando un'alterazione del ciclo cardiaco che porta a una disfunzione diastolica. Ca⁺⁺: calcio, K: potassio, Na⁺⁺: sodio, TGF- β : fattore di crescita trasformante β and RyR: recettori della rianodina. (Salazar et al, 2021)

4.3 Citotossicità dei TAGEs nel sistema nervoso

La neurotossicità dei TAGEs è stata evidenziata in numerosi studi precedenti, i quali hanno comunemente dimostrato una presenza rilevante di AGEs tossici nei corpi cellulari dei neuroni del cervello di pazienti con la malattia di Alzheimer's. La malattia di Alzheimer's rappresenta la causa più comune di demenza senile nei paesi sviluppati. La sua patogenicità è caratterizzata dalla presenza di placche senili, dette anche placche amiloidi, in sede extracellulare e di ammassi neurofibrillari intracellulari. Le placche senili sono costituite dal peptide β -Amiloide ($A\beta$), il cui accumulo è considerato come un evento precoce e causale nella patogenesi dell'Alzheimer. Gli ammassi neurofibrillari sono costituiti principalmente da proteina tau fosforilata. La proteina tau fa parte di una famiglia di proteine che sostiene la struttura del neurone e regola il trasporto delle sostanze nutritive, interagendo con i microtubuli (MBPs). Le placche senili e gli ammassi neurofibrillari ostacolano il traffico cellulare, portando ad errori di comunicazione tra i neuroni, compromettendo il flusso di sostanze nutritive e, infine, con l'evolvere della malattia, conducendo a una grave perdita neuronale. Poiché l'incidenza della malattia di Alzheimer's è 2-5 volte maggiore nei pazienti diabetici, molti studi hanno cercato di indagare se il diabete rappresenti un fattore clinico di rischio per la sua progressione. Il metabolismo alterato del glucosio nei pazienti diabetici aumenta il rischio di sviluppare disordini neurologici come l'Alzheimer's. È stato dimostrato che gli AGEs sono coinvolti nello sviluppo di segni distintivi patologici dell'Alzheimer's, tra i quali vi è un aumentato accumulo, attraverso la glicazione, del peptide β -Amiloide e la formazione di ammassi neurofibrillari causata da una accelerata fosforilazione della proteina Tau. La maggior parte dei TAGEs sono stati riscontrati principalmente nel corpo cellulare dei neuroni dell'ippocampo e del paraippocampo dei pazienti con Alzheimer's mentre gli AGEs derivati dal glucosio (Glu-AGEs) sono stati rilevati nel nucleo delle placche di amiloide e negli astrociti. Tuttavia, vi è una differenza di localizzazione sia di Glu-AGEs, presenti a livello extracellulare e intracellulare, e i TAGEs, localizzati principalmente all'interno delle cellule, la quale suggerisce un meccanismo di base diverso nell'esprimere la loro neurotossicità.

4.3.1 Effetti extracellulari e intracellulari di TAGE nelle cellule neuronali

Alcuni ricercatori hanno cercato di indagare quali tipi di AGEs siano perlopiù coinvolti nello sviluppo della malattia di Alzheimer's utilizzando culture cellulari di neuroni corticali. Nell'incubazione di tali neuroni con sette classi immunochimicamente distinte di AGEs e di carbossimetil lisina (CML), i TAGEs hanno mostrato di avere una marcata citotossicità verso le cellule, e questa tossicità è stata neutralizzata attraverso l'aggiunta di uno specifico anticorpo anti-TAGE. È stato successivamente frazionato, attraverso la filtrazione su gel, il siero dai normali controlli ed in due frazioni sono stati identificati numerosi epitopi degli AGEs. L'aggiunta di queste due frazioni ha causato la morte delle cellule neuronali precedentemente incubate in coltura e questo

effetto citotossico è stato completamente neutralizzato con l'aggiunta di uno specifico anticorpo anti-TAGE e non di anticorpi rivolti verso altri AGEs o di CML.

È stato inoltre esaminata la relazione tra l'alterato metabolismo cerebrale del glucosio e la patogenesi dell'Alzheimer's nelle cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y trattate con gliceraldeide (GA), un precursore dei TAGEs. Da questo studio è emerso che nelle cellule SH-SY5Y trattate con GA si è verificato un'accumulo intracellulare di TAGE, che ha portato alla morte cellulare. La produzione di TAGE in tali cellule era dose-dipendente aumentata attraverso GA. È stato osservato inoltre che l'attività della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GADPH), normalmente ridotta nei pazienti con Alzheimer's, si è ridotta nelle cellule neuronali trattate con GA. Precedentemente è stato dimostrato che i TAGEs inattivano GADPH nei sistemi di coltura dei neuroni e l'inattivazione extracellulare di GADPH stimola ulteriormente la formazione di TAGEs intracellulare. Inoltre i TAGEs riducono la concentrazione di amiloide β 1-42 ($A\beta$ 42) nei mezzi di coltura, aumentano la fosforilazione della proteina tau e i livelli intracellulari di biomarcatori della malattia di Alzheimer's nelle cellule SH-SY5Y. Pertanto, questi risultati suggeriscono così che i TAGEs intracellulari rappresentano degli agenti casuali generali dell'insorgenza/progressione dell'Alzheimer's.

4.3.2 Meccanismi con cui TAGE intracellulari causano danni nelle cellule neuronali

Un segno distintivo neuropatologico dell'Alzheimer's è l'accumulo intracellulare di grovigli neurofibrillari (NFT). I grovigli neurofibrillari sono formati dall'iperfosforilazione di una proteina associata ai microtubuli nota come tau, che ne fa aggregare, o raggrupparsi, in una forma insolubile. Queste aggregazioni di proteina tau iperfosforilata sono anche chiamate PHF, o "filamenti elicoidali appaiati". La polimerizzazione dei dimeri di α - e β -tubulina, che si auto-assemblano, è coinvolta nella costruzione dei microtubuli e la loro funzione è quella di fungere da elementi architettonici per sostenere la loro caratteristica forma allungata. Molti studi hanno indagato quali fossero le proteine bersaglio degli AGEs tossici avvalendosi di tecniche come l'elettroforesi su gel bidimensionale e la spettrometria di massa, e i risultati ottenuti hanno dimostrato che la β -tubulina rappresentava il principale bersaglio dei TAGEs. A tal proposito, sono state osservate nelle cellule SH-SY5Y trattate con GA, la formazione di un legame TAGE- β -tubulina, un'aggregazione anormale di β -tubulina e l'inibizione della crescita dei neuriti (dendriti e assone). Questi risultati mostrano un'implicazione del legame TAGE- β -tubulina nella formazione dei filamenti elicoidali appaiati (PHF), componenti dei grovigli neurofibrillari (NFT). L'aggregazione anormale di β -tubulina indotta da gliceraldeide ha impedito alla β -tubulina di formare normali eterodimeri con α -tubulina e ha inibito la polimerizzazione e la stabilizzazione dei microtubuli. Ciò suggerisce che una riduzione dell'interazione tra la proteina tau modificata e la tubulina modificata favorisce sinergicamente l'aggregazione di tau e di β -tubulina nei filamenti elicoidali appaiati (PHF), e dunque, la glicazione può promuovere la formazione di PHF nella malattia di Alzheimer's, considerando così i TAGEs come degli agenti casuali generali dell'insorgenza di malattie neurodegenerative. Tuttavia, l'esatta

struttura del legame TAGE- β -tubulina, i meccanismi responsabili della sua formazione, e la sua via di segnalazione a valle, attualmente rimangono poco chiari.

4.3.3 Segnalazione cellulare dei TAGEs nei neuroni

L'attivazione del recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata, il RAGE, rappresenta uno dei mediatori principali nella patogenicità della malattia di Alzheimer's legata agli AGEs, i cui livelli sono risultati elevati in diversi tipi di cellule nel cervello di pazienti con Alzheimer's. Oltre ad essere espresso nei neuroni, è presente infatti in diversi tipi di cellule nel cervello, come le cellule entrocromaffini (CE), gli astrociti e le cellule della microglia. Tuttavia, vi sono altri tipi di recettori nelle cellule neuronali che legano gli AGEs, come AGE-2 e AGE-3. Studi precedenti hanno riportato risposte infiammatorie RAGE-dipendenti nelle cellule della microglia attraverso la via di segnalazione del fattore di trascrizione nucleare kB (NF-kB). In particolare, l'attivazione della nicotinamide adenina dinucleotide fosfato ossidasi ha indotto la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso RAGE, causando la morte delle cellule entrocromaffini e dei neuroni. Inoltre, è stato dimostrato in topi modello Alzheimer's transgenici, che il segnale RAGE-dipendente stimola risposte infiammatorie e processi che alimentano la morte cellulare dei neuroni. Le proteine intracellulari che hanno subito un'alterazione da parte degli AGEs tossici vengono rilasciate a livello extracellulare in seguito alla rottura delle cellule causata dalla loro citotossicità ed interagiscono con RAGE e/o con AGE-2 e AGE-3. Pertanto, sono attualmente disponibili informazioni limitate sulle vie di segnalazione cellulare RAGE-dipendenti nei neuroni e se i TAGE si legano ai recettori AGE-2 e AGE-3.

4.4 Citotossicità dei TAGEs nel fegato

L'assunzione abituale di una quantità eccessiva di bevande zuccherate e di alimenti processati contenenti elevate concentrazioni di zuccheri (in particolare sucralosio e sciroppo di mais ad alto contenuto di fruttosio), sono sempre di più considerati come la causa dell'aumento della concentrazione di gliceraldeide (GA) negli epatociti e nelle cellule stellate epatiche. L'accumulo di GA in questi tipi di cellule promuove la generazione di AGEs tossici causando delle modificazioni ai componenti delle cellule, come la perdita della funzionalità delle proteine e anomalie alla membrana mitocondriale. Dati statistici odierni mettono in luce un aumento considerevole, a livello mondiale, della prevalenza della sindrome metabolica (MetS) e, la steatosi epatica non alcolica (NAFLD), un fenotipo della sindrome metabolica, caratterizzata dalla presenza di grasso extra nelle cellule del fegato non causato dall'alcol, è attualmente considerato come il disturbo epatico più comune. La progressione della steatosi epatica non alcolica nella sua forma più grave, la steatoepatite non alcolica (NASH), accompagnata da un'infiammazione e da un danno alle cellule epatiche, è stata spiegata da molti studiosi attraverso l'incidenza di una serie di fattori paralleli che

ne condizionano la progressione: stress ossidativo, resistenza all'insulina, fattori genetici ed epigenetici, condizioni ambientali e microflora intestinale. Risulta pertanto che i TAGEs siano i responsabili di una forte citotossicità e di un danno, sia intracellulare che extracellulare, negli epatociti.

4.4.1 TAGEs intracellulari e morte delle cellule epatiche

I risultati di ricerche e di studi effettuati fino ad ora suggeriscono che i TAGEs, all'interno delle cellule, contribuiscono al danno degli epatociti, promuovendo lo sviluppo di NASH. Evidenze scientifiche hanno dimostrato che i TAGEs sono stati rilevati maggiormente negli epatociti di pazienti affetti da steatoepatite non alcolica (NASH), mentre sono stati trovati livelli trascurabili di TAGEs in pazienti con steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e senza osservare, in questi due gruppi, differenze significative nella prevalenza dei livelli di CML o AGE derivati dal glucosio. Più in dettaglio, l'accumulo di TAGEs e livelli anormali della proteina Hsc70 (Heat shock cognate 70), un membro della famiglia delle proteine da shock termico prodotte nelle cellule quando vengono esposte alle alte temperature o ad elevate condizioni di stress, con la funzione di proteggere le cellule da possibili danni e spesso agevolare il corretto ripiegamento delle proteine, sono stati osservati nelle cellule Hep3B del carcinoma epatocellulare umano trattate con gliceraldeide. Tuttavia, sono stati osservati anche livelli elevati di mRNA della proteina C-reattiva (CRP), i quali sono stati successivamente ridotti a livelli normali effettuando un pre trattamento con aminoguanidina (AG), un inibitore della formazione di AGEs. Ciò ha suggerito che la generazione intracellulare e l'accumulo di TAGEs ha attivato tutta una serie di risposte infiammatorie. Studi precedenti hanno esaminato le cellule Hep3B incubate con gliceraldeide o con alte concentrazioni di fruttosio e hanno identificato una proteina modificata da tali TAGEs: la ribonucleoproteina nucleare eterogenea M (hnRNPM), una proteina che lega il filamento di RNA e che contribuisce a molti processi del metabolismo degli acidi nucleici, alterandone i livelli di espressione. Inoltre, è stato identificato come un bersaglio delle modifiche indotte dai TAGEs, nelle cellule del carcinoma epatocellulare HCC HepG2 tratte con GA, la proteina Caspasi-3, una proteina che svolge un ruolo cruciale nell'apoptosi. Durante il processo l'apoptotico è stato osservato la scissione e l'attivazione di tale proteina, con conseguente attività proteasica. Questi risultati hanno suggerito una relazione tra gli aumentati livelli di Caspasi-3 indotti dai TAGEs, la perdita dell'attività enzimatica e le modifiche indotte dai TAGEs nell'inibizione della scissione della polimerasi (ADB-ribosio), posta a valle dell'enzima nella cascata apoptotica, con conseguente promozione della morte cellulare di tipo necrotico da parte di quest'ultima.

4.4.2 Meccanismi indotti dai TAGE intracellulari nella morte cellulare degli epatociti

La morte cellulare degli epatociti rappresenta il fattore critico nella patogenesi della steatoepatite non alcolica. Studi recenti hanno rilevato che la morte cellulare degli epatociti causata da un accumulo intracellulare di TAGEs viene inibita attraverso il trattamento con N-acetil-cisteina, un potente antiossidante. È stato osservato inoltre che, nelle cellule trattate con gliceraldeide, si è verificata la generazione di specie reattive dell'ossigeno, i ROS, e un aumento dei livelli di espressione dell'mRNA del fattore nucleare eritroide-2 correlato (Nrf2) e dell'emeossigenasi-1, suggerendo un aumento della produzione di ROS indotto da GA e l'attivazione dei fattori di risposta allo stress regolati da Nrf2. I ROS hanno anche dimostrato di aumentare i livelli di espressione della proteina C-reattiva negli epatociti inducendo così l'inizio di risposte infiammatorie da parte dei ROS, fattori caratteristici della steatoepatite non alcolica, e di alterare il potenziale di membrana dei mitocondri, i quali rappresentano una fonte importante di ROS in varie cellule di mammiferi. I ROS dunque sono stati identificati e considerati come un innesco diretto della morte cellulare dovuta all'accumulo di TAGEs anche se, attualmente, le informazioni disponibili riguardanti i meccanismi alla base della morte cellulare legata a NASH sono limitate.

4.4.3 Gli effetti extracellulari dei TAGEs sugli epatociti e sulle cellule stellate epatiche

La morte cellulare degli epatociti può causare la fuoriuscita delle proteine modificate dai TAGEs dalle cellule e causare così un aumento del pool extracellulare dei TAGEs. Studi precedenti hanno dimostrato che i TAGEs circolanti influenzano le cellule vicine attraverso l'interazione con i recettori RAGEs ed esercitano effetti infiammatori all'interno degli epatociti stessi. È stato dimostrato inoltre che i TAGEs aumentano i livelli di espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) nelle cellule Hep3B innescando così meccanismi di proliferazione, di migrazione e formazione di tubi nelle cellule epatiche. Ciò suggerisce un aumento del potenziale angiogenico tumorale delle cellule Hep3B indotto dalla segnalazione TAGE-RAGE attraverso l'espressione up-regolata di VEGF. L'attivazione dell'asse TAGE-RAGE ha anche indotto reazioni trombotiche attraverso l'espressione dell'attivatore del plasminogeno-1, un potente inibitore, la molecola di adesione intracellulare-1 e MCP-1 attraverso la produzione di ROS.

Altri risultati indicano inoltre che i TAGEs sono coinvolti nell'insorgenza e nella progressione della fibrosi epatica inducendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno e l'attivazione delle cellule stellate epatiche, normalmente quiescenti, attraverso l'interazione con il recettore RAGE. La fibrosi epatica è caratterizzata da un accumulo di molecole della matrice extracellulare causato da un danno epatico cronico, compresa la steatoepatite non alcolica, e la sua progressione può portare a cirrosi epatica. In caso di danno epatico, le cellule stellate epatiche vengono attivate da varie citochine, come TGF- β 1 (il fattore di crescita trasformante beta), TNF- β (il fattore di necrosi tumorale beta) e fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF), con conseguente differenziazione in cellule simili a miofibroblasti e la secrezione di una grande quantità di materiale della matrice extracellulare,

incluso il collagene I. È stato osservato che il trattamento di cellule stellate epatiche umane con TAGE ha indotto una condizione di stress ossidativo intracellulare attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e i livelli di espressione di geni fibrotici, come α -SMA (actina del muscolo liscio alfa), TGF- β 1 e collagene tipo I α 2, sono risultati aumentati. L'aumento dei livelli di TGF- β 1 ha indotto un aumento dell'apoptosi, la quale è risultata essere soppressa dalla presenza dei TAGEs, contribuendo così a mantenere un numero significativo di cellule stellate epatiche e, di conseguenza, ad aumentare la produzione di molecole della matrice extracellulare e, in definitiva, della fibrosi.

4.5 Citotossicità dei TAGEs nel cuore

Le malattie cardiovascolari rappresentano uno dei problemi di salute pubblica più significativi del 21° secolo e vengono classificate come malattie legate allo stile di vita. Come riportato precedentemente, il diabete mellito è uno dei principali fattori di rischio per la morbilità e mortalità da malattie cardiovascolari e l'incidenza risulta essere di 2-4 volte superiore nei pazienti diabetici rispetto alla popolazione generale. Sebbene tali malattie siano associate al diabete, studi recenti hanno rilevato che il rischio di sviluppare malattie cardiovascolari risulta aumentato negli esseri umani sani a causa di stili di vita che prevedono un consumo di quantità abbondanti di alimenti ricchi di calorie.

4.5.1 TAGEs intracellulari e danno cellulare ai cardiomiociti

È stato dimostrato che, all'interno dei cardiomiociti, si sono generati e accumulati livelli di gliceraldeide intracellulare, causando una diminuzione dei tassi di pulsazione e inducendo la morte cellulare. I ricercatori per dimostrare e confermare tali risultati hanno eseguito un'analisi immunostochimica nei campioni trattati con gliceraldeide e hanno rilevato l'assenza di cellule in alcune aree dei campioni, dimostrando la distruzione e la morte cellulare. Inoltre, per chiarire gli effetti dei TAGEs sulla pulsazione e sulla vitalità dei cardiomiociti, gli studiosi hanno pretrattato le cellule con aminoguanidina (AG), che ha mostrato di inibire non solo la riduzione delle pulsazioni e della vitalità cellulare ma anche la generazione dei TAGEs. Tuttavia, non è ancora stato stabilito se questi meccanismi coinvolgono queste vie oppure diversi percorsi. I meccanismi intracellulari con cui i TAGEs causano un danno cellulare nei cardiomiociti vengono spiegati mediante la soppressione dell'autofagia. L'autofagia è un meccanismo cellulare di rimozione selettiva di componenti citoplasmatici danneggiati, che contribuisce al riciclaggio di proteine a lunga emivita, aggregate o mal ripiegate o addirittura interi organelli. La disregolazione di tale processo è stata implicata in diverse malattie, tra cui la cardiomiopatia, il cancro e la neurodegenerazione. In questo contesto, sono stati esaminati i fattori che regolano l'autofagia, in particolare LC3-II/ LC3-I e p62 ed

è stato rilevato che l'espressione nei cardiomiociti di LC3-II/ LC3-I ha subito una down-regulation tempo-dipendente dopo il trattamento con TAGEs. Sebbene le proteine che subiscono una modificazione da parte dei TAGEs e che vengono generate nei cardiomiociti non sono ancora state identificate, le proteine che regolano le vie legate all'autofagia, come quelle coinvolte nella produzione di LC3-II, possono essere modificate dagli AGEs tossici. Vi sono molte evidenze che suggeriscono che i TAGEs generati all'interno dei cardiomiociti, sia umani ma anche nel ratto, inducono direttamente un danno portando così a sviluppare malattie cardiovascolari. Tuttavia, sono necessari studi futuri per identificare le proteine modificate dai TAGEs e chiarire i meccanismi attraverso i quali la generazione di AGE tossici porta allo sviluppo di malattie cardiovascolari.

4.5.2 TAGEs intracellulari e morte cellulare dei fibroblasti cardiaci

I fibroblasti cardiaci sono cellule che svolgono un ruolo significativo nel mantenimento della conduzione elettrica e delle forze meccaniche nel cuore, oltre al mantenimento dell'architettura cardiaca durante l'omeostasi della matrice extracellulare del miocardio. A seguito di lesioni, queste cellule vengono attivate, espanse e producono proteine della matrice extracellulare (ECM), svolgendo un ruolo fondamentale nella risposta di guarigione fibrotica. Uno studio ha evidenziato che, i fibroblasti cardiaci trattati con gliceraldeide, ha portato alla generazione di TAGEs e ha indotto la morte cellulare. Sebbene l'attivazione di questa popolazione cellulare sia cruciale per la riparazione della funzione cardiaca, quando livelli di TAGEs intracellulari inducono la morte cellulare nei cardiomiociti, i TAGE all'interno dei fibroblasti possono inibire la loro funzione, portando così ad una disfunzione cardiaca. (Figura 5)

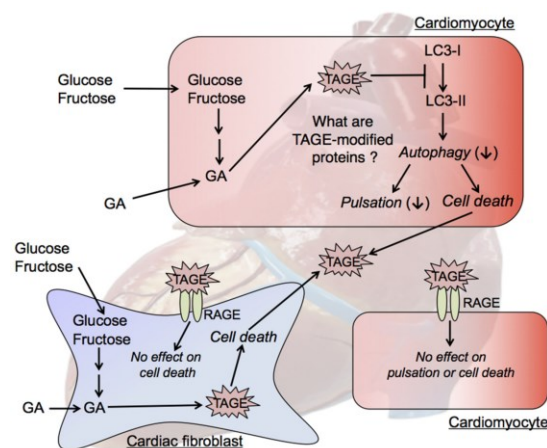


Figura 5. Tossicità dei TAGE nei cardiomiociti e fibroblasti cardiaci. L'accumulo di gliceraldeide (GA), nei cardiomiociti porta a modifiche indotte dal TAGE nei componenti cellulari, comprese le proteine. Il TAGE può essere rilasciato dai cardiomiociti morti; tuttavia, il TAGE extracellulare non sopprime la pulsazione dei cardiomiociti né induce la morte cellulare attraverso l'asse TAGE-RAGE. La generazione intracellulare di TAGE nei fibroblasti cardiaci e la loro citotossicità, e gli effetti del TAGE extracellulare sui fibroblasti cardiaci non sono ancora stati chiariti.

4.6 TAGEs e la progressione del cancro

Molti studi evidenziano come gli AGEs siano coinvolti nella mutagenesi, nella proliferazione e nella migrazione di cellule cancerogene attraverso l'attivazione dei recettori RAGEs. La stimolazione di tali recettori dopo il legame con i loro ligandi, come ad esempio gli AGEs, porta all'attivazione di vie di segnalazione molecolari che contribuiscono all'espressione di fattori di trascrizione, come NF- κ B, STAT3, HIF-1 α , AP-1 e CREB. L'interazione AGE-RAGE, inoltre, ha la capacità di attivare NADPH ossidasi, portando ad aumentare lo stress ossidativo intracellulare. Questi mediatori dell'infiammazione inducono così cambiamenti epigenetici in lesioni pre-maligne e il silenziamento di geni soppressori di tumori. L'espressione dei RAGEs risultano sovra-regolati in una stragrande maggioranza di tumori ma, in condizioni fisiologiche, la loro espressione risulta essere molto bassa. Esempi specifici di tumori nei quali l'espressione dei RAGEs risulta sovra-regolata includono tumore colon-rettale, tumore pancreatico, tumore alla prostata, tumore al polmone e tumore al seno. È stato riportato da uno studio che livelli elevati di TAGEs nel siero sono stati riscontrati in pazienti affetti da carcinoma epatocellulare non-B/non-C rispetto ai pazienti privi di carcinoma epatocellulare ma affetti da steatoepatite non alcolica. Lo studio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition), uno dei più grandi studi di coorte al mondo con oltre mezzo milione di partecipanti reclutati in 10 paesi e seguiti per quasi 15 anni, ha rivelato che, per i pazienti nei quali sono stati riscontrati elevati livelli di TAGEs nel siero, il rischio di sviluppare tumore rettale dopo 4 anni era molto elevato. L'interazione AGE-RAGE ha mostrato di alterare la cascata di segnalazione intracellulare in pazienti con carcinoma epatocellulare e con elevati livelli di cellule stellate epatiche attivate, inducendo angiogenesi, invasione, migrazione, proliferazione e fibrosi tumorale. L'attivazione dell'asse AGE-RAGE è stata suggerita per spiegare la progressione maligna del carcinoma epatocellulare connesso alla steatoepatite non alcolica, inducendo, a causa dei TAGEs, l'espressione della proteina C-reattiva in questa tipologia di tumore. Tuttavia, ciò è stato attenuato da un pretrattamento con un antisiero anti-RAGE. In particolare, la forma solubile di RAGE (sRAGE), che funziona come un recettore esca, ha impedito la progressione maligna del carcinoma epatocellulare. Pertanto, l'asse AGE-RAGE potrebbe essere un potenziale bersaglio di trattamento della steatoepatite non alcolica e nel carcinoma epatocellulare correlato ad essa. Ricerche più recenti hanno rilevato livelli elevati di TAGEs anche nei tumori del melanoma umano in contrapposizione a valori del tutto trascurabili nella pelle di persone sane ed è stato dimostrato che i TAGEs promuovono la crescita e la migrazione delle cellule in questo tipo di tumore. In definitiva, tutti questi risultati mostrano i ruoli potenziali dei TAGEs nella crescita e nell'invasione delle cellule tumorali attraverso l'interazione con i recettori RAGEs.

4.7 COVID-19 e il recettore dei prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE)

La nuova malattia infettiva respiratoria chiamata malattia da coronavirus 2019 (COVID-19), causata da coronavirus 2 (SARS-CoV-2), è stata rilevata per la prima volta nel Dicembre 2019 a Wuhan (Hubei, Cina) e rapidamente diffusa in tutto il mondo, tanto che la World Health Organization la dichiarò ufficialmente come una pandemia globale. Molti pazienti con COVID-19 hanno mostrato sintomi lievi-moderati (febbre, tosse, mancanza di respiro, dolori muscolari, perdita del gusto o dell'olfatto, diarrea); circa il 15% di essi hanno sviluppato polmonite grave, sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), shock settico e/o insufficienza multi-organo, con un elevato rischio di morte per insufficienza respiratoria.

La principale caratteristica patogenetica del COVID-19 è una grave polmonite che si evolve nella sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), caratterizzata da un danno diffuso agli alveoli polmonari con formazione delle membrane ialine, una formazione patologica visibile al microscopio costituita da fibrina, lipidi, proteine, emoglobina, di aspetto omogeneo, che si può depositare sulla superficie degli alveoli polmonari, infiltrazione delle cellule mononucleari e macrofagi nello spazio aereo e un diffuso ispessimento della parete alveolare. Le particelle virali sono state rilevate in particolare modo nei pneumociti di tipo I e di tipo II, nelle cellule epiteliali cigliate nasali, bronchiali e nella muscosa del bronchiolo. Nei pazienti con COVID-19 lieve, i macrofagi polmonari locali iniziano una efficiente risposta innata ed adattativa, che è in grado di reprimere la replicazione e l'infezione di SARS-CoV-2, così che i pazienti, con assenza o lieve polmonite, vengono guariti rapidamente. Nei casi più severi o critici, i macrofagi alveolari e le cellule epiteliali cigliate, che risultano essere attivati dalla presenza di varie comorbilità/condizioni che sostengono la suscettibilità all'infezione del virus, producono eccessivi livelli di citochine pro-infiammatorie e chemiochine, le quali massivamente attaccano i monociti e i neutrofilo al sito di infezione per spazzare via le particelle di virus e le cellule infette, con conseguente innesco di una risposta infiammatoria innata incontrollata. Pertanto, gli elevati livelli di citochine causano shock e danno tissutale a livello locale nei polmoni e a livello sistemico nel cuore, nel fegato e nei reni, portando all'insufficienza respiratoria ed all'insufficienza multi-organo. Finora sono stati registrati circa 3,1 milioni di decessi causati dall'infezione da SARS-CoV-2, con un massimo del 96% dei morti che mostra una o più comorbilità. Le comorbilità più frequentemente associate a COVID-19 grave sono malattie polmonari croniche, ipertensione, obesità, diabete e malattie cardiovascolari (CVD), tipicamente associate all'invecchiamento, le quali giustificano il rischio maggiore, per le persone più anziane, di ricovero e di ricovero in terapia intensiva. Come descritto in precedenza, il recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (RAGE) è un recettore multiligando della superfamiglia delle immunoglobuline, coinvolto in molti processi fisiologici (es. proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulare) e patologici (es. neurodegenerazione, infiammazione e cancro). Alcuni ricercatori hanno notato che la sovraespressione e/o l'iperstimolazione di RAGE gioca un ruolo cruciale nel sostenere gli stati patologici delle comorbilità del COVID-19. Inoltre, è stata segnalata un'interazione tra la segnalazione RAGE e il sistema renina-angiotensina (RAS), sistema implicato

nell'infezione e nella malattia da SARS-CoV-2, e un membro del quale, l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), è il principale recettore cellulare di SARS-CoV-2, mediando l'ingresso del virus nelle cellule ospiti. Sulla base di numerosi dati e considerazioni, RAGE emerge come un intrigante bersaglio molecolare nella prevenzione del COVID-19 grave.

4.7.1 Meccanismo d'azione di COVID-19

La proteina superficiale spike di SARS-CoV-2 riconosce e lega l'enzima 2 convertitore dell'angiotensina umano (ACE2), una metallocarbossipeptidasi di tipo I trans-membrana presente all'interno della cascata delle proteine RAS (sistema renina-angiotensina), per ottenere l'ingresso nelle cellule che la esprimono. Il legame della proteina spike a ACE2 facilita l'entrata del virus nelle cellule, nelle quali si replica e si trasmette alle altre cellule. Il tutto si traduce in uno squilibrio del sistema-renina-angiotensina e con conseguente attivazione di membri pro-infiammatori del sistema come angiotensina II e il recettore dell'angiotensina tipo 1 (AT1R). L'ACE2 è espresso nelle cellule endoteliali vascolari, nell'epitelio tubulare renale, nel polmone e nel tratto gastrointestinale, in cui funziona come co-recettore per l'assorbimento dei nutrienti. L'ACE2 si trova in misura minore anche nel cuore, nella tiroide, nel tessuto adiposo, nel fegato, nella vescica, nella ghiandola renale, nel sangue, nella milza, nel midollo osseo, nel cervello e nel tessuto muscolare, il che spiega i sintomi e la disfunzione multiorgano osservati nei pazienti COVID-19 critici. Il coinvolgimento dell'ACE2 nella patogenesi dell'infezione da SARS-CoV è stato dimostrato da diversi studi. La sovraespressione di ACE2 umano ha aumentato la gravità della malattia in un modello murino di infezione da SARS-CoV-2. L'ACE2 degrada l'Ang I in Ang 1-9 e l'Ang II in Ang 1-7, che agiscono sul recettore per l'angiotensina 1-7 (recettore Mas), espresso in diverse linee cellulari, tra cui l'AT-2, contro-regolando negativamente i componenti del RAS. Infatti, ACE2 esibisce una funzione protettiva sul sistema cardiovascolare e in altri organi, abbassando la pressione sanguigna attraverso la vasodilatazione e promuovendo l'escrezione renale di sodio e acqua; attenua anche l'infiammazione attraverso la produzione di ossido nitrico. Ang 1-9 mostra pertanto effetti biologici benefici attraverso il recettore dell'angiotensina di tipo 2 (AT2R) con conseguente cardioprotezione. Questi effetti si oppongono direttamente a quelli indotti dalla segnalazione ACE-Ang II, per cui ACE converte il peptide inattivo Ang I in Ang II, che agisce principalmente su AT1R per aumentare la pressione sanguigna inducendo vasocostrizione, riassorbimento renale di sodio e acqua, stress ossidativo, e per promuovere l'infiammazione e la fibrosi. Infatti, Ang II agisce anche come citochina pro-infiammatoria tramite AT1R mediante l'attivazione del fattore nucleare- κ B (NF- κ B). L'attivazione anormale di RAS è associata alla patogenesi di molte malattie, come ipertensione, infarto del miocardio, insufficienza cardiaca, diabete e malattie infiammatorie polmonari. Indipendentemente dal danno polmonare, Ang II induce vasocostrizione polmonare e ipertensione anche in risposta all'ipossia; aumenta la permeabilità vascolare facilitando così l'edema polmonare; induce la fibrosi polmonare mediante l'attivazione delle cellule muscolari lisce o la proliferazione dei fibroblasti; induce direttamente l'apoptosi delle cellule del carcinoma alveolare del polmone

umano, A549, e nelle cellule alveolari primarie di tipo I (AT-1). In uno studio di coorte di dodici pazienti con COVID-19, i livelli circolanti di Ang II erano marcatamente elevati rispetto ai controlli sani ed erano direttamente proporzionali alla carica virale, fornendo un collegamento diretto tra la down-regulation ACE2 tissutale e lo squilibrio sistemico del RAS e facilitando lo sviluppo di danno multi-organo causato dall' infezione da SARS-CoV-2. L'infezione da SARS-CoV-2 potrebbe portare così alla soppressione dell'espressione di ACE2. Ciò successivamente comporterebbe una diminuzione dei livelli di Ang 1-7 e un'elevata produzione di Ang II. L'aumento anomalo dell'attività di Ang II/AT1R potrebbe guidare la risposta infiammatoria nei polmoni e potenzialmente indurre un danno parenchimale diretto nonché effetti patologici in altri organi.

4.7.2 Ruolo di RAGE nelle comorbilità del COVID-19

La maggior parte delle evidenze dimostrano che il COVID-19 compare, nelle forme più gravi e con un rischio di mortalità più elevato, nelle persone che presentano comorbilità come ipertensione, obesità, malattie polmonari croniche, iperglicemia, diabete, malattie cardiovascolari e cerebrovascolari, soprattutto negli anziani. Gli elevati livelli circolanti di citochine e la presenza di infiammazione sistemica, elementi che caratterizzano il COVID-19, sono tipicamente associati all'invecchiamento e ai disturbi metabolici, nonché alle condizioni di comorbilità del COVID-19. Molti studiosi hanno notato che il recettore dei composti della glicazione avanzata rappresenta un attore principale nel sostenere gli stati patologici nelle comorbilità prevalenti del COVID-19. Infatti, nel diabete, nell'obesità e nell'invecchiamento, RAGE e i suoi ligandi sono espressi ad alti livelli nelle cellule infiammatorie e in quelle endoteliali, sostenendo un'infiammazione sistemica di basso grado e stress ossidativo, fattori di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. In questo contesto, gli AGE, i ligandi canonici di RAGE, si accumulano proprio in condizioni di iperglicemia, di stress ossidativo, con conseguente ossidazione degli zuccheri e glicazione delle proteine, e durante i processi infiammatori. Poiché queste condizioni si verificano tipicamente durante l'invecchiamento, non sorprende che l'accumulo di AGE sia un segno distintivo comune nelle persone anziane e che questi soggetti siano più predisposti ad una iperattivazione di RAGE. Tuttavia, un'ulteriore e importante fonte di AGE (esogeni), è rappresentata dagli alimenti trasformati, cotti al forno e arrostiti, tipici della moderna dieta occidentale, la quale merita una particolare attenzione in considerazione del ruolo predisponente degli AGE alle comorbilità del COVID-19.

4.7.3 RAGE nella gravità del COVID-19

Nei soggetti con comorbilità, l'accumulo sistemico di ligandi RAGE potrebbe predisporre a gravi patologie polmonari e danni multiorgano in seguito all'infezione da coronavirus. In presenza di elevati livelli di tali ligandi, si verifica l'iperattivazione di RAGE, che porta a uno stato infiammatorio sub-clinico basale, con conseguente risposta eccessiva e fallimento del polmone contro il virus. Il

potenziale ruolo chiave di RAGE nelle forme gravi di COVID-19 è evidenziato da risultati molto recenti su alcuni dei suoi ligandi. In uno studio retrospettivo i livelli sierici di AGE sono risultati più elevati nei pazienti COVID-19 con un coinvolgimento polmonare rispetto ai pazienti asintomatici. La proteina S100A12, nota come Calgranulina C, un membro della famiglia delle proteine S100 pro-infiammatorie che legano il calcio, è risultata essere una delle proteine maggiormente espresse nel fluido di lavaggio broncoalveolare, procedura che permette di esaminare i diversi aspetti immuno-infiammatori, di pazienti critici con COVID-19. Sono inoltre risultati elevati livelli sierici di S100A8/A9 e HMGB1 in pazienti ricoverati in ospedale in terapia intensiva rispetto a pazienti non in terapia intensiva e negli esiti fatali rispetto ai pazienti sopravvissuti. Complessivamente, questi dati indicano che S100A12 è coinvolta nel danno tissutale polmonare e che l'aumento degli AGEs e HMGB1 nel siero delle persone infette da SARS-CoV-2 è associato a risultati peggiori e con un aumento di mortalità, indicando una convergenza complessiva della segnalazione RAGE in caso di COVID-19 grave. L'eccessiva infiammazione e Oxs contribuiscono alla generazione della tempesta di citochine nei pazienti COVID-19, con conseguente disfunzione endoteliale, che è causa di danno multiorgano e malattie più gravi. La disfunzione endoteliale è una caratteristica clinica comune delle infezioni da coronavirus, in cui l'endotelio subisce un'interruzione a causa dell'aumento dei mediatori pro-infiammatori e della successiva deregolazione della cascata della coagulazione. L'asse HMGB1/RAGE gioca un ruolo importante in questo processo. HMGB1 viene rilasciato passivamente dalle cellule endoteliali danneggiate e, comportandosi come un DAMP, molecole definite come "modelli molecolari associati al danno", induce l'espressione di citochine proinfiammatorie, chemochine, molecole di adesione (ICAM-1 e VCAM-1) e RAGE stesso. In questo modo, HMGB1 induce il reclutamento dei macrofagi, che sovraesprimono i recettori RAGEs e la cui attività si traduce in un ulteriore rilascio di HMGB1 e citochine che propagano la risposta infiammatoria, rappresentando lo stadio iniziale dell'aterosclerosi e predisponendo all'ictus ischemico acuto, una condizione comunemente osservata nei pazienti con COVID-19. Parecchi autori hanno proposto la proteina HMGB1 (High-mobility group box 1) come un bersaglio terapeutico per il COVID-19.

4.7.4 RAGE e il sistema Renina-Angiotensina (RAS)

Il RAS, un sistema endocrino ad attività pleiotropica, noto principalmente per il suo coinvolgimento nel controllo della pressione sanguigna, ha un ruolo di primo piano nella patologia del COVID-19, a partire dall'ingresso del virus nelle cellule attraverso l'interazione della proteina virale, spike, con il recettore enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2). A seguito dell'interazione con SARS-CoV-2, la soppressione di ACE2 dipendente dal virus è responsabile dell'accumulo di Angiotensina II derivata da ACE1, che media la risposta infiammatoria e la lesione parenchimale nei polmoni e in altri organi interagendo con AT1R e attivando NFκB (fattore nucleare kappa). La glicosilazione di ACE2, come avviene in condizioni di iperglicemia tipiche del diabete, aumenta l'affinità di legame di ACE2 al virus e favorisce la diffusione del virus a più organi. Prevenire gli squilibri nei membri del sistema RAS o favorire l'attività del recettore Mas (MasR) o AT2R rappresenta una strategia terapeutica per limitare il danno tissutale SARS-CoV-2 dipendente nei pazienti COVID-19. Tuttavia,

il RAGE e la segnalazione Ang II/AT1R sono stimulate cronicamente nelle comorbilità del COVID-19, in cui è stato segnalato che l'interazione tra questi due percorsi contribuisce all'infiammazione e allo stress ossidativo. Il cross-talk tra la segnalazione di RAGE e AT1R potrebbe essere responsabile degli eventi infiammatori e dell'interruzione della barriera alveolare-capillare nei polmoni, portando a edema polmonare ad alta permeabilità e inondazioni alveolari a seguito dell'infezione da SARS-CoV-2 e potrebbe essere determinante nel predisporre soggetti con comorbilità allo sviluppo della forma grave del COVID-19. In questi soggetti, l'ingresso e la replicazione di SARS-CoV-2 potrebbero portare al rilascio aggiuntivo di ligandi RAGE e ulteriore attivazione di RAGE, rafforzando la segnalazione deleteria di AT1R e generando un ciclo proinfiammatorio positivo, culminante in ARDS, tempesta di citochine sistemiche, risposta immunitaria difettosa e diffusione del virus. Ad esempio, l'HMGB1 rilasciato dalle cellule necrotiche induce l'espressione di ACE2 in modo dipendente da RAGE, sostenendo così l'infezione da SARS-CoV-2. La segnalazione di RAGE/AT1R e/o la iper-attivazione AT1R-dipendente da RAGE potrebbero verificarsi in organi diversi dai polmoni, causando infiammazione diffusa e danno multiorgano. Questa ipotesi, se dimostrata sperimentalmente, potrebbe portare allo sviluppo di nuove terapie in grado di interrompere in modo specifico lo scambio tra la segnalazione di AT1R e RAGE, riducendo un'ampia gamma di stati patologici in cui RAGE potrebbe essere ragionevolmente responsabile dell'azione di Ang II durante il decorso dell'infezione da SARS-CoV-2. La riduzione dell'attività di RAGE con inibitori specifici, in particolare TTP488, già testato su pazienti umani, potrebbe essere importante per migliorare la risposta immunitaria, ridurre la tempesta di citochine e aumentare la risposta umorale. Urgono studi pre-clinici e clinici che valutino l'efficacia dell'inibizione di RAGE nel corso delle infezioni da coronavirus anche in vista di un possibile sviluppo di nuovi SARS-CoV in futuro.

4.8 Gli inibitori degli AGEs

L'inibizione della formazione di AGEs e la limitazione dell'assunzione di AGEs con la dieta rappresentano due approcci che sono stati suggeriti per prevenire gli effetti dannosi di tali composti sulla salute umana. Gli inibitori degli AGEs sono stati classificati in due gruppi: composti sintetici e prodotti naturali. In generale, gli inibitori degli AGEs mostrano il loro meccanismo inibitorio bloccando l'attaccamento dello zucchero alle proteine, attenuando la glicossidazione e lo stress ossidativo attraverso l'intrappolamento o la raccolta di alcuni intermedi tra cui i dicarbonili reattivi, i radicali liberi e le specie azotate prodotte nel processo di glicazione, ritardando e prevenendo la perossidazione dei lipidi di membrana e del colesterolo LDL, riducendo lo stress ossidativo indotto dall'AGE e scomponendo i legami crociati AGE formati. Gli inibitori sintetici dell'AGE sono costituiti principalmente da aminoguanidina, dimetilbisguanidina (nota anche come metformina), desferrioxamina, cliochinolo, 2-isopropilideneidrazono-4-oxo-tiazolidin5-ilacetanilide, N-fenilacil-1,3-tiazolio bromuro (PTB), N-fenilacil-4,5-dimetil-1,3-cloruro di tiazolio, D-penicillina, ibuprofene,

indometacina e acido acetilsalicilico. Gli inibitori naturali degli AGEs invece sono perlopiù vitamine come la vitamina E e l'acido lipoico, e anche sostanze fitochimiche come il diferuloilmetano (curcumina), i flavanoidi e i terpeni. Lo studio di nuovi inibitori dell'AGE potrebbe fornire un potenziale approccio terapeutico per la prevenzione delle complicanze principalmente diabetiche.

Capitolo 5. Gli AGEs e la dieta Occidentale

5.1 Introduzione

La dieta Occidentale, ricca di alimenti trasformati e/o trattati termicamente, grassi e zuccheri, che oggi caratterizza la maggior parte delle abitudini alimentari di ciascuno, è indubbiamente una delle fonti principali di AGEs esogeni e, indirettamente anche per quelli endogeni, ed è associata all'aumento dell'incidenza di obesità e delle malattie legate a tale condizione patologica. Negli ultimi decenni la quantità di cibo altamente trasformato e consumato a livello globale è notevolmente aumentata. Il cambiamento nelle tecnologie di lavorazione e la diversità delle materie prime ci hanno fornito una varietà senza precedenti di prodotti alimentari, ma anche alcuni "contaminati" pericolosi per la salute. I trattamenti termici sono procedure comunemente usate nell'industria alimentare per migliorare il sapore, la consistenza, la conservazione e la sicurezza dei prodotti alimentari, durante i quali potrebbero verificarsi una serie di reazioni non enzimatiche e biochimiche. La reazione di Maillard è la reazione più preponderante che si verifica dopo i trattamenti termici, in cui gli zuccheri riducenti reagiscono con gruppi amminici delle proteine, dei peptidi o degli amminoacidi liberi per generare prodotti glicati. Man mano che la reazione procede, si può formare una grande quantità di prodotti della reazione di Maillard con diverse dimensioni e strutture chimiche, compresi quelli indesiderati cancerogeni: acrilammide, ammine eterocicliche e 5-idrossimetilfurfurale. Tra questi, i composti della glicazione avanzata AGEs rappresentano un gruppo di composti eterogenei derivanti dallo stadio "avanzato" della reazione di Maillard. Dopo essere stati isolati per la prima volta da sistemi modello negli anni '80 e descritti per la prima volta in relazione alle complicazioni diabetiche negli anni '90, sono stati condotti ampi studi sugli AGEs non solo nel campo delle scienze alimentari, ma anche della nutrizione per chiarire le loro implicazioni sulla salute umana e i meccanismi associati. Gli AGEs introdotti con la dieta vengono comunemente definiti come dAGEs, ovvero "Dietary AGEs". Tali composti sono onnipresenti negli alimenti e il loro contenuto in essi dipende in gran parte dalla reattività dei gruppi carbossilici e amminici delle macromolecole, insieme a determinate condizioni, come il pH, le procedure di riscaldamento, la temperatura e il contenuto di umidità. Una volta digeriti, i dAGEs possono essere assorbiti nel sistema gastrointestinale e contribuire all'omeostasi degli AGE totali del corpo, i quali vengono parzialmente escreti nelle urine, mentre una quantità significativa si accumula nei vari tessuti. Vari studi in vitro, in vivo e clinici supportano l'idea che i dAGEs svolgano un ruolo importante nella salute e nella malattia in modo del tutto simile a quelli formati per via endogena. Utilizzando modelli animali selvatici e sperimentali hanno dimostrato che i dAGEs contribuiscono in modo significativo alla patogenesi di varie malattie, come disfunzioni metaboliche, obesità, diabete mellito, infiammazione, malattie cardiovascolari e le loro complicazioni e sono coinvolti nei cambiamenti legati al processo di invecchiamento. Inoltre, supportano l'idea che, l'inibizione della formazione di AGEs durante la

produzione di cibo e la riduzione nella dieta, siano due approcci potenti per limitare l'assunzione di dAGEs con conseguente riduzione di tali patologie. Una restrizione di dAGEs può ripristinare anche le alterazioni immunitarie e prevenire o ritardare la progressione dell'invecchiamento.

Numerosi studi hanno dimostrato che le diete ad elevato contenuto di fruttosio/saccarosio portano a diversi effetti negativi, come la dislipidemia, l'ipertensione, l'iperuricemia, l'aumento dell'obesità, l'insulino resistenza e lo sviluppo della sindrome metabolica. L'uso diffuso del fruttosio come parte della dieta occidentale è utilizzato principalmente dalle industrie alimentari per il suo potere dolcificante superiore del 33% rispetto a quello del glucosio, mentre lo sciroppo di mais ad alto contenuto di fruttosio (HFCS) è utilizzato, oltre che per il suo potere dolcificante, per il suo basso costo. L'HFCS è costituito per il 55% di fruttosio e per il 45% di glucosio, si ricava dal mais ed è presente nel pane fabbricato, nelle merendine, nei biscotti, nello yogurt e nelle bevande gasate. Inoltre dato il basso indice glicemico del fruttosio e il fatto che il suo metabolismo non richiede strettamente la secrezione di insulina, ad oggi vi è la possibilità di sostituire il glucosio con il fruttosio come dolcificante per i pazienti diabetici. E' da tempo riconosciuto che la somministrazione di una dieta ad elevato contenuto di fruttosio aumenta i livelli di trigliceridi totali e delle VLDL all'interno del plasma, sia nei volontari sani che nei pazienti con insulino-resistenza o diabete di tipo 2. In alcuni di questi studi è stato anche riscontrato un aumento del colesterolo totale. Il fruttosio è altamente lipogenico, poiché fornisce grandi quantità di triosofosfati epatici come precursori per la sintesi degli acidi grassi. Infatti, in diversi studi è stato osservato che la lipogenesi de novo epatica viene stimolata dopo l'ingestione acuta di fruttosio. Il tutto si traduce in un significativo aumento del contenuto di grasso epatico e dunque di un alterato metabolismo lipidico e una resistenza all'insulina.

5.2 Strutture dei dAGEs

Ad oggi, più di 40 AGEs sono stati identificati e caratterizzati. Le strutture chimiche di alcuni AGEs selezionati in forma libera e in forma legata sono mostrate nella **Figura 6**. La carbossimetil lisina, CML, è stato il primo AGE rilevato, generato prevalentemente dalla scissione ossidativa dei prodotti di Amadori e da altre possibili vie. La N ϵ -(carbossietil)-lisina, CEL, è un omologo di CML, che viene prodotta dalla reazione del metilgliosale (MG) con la lisina. La pirralina è un derivato pirrolico che contiene il gruppo N ϵ -ammino della lisina e si presume sia un altro AGE dominante negli alimenti. Oltre agli AGE derivati dalla lisina, il gruppo guanidinico dell'arginina serve come sito chiave alternativo importante nella reazione di Maillard. La pentosidina è un amminoacido reticolante in cui una lisina e un'arginina sono legate insieme da un pentoso. Le reazioni dell'arginina con le ossialdeidi di MG, gliosale (G) e 3-desossigliucosone (3-DG) producono rispettivamente gli idroimidazoloni derivati da MG (MG-H1, MG-H2 e MG-H3), l'idroimidazolone derivato da G (G-H1) e la diidrossiidiazolone derivata da 3 DG (3DG-H1). Per quanto riguarda gli AGEs in forma legata, è stata chiarita una grande varietà di strutture molecolari in base a condizioni ambientali, ai saccaridi e alle ammine coinvolte. Quando il gruppo amminico è legato a una proteina, la reazione

di Maillard porta a modifiche irreversibili di cross-linking e non delle strutture proteiche. Gli AGEs che non formano legami crociati, come CML, CEL e pirralina, glicano un singolo residuo di lisina; mentre gli AGEs che li formano, coniugano un residuo modificato dagli AGEs stessi con un altro gruppo della catena di aminoacidi all'interno o tra le catene polipeptidiche. La pentosidina è un esempio di AGE cross-linker formato dalla reazione tra residui di lisina e arginina. I dimeri di lisina, cioè GOLD, MOLD e DOLD, sono prodotti da reazioni tra due catene laterali di lisina e rispettivamente di due molecole di glicossale, metilglicossale e 3-deossiglucosone (3DG) (**Figura 6**). Simili cross-links tra una lisina e un residuo di arginina generano il GODIC, MODIC e DODIC. Tuttavia, negli ultimi anni, i ricercatori stanno lavorando per aggiornare gli AGEs, poiché solo pochi di essi sono stati rilevati in vivo o in sistemi simili e ciò evidenzia la possibilità di scoprire nuovi AGEs in "reali" alimenti trasformati contenenti i prodotti della reazione di Maillard.

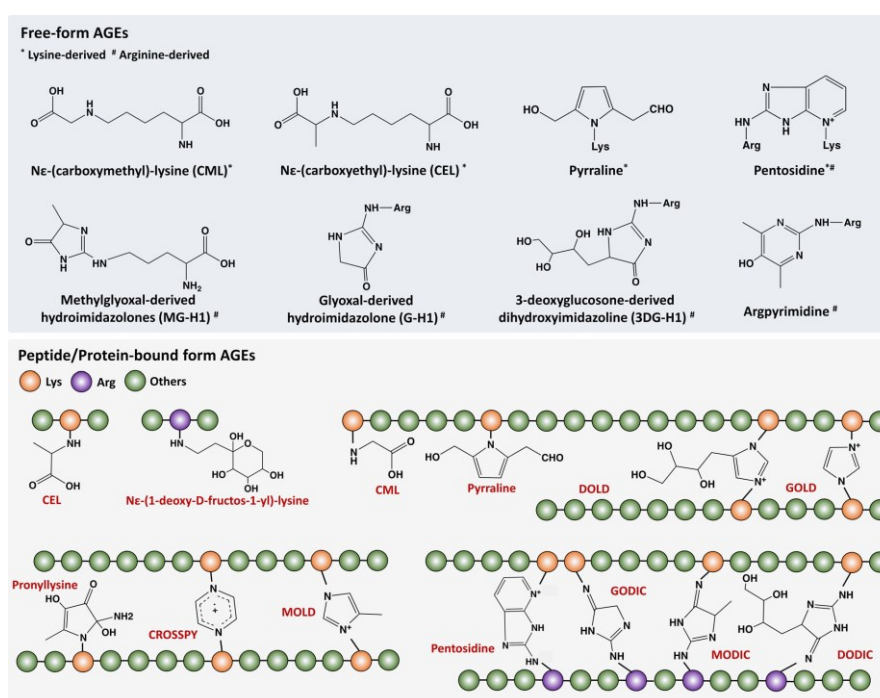


Figura 6. Strutture chimiche di AGE rappresentativi in forma libera e legati a peptidi/proteine negli alimenti. Le molecole degli AGE legati a peptidi/proteine sono state adattate dalla revisione di Poulsen et al. (2013). (Zhang et al, 2020)

5.3 Generazione di dAGEs durante il processamento degli alimenti

Il trattamento termico è parte integrante dell'industria alimentare odierna per migliorare la sicurezza microbica, la durata di conservazione e la palatabilità dei prodotti alimentari. Molti alimenti trasformati con quantità significative di proteine, carboidrati e grassi, come gli snacks da forno, le zuppe in scatola e la frutta secca, subiscono, durante i trattamenti termici, un cambiamento di imbrunimento non enzimatico noto come reazione di Maillard. Come sottolineato in precedenza,

la reazione di Maillard venne descritta per la prima volta nel 1912 e si mostrò gli effetti degli AGEs che si verificavano, durante il trattamento termico e la conservazione degli alimenti, sulla qualità degli alimenti stessi. Sebbene la reazione di Maillard sia studiata dall'industria alimentare da più di un secolo, i prodotti della reazione di Maillard generati da un simile processo di glicazione nel corpo umano sono stati riconosciuti solo circa 50 anni fa. Il pool di AGEs nel corpo umano infatti riflette sia la produzione endogena di questi composti e sia l'assunzione esogena. È stato evidenziato recentemente il contributo dei dAGEs al pool di AGEs dell'organismo grazie al riconoscimento che tali composti vengono assorbiti dall'organismo. Infatti, circa il 10% degli AGE alimentari vengono assorbiti attraverso l'intestino mentre un terzo viene escreto nelle urine entro 48 h e gli altri due terzi rimangono nei tessuti. Tuttavia, AGEs ad alto peso molecolare vengono assorbiti più lentamente e in modo meno efficiente rispetto a quelli a basso peso molecolare. Nonostante gli AGEs di origine alimentare mostrino una grande varietà di composti con diverso peso molecolare e struttura chimica, a causa di una grande varietà dei precursori negli alimenti, solo alcuni di essi sono stati chiaramente definiti e sono state misurate le loro quantità negli alimenti. È ormai comprovato che l'accumulo di dicarbonili reattivi, oxoaldeidi o prodotti di glicossidazione o lipoossidazione porti ad una condizione di stress carbonilico e ciò può dipendere da diversi parametri tra cui temperatura, pH, umidità e presenza di gruppi amminici e carbonilici liberi. Tutte queste condizioni sono anche responsabili di una vasta gamma di colori, odori, sapori e appetibilità a seconda della struttura chimica e dell'azione biologica del composto formato. Tuttavia, la composizione degli alimenti, in particolare il contenuto di grassi e proteine, svolge un ruolo importante nella formazione degli AGEs. Gli alimenti che contengono elevate quantità di grassi e proteine sono generalmente ricchi e anche soggetti alla formazione di nuovi AGEs durante la cottura, rispetto agli alimenti ad alto contenuto di carboidrati, tra cui verdure, frutta, cereali integrali e legumi. Il motivo per cui i gruppi di grassi e proteine hanno un contenuto di AGEs più elevato potrebbe essere spiegato dal rilascio, a livelli elevati, di radicali liberi a seguito di varie reazioni di lipoossidazione durante il processo di cottura. Mentre nei vegetali, nella frutta e nei cereali l'elevato contenuto di acqua, vitamine antiossidanti e sostanze fitochimiche previene la formazione degli AGEs. Oltre alla composizione degli alimenti, la cottura o il trattamento termico sono i principali responsabili della formazione di nuovi AGEs negli alimenti. La cottura, descritta come il trasferimento di energia da una fonte di calore al cibo, viene utilizzata soprattutto per ragioni di sicurezza e convenienza, nonché per migliorare le caratteristiche sensoriali degli alimenti, tra cui sapore, consistenza, colore e aspetto. I diversi metodi di cottura casalinga riflettono i modi in cui viene aumentata la temperatura degli alimenti. Le procedure di cottura a secco e a umido o di frittura sono le tecniche di trattamento termico e i metodi di cottura più comunemente utilizzati. Nella cottura a secco, che comprende la cottura al forno, la tostatura, la grigliatura e la cottura a microonde, l'alimento è esposto direttamente al calore senza un mezzo di trasferimento termico come l'acqua o l'olio. Mentre nei metodi di cottura a umido, come la bollitura, la cottura in camicia, la stufatura, la brasatura e la cottura a vapore, si utilizza un mezzo di trasferimento liquido, tra cui l'acqua e il latte e nella cottura a microonde l'energia viene trasferita tramite radiazioni elettromagnetiche con una lunghezza d'onda tipica di 300 mm. Nel processo di frittura, invece, il calore interessa in primo luogo l'olio, che subisce elevate

temperature, e l'alimento utilizza proprio il calore derivante da quest'ultimo per cuocersi; di conseguenza, l'interazione tra l'olio di frittura caldo e l'alimento è direttamente responsabile della formazione di AGEs ed il motivo deriva da una maggiore ossidazione dei lipidi dovuta al maggiore effetto termico durante la frittura. In sintesi, la cottura alla griglia (a 225°C) e la frittura (a 177°C) causano livelli più alti di formazione di AGEs, seguiti dalla tostatura (a 177°C) e dall'ebollizione (a 100°C). Nonostante gli effetti desiderabili della cottura in termini di sicurezza alimentare e di miglioramento delle caratteristiche sensoriali e del valore nutrizionale, la cottura potrebbe essere dunque responsabile della formazione di AGEs.

5.4 Metodi analitici per caratterizzare i dAGEs

5.4.1 Pre trattamento dei campioni

Gli alimenti sono matrici complesse che contengono vari componenti coinvolti direttamente nella formazione degli AGEs. A tal proposito, prima di effettuare un'analisi, per quanto possibile, accurata, devono essere applicati metodi di pre trattamento adeguati. Poiché gli AGEs esistono sia allo stato libero che allo stato legato a proteine/peptidi negli alimenti, per rilevare gli AGEs in forma libera, i campioni vengono solitamente sottoposti a precipitazione proteica, a rimozione dei grassi ed estrazione in fase solida per separare e concentrare il contenuto degli AGEs d'interesse. Gli AGEs, inoltre, sono composti polari con una solubilità desiderabile in acqua e per la loro estrazione dai campioni di cibo, vengono utilizzati solventi come acetone, metanolo, acetonitrile e acqua acida. Per gli AGEs in forma legata, invece, l'idrolisi acida e la digestione enzimatica sono due metodi usati per liberare gli AGEs dagli addotti legati a peptidi/proteine. Mentre nell'idrolisi acida, viene inizialmente aggiunto il bromidruro di sodio (NaBH₄) per prevenire la conversione della fruttosillisina (FL) in carbossimetillisina (CML) durante l'idrolisi, per poi procedere a precipitare e idrolizzare la frazione proteica con HCl 6 M a 110°C per 20-24 ore, per quanto riguarda invece la digestione enzimatica, le proteasi comunemente utilizzate per ottenere un'idrolisi esaustiva delle proteine, sono proteasi con specificità diverse, come la pepsina, la pronasi E e l'aminopeptidasi.

5.4.2 Metodi analitici- identificazione, quantificazione e caratterizzazione

Dopo un adeguato trattamento dei campioni di cibo, i metodi analitici più comunemente usati possono essere divisi in due gruppi principali: metodi strumentali che includono la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) dotata di rivelatore a matrice di diodi (HPLC-DAD), cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelatore a fluorescenza (FLD), cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelazione UV (HPLC-UV), cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), cromatografia liquida ultra-performante accoppiata

alla spettrometria tandem (UPLC-MS/MS) e la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) e metodi immunologici come il saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) basato sull'uso di anticorpi per diversi AGEs. A causa delle differenze nelle strutture chimiche, alcuni AGE mostrano un assorbimento UV (ad esempio, la pirralina) e un'intensità di fluorescenza (ad esempio, la pentosidina) mentre alcuni come la carbossimetilisina (CML) e la N ϵ -(carbossietil)-lisina (CEL), non mostrano tali caratteristiche. Tuttavia, l'HPLC-DAD può essere utilizzato per quantificare gli AGEs sensibili ai raggi UV e l'HPLC-FLD è adatto per analizzare AGEs fluorescenti o non fluorescenti, dopo la derivatizzazione, processo tramite cui, con delle reazioni chimiche, vengono sostituiti gruppi funzionali di molecole, con ftalaldeide. In comparazione, LC-MS/MS e UPLC-MS/MS forniscono un'elevata sensibilità senza alcun passaggio di derivatizzazione e quindi sono ampiamente usati nella quantificazione degli AGEs nei campioni alimentari e biologici. D'altra parte, il metodo ELISA è stato sviluppato per la quantificazione dei dAGEs, come CML e MG-derivati, utilizzando anticorpi monoclonali specifici.

Tuttavia, ci sono alcuni limiti di tali metodi nella determinazione degli AGEs dietetici. Ad esempio, la determinazione degli AGEs con il metodo ELISA fornisce solo risultati semi-quantitativi e, pertanto, è essenziale considerare una possibile reattività crociata degli anticorpi impiegati. In aggiunta, il metodo ELISA dovrebbe essere convalidato per ciascuna matrice alimentare. Se questa fase di convalida dovesse mancare, i risultati del test sarebbero parzialmente fuorvianti. Nel metodo HPLC-DAD invece sono necessari composti attivi UV e non tutte le strutture chimiche degli AGEs presentano questa caratteristica. Studi GC-MS, HPLC-UV o LC-MC riportano tuttavia i risultati attraverso la misurazione della molecola più rappresentativa degli AGEs, ossia la carbossimetilisina (CML), o come contenuto di AGE di un solo prodotto/categoria alimentare. Al contrario, UPLC-MS/MS ha la capacità di analizzare più di un composto AGE. Inoltre, le differenze nell'esprimere i risultati in termini di unità rendono difficile il confronto dei dati. Ad esempio, mentre i risultati ELISA sono espressi come AGE kilounità/100 g di cibo, i risultati LC-MS/MS sono espressi come concentrazioni, come mg/kg di proteine o mg/kg di cibo. La **tabella 2** riassume le varie tecniche di analisi maggiormente utilizzate e i relativi vantaggi/svantaggi.

In questo contesto, nuove tecniche di rilevazione innovative stanno, piano piano, prendendo sempre più piede per la caratterizzazione dei dAGEs. La stampa molecolare è una strategia promettente per la rilevazione altamente selettiva e sensibile di composti target. Il polimero a impronta molecolare (MIP) mostra una maggiore affinità per la molecola modello rispetto agli altri composti correlati alla struttura. Sintetizzando un MIP a impronta CML basato su punti quantici idrofobici CdSe/ZnS, Liu, Wu, Zhou, Wang e Sun (2016) e Liu, Chen, Mu, Wang e Sun (2016), hanno determinato il contenuto di CML nei prodotti lattiero-caseari e i risultati hanno mostrato una buona accuratezza e riproducibilità, come convalidato da HPLC-MS. Gli optosensori sono poco costosi e facili da preparare, quindi aprono la possibilità di una quantificazione semplice, veloce, selettiva e sensibile degli AGEs negli alimenti. D'altra parte, i metodi proteomici e peptidomici consentono una caratterizzazione sistematica delle proteine glicate. Con l'aiuto di strumenti bioinformatici, è possibile determinare non solo l'estensione delle strutture glicate, ma anche i corrispondenti siti di modificazione. In uno studio precedente, l'LC-MS/MS senza etichettatura delle proteine, è stata

applicata alle arachidi processate per analizzare le strutture di AGEs coinvolte nella lisina. Allo stesso modo, alcuni studi hanno applicato la proteomica non mirata per esplorare le modificazioni proteiche indotte dal calore in un sistema modello di β -lattoglobulina-lattosio. Le tecniche di profilazione non mirate sono molto interessanti per l'assegnazione sito-specifica delle modificazioni indotte dagli AGEs, che potrebbero essere utilizzate per valutare gli aspetti nutrizionali e antigenici degli alimenti trattati termicamente.

Pertanto, per determinare la quantità di AGEs negli alimenti, la maggior parte degli studi esistenti hanno utilizzato questa varietà di metodi analitici differenti e, ad oggi, non esiste ancora un metodo comune per determinare il contenuto di AGE nei prodotti alimentari; ciò comporta differenze nei risultati degli studi e l'impossibilità di confrontarli correttamente.

Tabella 2. Pro e contro dei comuni metodi analitici per la caratterizzazione dei dAGEs.

(Zhang *et al*, 2020)

Tecniche	AGEs rilevati	Vantaggi	Svantaggi
HPLC-DAD	AGEs UV-attivi o derivati	Basso costo; Operazione facile; Sensibile ai targets	Derivatizzazione AGEs UV inattivi; Applicazione limitate;
HPLC-FLD	AGEs fluorescenti o derivati	Basso costo; Operazione facile; sensibile ai targets	Derivatizzazione di AGEs non fluorescenti; Applicazione limitata; Mancanza di specificità;
GC-MS	CML, CEL	Operazione facile; Acquisizione dati velocemente;	Derivatizzazione di AGEs; Applicazione limitata;
LC-MS/MS	AGEs comuni	Elevata sensibilità; No derivatizzazione;	Preparazione campione complesso; Personale altamente formato; Grandi quantità di reagente consumato;
UPLC-MS/MS	AGEs comuni	Elevata sensibilità; No derivatizzazione; Tempo di analisi breve;	Costosa; Preparazione campione complesso; Personale altamente formato;
ELISA	CML, pentosidina, derivati del metilglossale (MG)	Veloce e conveniente; Elevata sensibilità e specificità; Largo impiego;	Necessità di specifici anticorpi; Reattività crociata con altri composti; Dati in unità non comparabili con tecniche strumentali; Effetti suscettibili della matrice;

5.5. Contenuto dei dAGEs negli alimenti processati

Diversi studi sono stati dedicati a confrontare il contenuto di AGEs in una vasta gamma di prodotti alimentari, compresi quelli lavorati industrialmente e quelli preparati in casa. Al momento non esistono database che descrivono in modo univoco, chiaro e condiviso il contenuto di AGEs negli alimenti per la difficoltà di studiare tutti gli alimenti preparati con tutte le possibili modalità di cottura e per la mancanza di uniformità nei metodi di misura. In letteratura usualmente quando si parla degli AGEs contenuti nei cibi ci si riferisce ad un database iniziale comprendente 239 alimenti formulato nel 2004 da Golberg e coll. e ad uno prodotto da Ubarri et al. stilato nel 2010. In quest'ultima classificazione (in cui si sono studiati 549 alimenti scelti sulla base del loro consumo nella popolazione di New York sottoposti a varie modalità di cottura), i campioni alimentari sono stati omogeneizzati e testati per il contenuto di AGEs con test immuno-enzimatico su un anticorpo monoclonale anti-CML. Il contenuto di AGEs di ogni alimento è derivato dal valore medio di almeno tre misurazioni per campione ed espresso come AGE kilounits/100 g di cibo. Analizzando i principali macronutrienti è stato osservato che i cibi contenenti grassi o proteine animali contengono da 12 a 30 volte maggiori quantità di dAGEs rispetto agli idrati di carbonio. I più alti livelli di AGEs sono stati osservati nel settore delle carni e dei formaggi seguiti dal pollame, dalla carne di maiale, dal pesce e dalle uova. È interessante notare che, gli alimenti di origine animale, anche crudi, come i formaggi, possono contenere grandi quantità di dAGEs probabilmente perché con i processi di pastorizzazione o di invecchiamento le reazioni di glicazione-ossidazione continuano a verificarsi nel tempo anche a temperatura ambiente, sebbene più lentamente. Il più alto livello AGEs per grammo di carboidrati è stato trovato negli alimenti trasformati col calore secco come crackers, biscotti, patatine, etc. sia per l'aggiunta di ingredienti contenenti acidi grassi che per effetto della temperatura. Nel 2012 è stato pubblicato un altro elenco di alimenti in cui il contenuto di CML di 257 alimenti è stato rilevato mediante UPLC-MS/MS. Sulla base di questo metodo analitico, i cereali presentano il contenuto più elevato di CML e frutta e verdura quello più basso. Un altro database disponibile include il contenuto di CML, CEL e MG-H1. La frazione proteica di 190 alimenti è stata analizzata con il metodo UPLC-MS/MS, che consente di rilevare CML, CEL e MG-H1 in un'unica analisi. In generale, il contenuto di CML era paragonabile a quello di CEL negli alimenti, mentre il contenuto di MG-H1 era costantemente più alto rispetto alla CML e alla CEL. Le quantità più elevate di CML e CEL erano pari a 5-7 mg/100 g di alimenti (burro di arachidi, cioccolato a scaglie, sanguinaccio), mentre 63 mg di MG-H1/100 g (sanguinaccio) sono stati i massimi misurati negli alimenti selezionati. Tuttavia, in base a questo database, le carni in scatola e i prodotti a base di noci o cereali lavorati ad alte temperature avevano il contenuto di AGE più alto e il burro, il caffè, la frutta e la verdura quello più basso. In tutte le banche dati si concorda sul fatto che il contenuto di AGE di frutta e verdura risulta del tutto trascurabile. Attualmente, il database AGE di Goldberg et al./Uribarri et al. è il database più frequentemente utilizzato per calcolare l'assunzione di AGEs con la dieta. Tuttavia, per alcuni alimenti vi è una sovrastima o una sottostima del loro contenuto, per cui occorre prestare attenzione a determinare il contenuto di AGEs della dieta solo su questa base. Inoltre, il database fa riferimento all'analisi CML di 549 alimenti e, come dimostrato, ad esempio,

analizzando altri AGE come CEL e MG-H1 in parallelo al CML, la quantità dei singoli prodotti varia negli alimenti. La **Figura 7** mostra i livelli di AGEs in alcuni prodotti alimentari prodotti industrialmente e alimenti fatti in casa, i quali sono stati suddivisi per categorie alimentari: latticini, carne, pesce, cereali, pane, prodotti da forno, bevande, snacks, prodotti dolciari, condimenti e grassi. La carbossimetillisina (CML), il marcatore più rappresentativo di AGE, è stato utilizzato per il confronto tra le diverse categorie. Prodotti a base di cereali e snack contengono il più alto livello di CML (fino a 1003,8 mg/kg di proteine) in contrasto con quello nella carne (210,1 mg/kg di proteine), nei latticini (205 mg/kg di proteine), nelle verdure e nella frutta (76,7 mg/kg di proteine). Allo stesso modo, altri studi hanno determinato il contenuto di CML e di altri AGEs ed è stato notato che le noci e i cereali lavorati a caldo e, più in generale, i prodotti alimentari commerciali ricchi di grassi e carboidrati avevano anch'essi valori elevati di CML. Pertanto, una dieta in stile occidentale ricca di grassi, di carni lavorate, di snacks, di dolci e cereali raffinati fornisce certamente un livello più elevato di dAGEs, in confronto a una dieta di tipo mediterraneo, caratterizzata prevalentemente da cibi a base vegetale con meno grassi saturi e cotture elevate/grasse. Tuttavia, non esistono ancora ricerche affidabili che raccomandino il quantitativo di assunzione giornaliera di AGEs per un individuo sano e oltre alla CML, dovrebbero essere considerati anche altri AGEs che si presentano come prodotti principali in specifici alimenti, per evitare di sottostimare il livello di dAGEs.



¹ Reported as CML content (mg/kg protein). ² Results were transferred using the protein content of food of interest searched in the USDA FoodData Central.

³ Results were presented as the mean value reported in the indicated reference.

⁴ Reported as kJ/4 w, thus not comparable with the other data tabulated.

Abbreviations: AH, acid hydrolysis; ED, enzymatic digestion; NA, not-available; UHT, ultrahigh-temperature.

Figura 7. Contenuto di AGE in alimenti selezionati prodotti in fabbrica e fatti in casa. I colori nel quadrato presentano i livelli di AGE riferiti alla barra della scala.

AH, idrolisi acida; ED, digestione enzimatica; NA, non disponibile; UHT, altissima temperatura (Zhang et al, 2020)

5.5.1 Contenuto dei prodotti finali di glicazione avanzata nella carne e nei suoi sostituti

Carne, pollame e pesce sono i gruppi di alimenti per i quali sono stati analizzati maggiormente i contenuti di AGEs. Anche gli effetti sulla formazione di AGE dei diversi metodi di cottura e le tecniche di preparazione utilizzati per la carne e i suoi sostituti sono stati esaminati da diversi gruppi di ricerca. Nel caso della carne macinata, ad esempio, l'effetto della macinatura può aumentare l'ossidazione dei lipidi e delle proteine, i cui prodotti possono di conseguenza trasformarsi in intermedi carbonilici, come risultato della maggiore esposizione all'aria, che svolge un ruolo nella formazione degli AGEs insieme al calore. Uno studio sulla carne, ha sottoposto i campioni all'esposizione di sette temperature diverse (65, 70, 75, 80, 85, 90 e 100°C) e ha dimostrato che la quantità di CML nella carne macinata è aumentata costantemente all'aumentare della temperatura. Inoltre, i campioni cotti ad alte temperature contenevano più CML quando venivano applicati gli stessi periodi di cottura a temperature diverse. Per esempio, la cottura a 65°C per 60 minuti ha provocato un aumento del contenuto di CML del 50%; la cottura a 75°C ha aumentato del 154%, quella a 85°C del 263% e quella a 100°C del 361% con lo stesso tempo di cottura. Un altro studio volto a determinare il contenuto di AGE nei diversi tipi di carne utilizzando un metodo HPLC, ha analizzato i campioni di carni sottoposti a metodi di cottura diversi: la frittura, la cottura alla griglia e la cottura al forno fino al raggiungimento di una certa temperatura all'interno delle carni (71°C per il manzo e il maiale, 74°C per il pollo). I campioni sono stati prelevati sia dalla parte interna che da quella esterna delle carni e sono stati analizzati i contenuti di AGEs. Nelle parti interne delle carni fritte non è stata riscontrata alcuna differenza significativa. Tuttavia, i contenuti di AGE nelle parti esterne delle carni hanno mostrato differenze significative con un contenuto di AGEs superiore. Una spiegazione alla base di questa differenza potrebbe essere data dal fatto che i precursori idrosolubili vengono trasferiti alle parti più esterne delle carni durante il periodo di cottura con conseguente formazione di AGEs. Inoltre, è stato osservato che in tutte le categorie di alimenti, gli alimenti esposti alle alte temperature e bassa umidità contenevano più AGEs rispetto a quelli preparati a basse temperature o ad alta umidità. Per questo motivo, è stata osservata una maggiore formazione di AGEs nei metodi di cottura di frittura, cottura alla griglia e arrosto, rispetto ai metodi di cottura di bollitura, cottura in camicia, cottura in umido e cottura al vapore. Uno studio interessante ha mostrato anche una relazione tra il contenuto di macronutrienti negli alimenti e la formazione di AGEs. In particolare, sono stati analizzati i contenuti di AGEs, in particolare AGEs simili a CML, in 250 alimenti utilizzando il metodo ELISA. A questo scopo, sono stati categorizzati gli alimenti in tre gruppi quali grassi, proteine e carboidrati in base al contenuto di questi macronutrienti. È stato rilevato che i cibi appartenenti alla categoria dei grassi avevano livelli di AGEs più elevati con una media di 100 kU/g, mentre il gruppo proteico comprendente carne e sostituti della carne aveva un contenuto di AGE con una media di 43 kU/g. Il gruppo di carboidrati, invece, presentava il contenuto

di AGE più basso, con una media di 3,4 kU/g. Sulla base di questi risultati, si può affermare dunque che esiste una relazione tra la composizione dei macronutrienti e il contenuto di AGEs di un alimento. Il motivo per cui i gruppi di grassi e proteine hanno un contenuto di AGEs più elevato potrebbe essere spiegato dal rilascio elevato di radicali liberi a seguito di varie reazioni di lipoossidazione che avvengono durante il processo di cottura. Ad ogni modo, i contenuti di AGE rilevati in tutte le categorie di alimenti sono stati associati alla temperatura di cottura, al periodo di cottura e alla presenza di umidità.

5.5.2 Contenuto dei prodotti finali di glicazione avanzata nel pane

Analizzando il contenuto di AGEs nei prodotti panificati, in particolare nella crosta e nella mollica di pane bianco e di pane integrale cotti entrambi al forno, è interessante notare come il contenuto di carbossimetil lisina (CML) risulti essere nettamente superiore nella crosta in entrambi i tipi di pane (*Figura 7*). Durante la cottura del pane, infatti, la temperatura superficiale dell'impasto può raggiungere i 230-250°C, il che provoca la formazione della crosta del pane e l'evaporazione dell'acqua in superficie. In questo modo, la combinazione di umidità ridotta e la temperatura elevata facilita la formazione della reazione di Maillard sulla superficie. D'altra parte, la temperatura interna del pane è quasi a 100°C e l'umidità è maggiore rispetto alla superficie. Questo fa sì che la mollica del pane abbia livelli di CML dieci volte più bassi, se confrontata con la crosta del pane. Uno studio interessante si è proposto di analizzare tipi di pane che contenevano composti fenolici come catechina, quercetina, acido gallico, ferulico e caffeico, cotti a 180°C per 20 minuti, con l'obiettivo di determinare l'attività antiglicazione dei composti fenolici; è stato dimostrato che i composti fenolici hanno ridotto significativamente il contenuto di CML (56 %) anche alle concentrazioni più basse, escluso l'acido ferulico. Tuttavia, la maggiore riduzione dei livelli di CML è stata ottenuta nei tipi di pane che contenevano catechina, grazie alla sua relazione struttura-attività antiossidante, alla sua stabilità termica e alla sua reattività con le catene laterali di ϵ -lisina. Un altro studio, invece, ha determinato l'impatto della formazione di AGEs nella crosta di un tipo di pane al quale è stato aggiunto nell'impasto la naringenina, un comune flavanone. È stato mostrato che il contenuto di naringenina ha decisamente inibito la formazione di CML e la quantità totale di AGEs fluorescenti. In accordo con questo studio, altri autori hanno scoperto anche che l'incorporazione del flavonoide quercetina nel pane cotto a vapore inibisce la formazione di AGEs fluorescenti.

5.5.3 Contenuto dei prodotti finali di glicazione avanzata nei prodotti di pasticceria

Alcuni autori hanno determinato il contenuto di AGE (CML, CEL e metilgliosale derivato dall'idroimidazolone (MG-H1) come importante AGE della lisina e dell'arginina) di biscotti che sono stati cotti in un forno di laboratorio per 10 minuti a 175°C. I biscotti contenenti fruttosio, glucosio, miele e banana presentavano contenuti di MG-H1 simili. Questi risultati hanno mostrato che non

c'è stata una differenza significativa tra glucosio e fruttosio per quanto riguarda la formazione di CML durante il processo di cottura. Ciò potrebbe essere spiegato dalla simile degradazione a CML sia della fruttosilisina che della glucosilisina. Tuttavia, in contrapposizione al contenuto di CML, i biscotti con il più alto contenuto di fruttosio avevano le più alte concentrazioni di MG-H1 e CEL e la loro formazione dal fruttosio potrebbe essere un indicatore di come questi indicatori si siano generati attraverso la "via del fruttosio" della reazione di Maillard. Altri autori, invece, hanno valutato gli effetti inibitori dell'estratto di crusca d'orzo, che contiene diversi acidi fenolici, come l'acido caffeico, siringico, p-cumarico, ferulico e sinapico, sui livelli di AGE che si formano durante la cottura e hanno dimostrato che l'estratto di crusca d'orzo può potenzialmente controllare la formazione di AGE durante la lavorazione degli alimenti, il che è stato in gran parte attribuito alle sue attività antiossidanti e alle capacità di rimozione dei radicali. Sono stati confrontati, inoltre, modelli di torta che contenevano differenti tipi di zucchero, tra cui glucosio e fruttosio e sono stati analizzati i contenuti di CML e CEL. È emerso un livello di CML più elevato nella torta con glucosio rispetto a quella con fruttosio e ciò potrebbe potenzialmente essere spiegato dal fatto che l'ossidazione del glucosio abbia generato più glicosale rispetto all'ossidazione del fruttosio. Pertanto, è stato riscontrato che la CEL era più alta nei dolci cotti con fruttosio, seguiti da glucosio, dal saccarosio raffinato e dal saccarosio non raffinato, come dimostrazione del fatto che l'ossidazione del fruttosio ha prodotto una maggiore quantità di metilglicosale, noto come composto carbonilico più reattivo rispetto al glucosio.

5.5.4. Contenuto dei prodotti finali di glicazione avanzata nel grano e nei legumi

Confrontando i valori di CML di pasta e riso bollito, emerge chiaramente che il contenuto di AGEs nella pasta (22.6 mg/kg di proteine) risulta essere superiore rispetto al riso (4.8 mg/kg di proteine). Uno studio ha anche dimostrato che la pasta cotta per 8 minuti aveva un contenuto di CML inferiore (112 CML kU/100 g) rispetto alla pasta cotta per 12 minuti (242 CML kU/100 g). In linea con questo studio, emerge tuttavia che il riso fritto presenta un contenuto maggiore di CML rispetto al semplice riso bollito. Per quanto riguarda i legumi, è stato dimostrato che i fagioli rossi cotti per un'ora avevano un contenuto di CML quasi tra volte maggiore rispetto ai fagioli rossi crudi.

5.5.5 Contenuto dei prodotti finali della glicazione avanzata nelle verdure e nella frutta

In letteratura esistono prove limitate sul contenuto di AGE di frutta e verdura. Tuttavia è emerso che frutta come banana e arance presentano un contenuto di CML maggiore rispetto alle mele e probabilmente il motivo può essere ricercato dal maggior contenuto di glucidi in questa tipologia di frutta.

5.5.6 *Contenuto dei prodotti finali della glicazione avanzata nella frutta secca*

È stato osservato che la tostatura delle mandorle a diverse temperature ha aumentato significativamente la formazione di CML, CEL e pirralina. Uno studio ha analizzato le quantità di AGEs liberi e AGEs legati nelle mandorle utilizzando la LC-MS/MS, sottoponendole a sei diversi gradi di temperatura (129, 138, 146, 154, 168 e 182°C) per periodi diversi. Mentre CML e CEL sono stati rilevati nelle mandorle crude, la pirralina non è stata rilevata. Tuttavia, è stata rilevata in tutte le mandorle tostate. CML e CEL possono verificarsi, non solo con la reazione di Maillard ma anche tramite l'ossidazione dei lipidi. Le mandorle sono tipicamente conservate a temperature inferiori a 35°C nel periodo di raccolta fino a quando l'umidità dei semi di mandorla raggiunge il 5-8%. Per questo motivo, le quantità di CML e CEL delle mandorle crude, che sono ricche di grassi, possono derivare proprio dall'ossidazione di quest'ultimi. La pirralina, il principale prodotto della reazione di Maillard, è costituita da lisina e 3-deossiglucosuloso. La reazione di Maillard richiede in genere una temperatura elevata e una bassa umidità affinché avvenga. Questa situazione spiega perché la pirralina è presente solo nei campioni di mandorle tostate. Tuttavia, non è stata riscontrata una correlazione significativa tra gli AGEs e la temperatura di tostatura.

5.6 **Metabolismo in vivo dei dAGEs**

I cambiamenti strutturali che gli AGEs generano tramite coniugazione covalente sono strettamente correlati alla digeribilità e alla biodisponibilità delle proteine glicate. In uno studio che ha preso in considerazione le modificazioni causate dagli AGEs delle proteine derivate dal latte, ha dimostrato che in presenza di composti α -dicarbonilici, la digeribilità in vitro di β -caseina, β -lattoglobulina e sieralbumina bovina (BSA), è stata ridotta, sia in fase gastrica che in fase intestinale. I composti α -dicarbonilici sono precursori comuni degli AGEs reticolati, per esempio MOLD e GOLD, ma anche di quelli non reticolati, come CML e CEL. Le strutture di glicazione reticolate presentano catene peptidiche consolidate con ridotta flessibilità, ostacolando così le azioni degli enzimi digestivi attraverso il blocco dei siti di scissione o attraverso un ingombro sterico. Per quanto riguarda gli AGEs non reticolati, è stato notato che la β -caseina e la β -lattoglobulina derivate da CML, hanno mostrato una resistenza all'idrolisi enzimatica. Allo stesso modo, anche la modificazione strutturale indotta da pirralina ha diminuito la digeribilità di entrambe le proteine durante la digestione. La glicazione con AGEs non reticolati ha bloccato i residui di lisina e arginina riducendo la loro suscettibilità alle proteasi nel tratto gastrointestinale. Tuttavia, per convalidare ulteriormente questi risultati preliminari dovrebbero essere presi in considerazione studi sul comportamento digestivo delle proteine modificate dagli AGEs di altri alimenti trasformati oltre che del latte.

I primi studi inerenti all'assorbimento degli AGEs hanno indicato che, dopo la somministrazione orale, solo il 10-30% di composti, quali CML, CEL, pentosidina e pirralina, viene assorbito nella circolazione sistemica. Gli AGEs possono esistere sia in forma libera, come un singolo amminoacido o un peptide libero a basso peso molecolare (LMW, <5 kDa), sia legati alle proteine, formando

composti ad alto peso molecolare (HMW). È stato osservato che l'assorbimento degli AGEs come singoli amminoacidi o dipeptidi avviene in modo più efficiente rispetto agli AGEs legati alle proteine. La CML libera può essere assorbita per semplice diffusione, mentre si ritiene che l'assorbimento intestinale della pirralina avvenga principalmente come dipeptide, piuttosto che come aminoacido libero, attraverso l'epitelio intestinale grazie al trasportatore peptidico 1 (PEPT1). Ulteriori ricerche hanno identificato che PEPT1 è utilizzato anche per l'assorbimento di CML, CEL e MG H1 in forma di dipeptidi. Le modifiche delle proteine da parte degli AGEs riduce significativamente la loro digeribilità, limitando così la loro capacità di subire la digestione proteolitica. Poiché le proteine ad alto peso molecolare (HMW) richiedono una digestione proteolitica prima dell'assorbimento, le frazioni a basso peso molecolare (LMW) degli AGEs hanno maggiori probabilità di essere assorbite, mentre gli AGEs non assorbiti attraversano il tratto gastrointestinale e vengono escreti nelle feci. In modelli di roditori esposti a livelli di CML legati alle proteine e derivati dalla dieta, è stato osservato un accumulo di concentrazioni di AGEs in tutto il corpo, compresi organi, tessuti (tranne tessuto adiposo), siero, urina e feci. Gli organi principali colpiti erano reni e polmoni, seguiti da cuore e fegato. Analogamente, un'assunzione a lungo termine di livelli elevati di CML libero ha favorito il contenuto di CML legato alle proteine nei ratti, soprattutto nei reni, nel cuore, nel fegato, nei polmoni e nel muscolo. In relazione a ciò, si ipotizza che gli AGE LMW possano essere prontamente assorbiti ed eliminati dai reni con emivita più brevi, avendo quindi meno possibilità di interagire con le proteine funzionali. Invece, gli AGEs legati ai peptidi derivanti dalla digestione degli AGE HMW, hanno una maggiore affinità per le proteine e possono facilmente formare complessi legati covalentemente all'interno di organi e tessuti. Ciò è supportato da un precedente studio in cui venivano somministrate a persone diete alimentari ben definite; è stato evidenziato come l'ingestione di alimenti ad alto contenuto di pirralina libera e di pentosidina (infuso di caffè) ha portato al recupero di questi AGEs nelle urine rispettivamente del 50% e del 60%; mentre quando si consumavano alimenti ricchi di pentosidina HMW (prodotti da forno), solo il 2% della quantità ingerita veniva escreti nelle urine.

Studi cinetici su ratti sani hanno mostrato che circa il 10% dei dAGEs viene assorbito tramite il tratto gastrointestinale. La principale via di eliminazione dei dAGEs è il rene, per filtrazione o per assorbimento, due processi che determinano l'escrezione degli AGEs nell'urina (solo un terzo). L'aumento dell'assorbimento dei dAGEs o la riduzione della clearance renale, possono potenzialmente portare all'accumulo di AGEs a livello pre-renale e causare stress ossidativo, anche nei tessuti extra renali. È stato stimato che i due terzi dei dAGEs rimangono in contatto con i tessuti per 72h e che questa permanenza risulta essere maggiore di quella prodotta dagli AGEs endogeni. Esiste una forte correlazione tra l'assunzione di CML con la dieta e l'escrezione fecale, il che suggerisce una possibile interazione tra gli AGEs e il microbioma del colon. Il 20%-50% del CML ingerito sembra essere escreti nelle feci e ciò suggerisce che esiste una percentuale di AGEs ingeriti che non viene assorbita né defecata e può essere metabolizzata a livello intraluminale dal microbioma. L'effetto dell'esposizione prolungata ai dAGEs è stato valutato in una serie di studi sui topi e hanno mostrato che i dAGEs assorbiti, contribuiscono all'omeostasi totale degli AGEs e sono implicati nella patogenesi di varie malattie e le loro complicazioni, in modo simile a quelli formati

endogenamente. Studi esistenti hanno utilizzato la somministrazione parenterale di miscele di AGEs o diete ad alto contenuto di AGEs (H-AGEs, >15.000 kU AGEs) e diete a basso contenuto di AGEs (L-AGEs, <15.000 kU AGEs). Entrambe le diete erano equivalenti da un punto di vista nutrizionale. La dieta H-AGEs, come da procedura standard, è stata sottoposta a calore mediante un ciclo in autoclave e arricchita di integratori per compensare i micronutrienti persi con le alte temperature. La dieta L-AGEs, invece, è stata preparata senza esposizione al calore. Le diete, dunque, differivano solo per il contenuto di AGEs (3-5 volte inferiore nella dieta L-AGEs), sulla base di una valutazione diretta degli AGEs mediante test immunochimico ELISA. I dati degli studi sugli animali sono stati ulteriormente confermati da studi clinici che hanno utilizzato diete con diverse quantità di AGEs basandosi su un ampio database di cibi diversi. Hanno mostrato che un'assunzione significativamente ridotta di dAGEs è stata ottenuta aumentando il consumo di pesce, legumi, prodotti lattiero-caseari a basso contenuto di grassi, verdure, frutta e cereali integrali, riducendo così l'assunzione di grassi solidi, carni grasse, latticini interi e prodotti altamente trasformati. Sulla base di questo database, numerosi studi clinici hanno utilizzato la dieta H-AGEs e la dieta L-AGEs in soggetti con diverse patologie, come insulino-resistenza, diabete mellito, malattie renali croniche, invecchiamento e obesità, dimostrando che, una ridotta assunzione di dAGEs, migliora la loro patogenesi e le complicazioni correlate. Tuttavia, a causa dell'uso limitato di ricerche di biopsia in studi clinici, le conoscenze sulla ritenzione sito-specifica dei dAGEs assorbiti nel corpo umano sono ancora scarse. Si riconosce, inoltre, che la conoscenza dei meccanismi specifici di assorbimento, di distribuzione e di escrezione degli AGEs alimentari è ancora limitata e sono necessari ulteriori studi per chiarirli. (Figura 8)

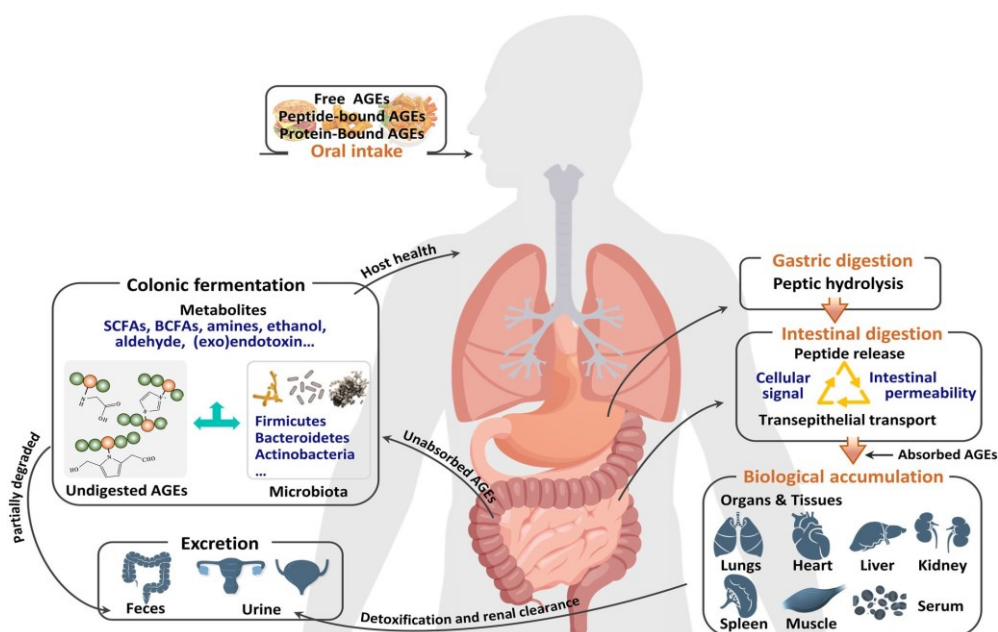


Figura 8. Percorsi suggeriti sui destini metabolici dei dAGEs in seguito a somministrazione orale. SCFA, acidi grassi a catena corta; BCFA, acidi grassi a catena ramificata. (Zhang et al, 2020)

Capitolo 6. Gli effetti dei dAGEs sulla salute umana

C'è una crescente evidenza dell'impatto degli AGEs sulla salute metabolica. Infatti, oltre a giocare un ruolo fondamentale nelle complicazioni diabetiche, comprese le malattie cardiovascolari, renali e neurodegenerative, come l'Alzheimer e il Parkinson, gli AGEs sono anche implicati nella patogenesi dell'insulino-resistenza e del diabete mellito di tipo 2 (TDM2), nonché dell'obesità. Recenti studi attribuiscono agli AGEs un ruolo patogenetico anche nelle allergie alimentari per le modifiche epitopiche alle proteine che possono verificarsi, nell'invecchiamento e nella modulazione della microflora batterica.

6.1 Insulino-resistenza e diabete mellito di tipo 2

Il TDM2 è un disordine metabolico che rappresenta il 90% dei casi di diabete nel mondo, con il restante 10% dovuto principalmente al diabete mellito tipo 1 e al diabete gestazionale. È caratterizzato da livelli di glucosio circolanti cronicamente elevati che derivano da uno stato di resistenza all'insulina e da una disfunzione delle cellule beta pancreatiche. La resistenza all'insulina è il segno distintivo del T2DM e viene descritto come una diminuzione della capacità delle cellule di rispondere all'azione dell'insulina. Ciò si traduce in un'alterazione dell'assorbimento del glucosio e sintesi di glicogeno nel muscolo scheletrico, aumento della produzione epatica di glucosio e diminuzione della sintesi del glicogeno nel fegato, inibizione dell'assorbimento del glucosio e aumento della lipolisi nel tessuto adiposo e controllo alterato dell'omeostasi periferica del glucosio da parte del cervello. Sebbene l'insulino-resistenza sia inizialmente contrastata da una ipersecrezione compensatoria di insulina da parte del pancreas, quando tale risposta compensatoria viene compromessa, a causa della disfunzione delle cellule beta pancreatiche, si manifesta il T2DM. In questo contesto, gli AGEs possono contribuire a entrambe le caratteristiche patogenetiche del T2DM promuovendo l'infiammazione e lo stress ossidativo nell'uomo. L'infiammazione cronica di basso grado associata all'obesità è stata proposta come uno dei collegamenti meccanici tra AGEs e resistenza all'insulina. L'infiammazione promuove la resistenza all'insulina attivando vie intracellulari che, a loro volta, interferiscono con la via di trasduzione del segnale insulinico. A sostegno della relazione tra AGEs e resistenza all'insulina, è stato dimostrato che gli AGEs sono coinvolti nell'attivazione di due vie di segnale: JNK pathway, classe di proteine appartenenti alla famiglia MAPK (proteina chinasi attivata dal mitogeno), la quale compromette la segnalazione dell'insulina promuovendo la fosforilazione della treonina/serina del substrato del recettore dell'insulina (IRS), e la via di segnalazione I κ B chinasi (IKK)/NF- κ B, che inibisce anch'essa la segnalazione dell'insulina. Tuttavia, oltre all'infiammazione, l'asse AGE-RAGE innesca stress ossidativo, il quale risulta essere associato allo sviluppo della resistenza insulinica. Un ampio corpus di prove sperimentali utilizzando modelli animali, mostrano il legame esistente tra dAGEs e resistenza all'insulina. In questi studi, topi alimentati con una dieta ad alto contenuto di AGEs

contenente metilglicosale-albumina di siero bovino sintetico (MG-BSA) a 1 mg per grammo di dieta, hanno mostrato una diminuzione dell'espressione del recettore dell'insulina, della fosforilazione dell'IRS e una difettosa attivazione a valle di AKT, una proteina citosolica la cui attività consiste nella fosforilazione di vari substrati proteici nei residui serina e treonina, portando spesso alla loro inattivazione, nel muscolo scheletrico, nel tessuto adiposo e nel fegato. Nel muscolo scheletrico, un tessuto fondamentale per il controllo dell'omeostasi del glucosio, gli AGEs down-regolano il recettore GLUT4 e promuovono l'attivazione di vie infiammatorie e stress nel reticolo endoplasmatico. Inoltre, sia nei modelli animali che negli studi sull'uomo è stato dimostrato che l'esposizione ad alti livelli di AGEs alimentari durante lo sviluppo fetale innesca una riprogrammazione metabolica che porta allo sviluppo del T2DM indipendentemente da qualsiasi predisposizione genetica. L'effetto dannoso degli AGEs dietetici sulla segnalazione dell'insulina negli esseri umani è stato anche dimostrato con una dieta "AGE-restricted" per migliorare la sensibilità all'insulina nel T2DM con una normalizzazione dell'espressione di AGER1 e sirtuina 1 e una diminuzione dell'acetilazione del fattore nucleare- κ B (NF- κ B) circolante, fattore attivato dal recettore TNF- α (fattore di necrosi tumorale-alfa), degli AGEs nel siero e della leptina, ormone implicato nella regolazione dell'appetito. Tuttavia, gli AGEs hanno anche un impatto diretto sul metabolismo ossidativo mitocondriale attraverso una down-regulation di sirtuina 1 che, a sua volta, deacetila e attiva il recettore attivato dal proliferatore del perossisoma γ co-attivatore 1 α (PGC 1 α), il principale regolatore del metabolismo ossidativo mitocondriale. PGC 1 α regola il metabolismo energetico mitocondriale e la biogenesi, svolgendo così un ruolo fondamentale nella modulazione della bioenergetica dei mitocondri, la quale è stata segnalata come alterata negli individui affetti da T2DM. Ciò si traduce in un metabolismo ossidativo difettoso e una ridotta capacità di ossidare completamente gli acidi grassi favorendo così l'accumulo intramiocellulare di specie lipidiche lipotossiche e metaboliti derivati dall'ossidazione incompleta degli acidi grassi che ostacolano la segnalazione dell'insulina. È importante sottolineare che PGC 1 α sembra essere determinante in questo processo poiché i geni sotto il suo controllo sono sottoregolati negli individui affetti da T2DM e la sua sovraregolazione ha anche dimostrato di avere effetti di sensibilizzazione all'insulina sia in vitro che nei modelli animali. Pertanto, dato il ruolo degli AGEs nell'interrompere l'espressione di SIRT1 e l'importanza di questa deacetilasi NAD-dipendente nella regolazione della funzione di PGC 1 α , la bioenergetica mitocondriale difettosa può rappresentare un ulteriore meccanismo plausibile che collega l'eccesso di AGEs all'insulino-resistenza. L'impatto degli AGEs sull'insulino-resistenza nell'uomo è stato anche confermato utilizzando le pinze iperinsulinemico-euglicemiche, il gold standard per la valutazione della sensibilità all'insulina, con una dieta a basso contenuto di AGEs che induce un miglioramento della sensibilità all'insulina rispetto a una dieta ricca di AGEs, che invece ne diminuisce la sensibilità. Inoltre, livelli elevati di AGEs circolanti sono associati all'insulino-resistenza e sono correlati a HOMA-IR, un indice utilizzato per valutare l'insulino-resistenza, nei soggetti non diabetici. Nel complesso, le evidenze finora raccolte supportano il ruolo degli AGEs come responsabili degli effetti dannosi della dieta occidentale sulla salute metabolica. In aggiunta, gli AGEs contribuiscono anche alla disfunzione delle cellule beta pancreatiche, un altro componente chiave nella patogenesi di T2DM, esercitando un effetto citotossico su tali cellule e

inducendo apoptosi, la quale può dipendere dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno, i ROS. Gli studi di coltura cellulare hanno dimostrato che il meccanismo molecolare responsabile dello stress ossidativo indotto dagli AGEs si basa su un aumento della produzione mitocondriale di ROS così come l'attivazione di JNK, che a sua volta, attiva NADPH ossidasi, alimentando ulteriormente lo stress ossidativo. In un modello di topo in cui sono state somministrate diverse dosi di AGE-BSA per iniezione intraperitoneale, gli AGEs non solo hanno esercitato un effetto citotossico sulle cellule beta, ma hanno anche compromesso la secrezione di insulina indotta dal glucosio. In generale, la chiusura dei canali K⁺ mediata dall'ATP, la depolarizzazione delle cellule beta, risulta fondamentale nel mediare la secrezione di insulina dalle cellule beta del pancreas. Gli AGEs, inibendo la citocromo ossidasi mitocondriale, compromettono la capacità di sintesi dell'ATP delle cellule beta causando un'alterazione della chiusura dei canali K⁺ indotta dall'ATP, la depolarizzazione delle cellule beta e di conseguenza l'afflusso di Ca²⁺, impedendo così l'esocitosi dei granuli contenenti insulina. Infine, è stato riportato che gli AGEs interferiscono con la secrezione di insulina delle cellule beta bersagliando direttamente la trascrizione dell'insulina con un meccanismo che sembra dipendere dall'inibizione indotta da FOXO-1, un fattore di trascrizione che svolge un ruolo importante nella regolazione della gluconeogenesi e della glicogenolisi mediante la segnalazione dell'insulina, del fattore di trascrizione omeobox pancreatico-duodenale-1.

6.2 Gli effetti dei dAGEs sull'obesità

Gli AGE, oltre al loro ruolo ben documentato nel promuovere la resistenza all'insulina e il T2DM, svolgono anche un ruolo presunto nella patogenesi dell'obesità, indicata dalla loro capacità di indurre un aumento del peso corporeo negli adulti in uno studio di follow-up di 5 anni. È importante sottolineare che la capacità degli AGEs di aumentare il peso corporeo è stata mantenuta dopo aver aggiustato l'apporto energetico totale e altri cofattori, suggerendo che gli AGEs influenzano direttamente il bilancio energetico. Ciò è supportato anche dal profondo impatto che le diete ricche di alimenti altamente trasformati hanno sul peso corporeo aumentando l'apporto energetico. Il bilancio energetico è controllato da un sistema neuroendocrino intricato e finemente sintonizzato. L'ipotalamo riceve e integra le informazioni centrali e periferiche relative allo stato nutrizionale dell'individuo e risponde a questi segnali neurali, nutrizionali e ormonali innescando risposte oressigene e anoressigene al fine di preservare l'omeostasi energetica e mantenere il peso corporeo entro un intervallo ristretto. L'insulina e la leptina sono i principali ormoni anoressizzanti e informano l'ipotalamo, in particolare il nucleo arcuato dell'ipotalamo (ARC), il principale regolatore del bilancio energetico, sullo stato energetico a lungo e a breve termine. L'ARC comprende due principali popolazioni neuronali, i neuroni anoressizzanti che esprimono la proopiomelanocortina (POMC) e il trascritto regolato da cocaina e anfetamina (CART), una proteina neuropeptidica che nell'uomo sembra avere ruoli nella ricompensa, nell'alimentazione e nello stress, e i neuroni oressigenici che esprimono il neuropeptide Y (NPY) e il peptide correlato alla proteina agouti (AgRP). La leptina e l'insulina esercitano i loro effetti anoressizzanti attivando POMC/CART mentre

inibiscono i neuroni che esprimono NPY/AgRP, determinando così una diminuzione dell'assunzione di cibo e un aumento del dispendio energetico. Alla luce del ruolo centrale dell'insulina nella regolazione del bilancio energetico, l'insulino-resistenza può essere un meccanismo alla base della capacità degli AGEs di interrompere il controllo ipotalamico del bilancio energetico. Tuttavia, come detto in precedenza, gli AGEs possono anche attivare vie pro-infiammatorie e l'infiammazione rappresenta un ulteriore potenziale meccanismo mediante il quale gli AGEs interrompono l'equilibrio energetico portando all'aumento di peso corporeo. A sostegno di ciò, è stato osservato che, una dieta ricca sia di lipidi che di carboidrati, induce un aumento significativo dell'infiammazione ipotalamica nei roditori associata ad un aumento del peso corporeo. La dieta ad alto contenuto di grassi e carboidrati ha anche causato un aumento dell'immunoreattività della CML nei neuroni POMC e NPY. È stato ipotizzato che gli AGEs rilasciati dai neuroni ipotalamici promuovono le risposte infiammatorie prendendo di mira la microglia e aumentando la microgliosi ipotalamica, un processo centrale nella disfunzione ipotalamica indotta dalla dieta ad alto contenuto di grassi.

6.3 Gli effetti dei dAGEs sull'invecchiamento

Dal momento che i livelli sierici di AGEs sono dipendenti dalla produzione endogena, dall'assunzione esogena e dalla clearance renale ed enzimatiche, non sorprende come nell'anziano questo steady state possa essere alterato. In una popolazione che invecchia, infatti, l'accumulo di AGEs alimentari nell'organismo può avere implicazioni dirette sullo sviluppo e sulla gravità delle malattie legate all'età, come le malattie cardiovascolari e l'insufficienza renale, la sindrome metabolica e il T2DM, la riduzione delle funzioni cognitive e motorie, nonché l'aumento della fragilità e della predisposizione al cancro. È stato dimostrato che la maggior parte di queste malattie legate all'età sono mediate dall'infiammazione e dallo stress ossidativo. Numerosi studi si sono concentrati sul contributo degli AGEs endogeni e alimentari nell'avvio e nella progressione delle malattie croniche e durante l'invecchiamento, indicando che gli AGE aumentano lo stress ossidativo e l'infiammazione. È stato ipotizzato che gli AGE alimentari (principalmente CML e metilgliosale) siano la fonte più importante, mentre gli AGE formati endogenamente rappresentano i componenti minori. Altri studi sperimentali mostrano che nell'anziano, anche riducendo gli AGEs nella dieta, i livelli complessivi di AGEs aumentano. Nella donna è stato dimostrato che gli AGEs e i RAGEs sono espressi nella granulosa delle cellule della teca e nelle cellule del corpo luteo, correlate con l'età cronologica della donna e possono giocare un ruolo nel declino della funzione ovarica durante l'invecchiamento. In aggiunta, alcuni studi hanno mostrato una relazione tra AGEs e funzione muscolare nella popolazione più anziana. La sarcopenia, ossia il progressivo declino della massa e della forza muscolare, è uno dei fattori che incide di più sulla fragilità dell'anziano. La patogenesi della sarcopenia nonostante sia multifattoriale, in quanto include cambiamenti nell'equilibrio ormonale, l'aumento dello stress ossidativo, l'infiammazione, i cambiamenti nella vascolarizzazione

e l'inattività fisica, è stato ipotizzato che anche gli AGEs possono contribuire a questa condizione, aumentando lo stress ossidativo e l'infiammazione. Diete arricchite con AGEs sono state dunque correlate a processi di disfunzione muscolare e ossea. Alcuni studiosi hanno dimostrato che i topi che hanno seguito una dieta ad alto contenuto di AGEs (High-AGEs) per 16 settimane hanno mostrato livelli più elevati di Nε-(carbossimetil)-L-lisina, un marcatore di AGEs, nei muscoli estensori delle dita lunghe, nonché una minore forza e resistenza muscolare e una diminuzione dei livelli di espressione dell'mRNA dei fattori miogenici, tra cui il fattore miogenico 5 e la differenziazione miogenica nel muscolo estensore lungo delle dita, rispetto ai topi alimentati con una dieta a basso contenuto di AGEs (Low-AGEs). Questo studio indica che l'esposizione a lungo termine e con un consumo maggiore di dAGEs altera la crescita del muscolo scheletrico e la funzione contrattile a causa dell'inibizione del potenziale miogenico e della sintesi proteica. Altri studiosi hanno studiato topi maschi e femmine con diete a base di L-AGEs e H-AGEs, per 6 e 18 mesi. Le femmine di topo alimentate con H-AGEs presentavano un aumento dei livelli di AGEs nel siero e nelle vertebre corticali con diminuzione della densità minerale ossea e della frazione di volume osseo, un deterioramento funzionale con riduzione dei moduli di taglio e compressione e un carico massimo al cedimento dopo 6 mesi. A 18 mesi, i topi di entrambi i sessi alimentati con H-AGEs presentavano riduzioni significative, ma di lieve entità, della densità minerale ossea, dello spessore corticale e comportamenti biomeccanici funzionali compatibili con quelli osservati nei topi anziani. Questo studio dimostra che l'aumento del consumo di dAGEs in assenza di patologie come il diabete o l'obesità ha un effetto negativo sulla microstruttura vertebrale, sui comportamenti meccanici e sulla resistenza alle fratture nei topi giovani di sesso femminile, suggerendo l'instaurarsi di un invecchiamento osseo accelerato. Nonostante la crescente evidenza che gli AGEs contribuiscono al declino delle funzioni motorie negli anziani, la relazione causale di livelli elevati di AGEs come fattore di rischio per una maggiore fragilità resta da studiare ulteriormente.

Nel corso degli anni, tuttavia, si sono accumulate sempre più prove inerenti all'accumulo degli AGEs nelle membrane basali, nei cristallini e nel collagene, sottolineando come la glicazione e la formazione di legami crociati intermolecolari delle fibre di collagene cambino le proprietà biomeccaniche, determinando rigidità, una flessibilità ridotta e aumentando così la suscettibilità agli stimoli meccanici. Il collagene è la proteina più rappresentata nell'organismo e un accumulo di AGEs può provocare effetti dannosi anche sulla pelle. Infatti, nella pelle il collagene non costituisce solo un supporto meccanico per cellule e tessuti, ma rappresenta un componente attivo in grado di interagire con le cellule e di incidere sulle varie funzioni cellulari come la migrazione, la differenziazione e la proliferazione cellulare. Il collagene modificato si oppone al rimodellamento delle metalloproteasi, inibendo così la sua rimozione e la sostituzione con quello nuovo. La presenza di AGEs sulla cute influenza dunque la formazione della matrice extracellulare e lo skin aging, con conseguente perdita di elasticità e formazione di rughe.

6.4 Gli effetti dei dAGEs sull'intestino e sulla microflora batterica

Alcuni ricercatori, sulla base dei risultati sopra citati, secondo cui i dAGE vengono assorbiti solo in minima parte e che entrano nel colon sia liberi che legati alle proteine, suggeriscono che il potenziale effetto locale dei dAGE nel tratto gastrointestinale possa essere di maggiore importanza rispetto a quello dei dAGE che finiscono a livello sistemico. Poiché i dAGEs non vengono completamente digeriti e assorbiti nel tratto gastrointestinale, possono essere ulteriormente trasportati nel colon dove entrano in contatto con il microbiota umano ed essere parzialmente degradati e metabolizzati. A causa della ridotta digeribilità delle proteine glicate, anche gli aminoacidi e le proteine non assorbite vengono trasportati nel colon. La fermentazione delle proteine nel colon è spesso dannosa a causa della formazione di diversi prodotti che influiscono negativamente sul colon, come ammoniaca, ammine, fenoli e solfuri. Come conseguenza della fermentazione dei dAGEs da parte del microbiota e dei relativi composti prodotti, la composizione del microbiota e la sua produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), generalmente considerati antinfiammatori, possono essere soggetti a un cambiamento. Una recente revisione ha valutato gli effetti dei dAGE sul microbiota intestinale per quanto riguarda i cambiamenti di composizione e la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA). Per quanto riguarda la composizione del microbiota, sono stati trovati risultati contrastanti tra gli studi in vitro e quelli in vivo sugli animali. Tuttavia, le loro conclusioni sono state che negli animali, le diete ad alto contenuto di dAGEs sono state associate a una diminuzione di Bacteroidetes, Bifidobacteria, Lactobacilli e diversità α (il numero di specie diverse). In genere si ritiene che una diminuzione di queste tre specie porti a un tratto gastrointestinale meno sano. Gli effetti dei dAGEs sul microbiota sembrano dipendere non solo dal tipo di cibo o materiale glicato utilizzato, ma anche dalle differenze biologiche tra gli individui. In generale, gli studi in vivo sull'uomo che valutano l'effetto dei dAGE sul microbiota sono scarsi. La maggior parte degli studi sull'effetto dei dAGEs sul microbiota hanno utilizzato un tipo di prodotto alimentare o materiale glicato e un tipo di riscaldamento, che non rappresenta una condizione ottimale perché il trattamento e il prodotto di partenza influenzano ampiamente il risultato. Ciò è stato inoltre dimostrato in un recente studio in vitro che ha analizzato l'effetto di diversi prodotti alimentari (ceci, pane, peperoncino, banana e pollo) sulla produzione di SCFA. Tutti i prodotti alimentari sono stati preparati in modi diversi (cioè arrostiti, fritti, bolliti e alla griglia). I prodotti alimentari sono stati digeriti con un modello di digestione GI statica in vitro e fatti fermentare consecutivamente in vitro. Dopo la fermentazione in vitro, è stata analizzata la produzione di SCFA e la composizione della comunità microbica. Le loro principali scoperte confermano che gli effetti sul microbiota dipendevano in larga misura dal tipo di prodotto alimentare e dalla tecnica di cottura. Va notato che le analisi dei prodotti alimentari si sono concentrate sulla furosina e sul 5-(idrossimetil) furfurale (HMF), quindi non è stata misurata la composizione di dAGE specifici nei prodotti alimentari. Sebbene vi sia una scarsità di studi sull'uomo, numerosi studi sono stati intrapresi utilizzando animali e hanno valutato il microbioma cecale o fecale a seguito dell'assunzione di una dieta ad alto contenuto di AGEs. Attraverso l'incubazione di proteine glicate con campioni fecali di individui sani è stato osservata una modulazione del microbiota intestinale, in particolare di batteri quali

Firmicutes e Bacteroidetes. In modelli di roditori alimentati con cibi trasformati a caldo è stata osservata un'espansione dei Firmicutes e una contrazione dei Bacteroidetes. Il rapporto tra queste due popolazioni microbiche è stato proposto come un elemento di correlazione con l'obesità, sia nell'uomo che nei topi. Per quanto riguarda gli effetti sui Bifidobatteri, questi sono stati incoerenti tra i vari studi condotti, con una contrazione dei Bifidobatteri osservata nei ratti a seguito di una dieta trattata termicamente o di un'integrazione con crosta di pane, anche se un altro studio ha mostrato un'espansione dei Bifidobatteri a seguito dell'integrazione con crosta di pane. Nonostante questi risultati variabili tra gli studi su alcuni cambiamenti microbici, i risultati attuali mostrano un impatto dei dAGEs sull'ecosistema intestinale. È ragionevole ipotizzare che i dAGEs resistenti alla digestione interagiscono con il microbiota intestinale per modellare le specie e le attività microbiche; la microflora così modulata co-produce una grande quantità di piccole molecole per formare uno specifico asse metabolico ospite-microbo, conferendo successivamente effetti negativi o benefici sulla salute dell'ospite. (Figura 7)

6.5 I dAGEs sono correlati alle allergie alimentari?

L'allergia alimentare è oggi uno dei principali problemi di sicurezza alimentare che colpisce circa l'8% dei bambini e il 5% degli adulti in tutto il mondo. I sintomi comuni dell'allergia alimentare includono dermatite atopica, asma e disturbi gastrointestinali; mentre in alcuni casi l'anafilassi allergica induce una reazione in tutto il corpo causando potenzialmente uno shock. Secondo il FALCPA (Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act del 2004), una legge degli Stati Uniti che richiede a tutte le etichette alimentari di elencare gli ingredienti che possono causare reazioni allergiche e rilasciata dalla FDA, più di 160 alimenti possono scatenare risposte allergiche ma solo otto di essi, conosciuti anche come "Big Eight", sono responsabili di circa il 90% di tutti i casi di allergia alimentare negli Stati Uniti. Tra questi ci sono il latte, le uova, il grano, le arachidi, la soia, le noci, i crostacei e il pesce. Poiché la maggior parte degli allergeni presenti negli alimenti vengono sottoposti a trattamenti termici prima del consumo, vi è la possibilità che si formino i prodotti della reazione di Maillard, nonché gli AGEs. A tal proposito, alcuni rapporti pubblicati hanno studiato gli effetti della formazione degli AGEs sullo sviluppo di reazioni allergiche di proteine, dimostrando un possibile legame tra dAGEs e allergia alimentare. La stragrande maggioranza delle allergie alimentari sono reazioni IgE mediate, in cui gli anticorpi IgE specifici riconoscono brevi frammenti di allergeni, chiamati epitopi, determinando risposte ipersensibili a valle. La glicazione con gli AGEs altera le strutture lineari e conformazionali delle proteine allergeniche, il che induce il mascheramento degli epitopi o la generazione di neoallergeni. È stato suggerito che la dieta occidentale, tipicamente ricca di AGEs, abbia un effetto sull'allergenicità attraverso i T helper (Th2), tra cui IL-4, IL-5 e IL-13, le citochine pro-infiammatorie IL-1, IL-6 e IL-8, il TNF- α e le allarmine. Le risposte immunitarie allergiche di tipo I sono principalmente caratterizzate da cellule T helper (Th2), che provocano la formazione di anticorpi IgE allergene-specifici, portando all'attivazione dei mastociti al contatto secondario con l'allergene responsabile.

Ulteriori potenziali effetti immunologici modulatori degli AGEs includono la capacità di indurre nuovi epitopi leganti le IgE, la capacità di aumentare le condizioni infiammatorie e lo stress ossidativo e di causare, come visto precedentemente, una riduzione della diversità della flora intestinale, che porta a una maggiore suscettibilità alle allergie. La possibile influenza della reazione di Maillard sulla potenziale allergenicità di alcuni allergeni alimentari è stata oggetto di recente interesse. Finora gli studi hanno dimostrato che gli effetti della MR sull'allergenicità degli alimenti sono diversi e dipendono principalmente dalla stabilità termica degli allergeni, ma anche dai tipi e dalle concentrazioni di zuccheri riducenti, dalla composizione della matrice alimentare e dalle condizioni di trattamento (ad esempio, temperatura, pH, durata e umidità). È stato dimostrato che gli estratti di arachidi tostate inducono livelli più elevati di IgE rispetto alle arachidi crude e alcuni studiosi hanno descritto il legame degli allergeni di arachidi specificamente modificati dagli AGEs con RAGE, stabilendo che RAGE interagisce con Ara h 1 (principale allergene delle arachidi) ricombinante modificato con AGE ma non con Ara h 1 ricombinante non modificato. Più recentemente è stato riportato che i neoallergeni di tipo MR presenti nella soia lavorata causano una forte reazione allergica in individui sensibili alla soia. Le prove dimostrano che per indurre una risposta immunitaria allergica, la proteina modificata da MR deve essere riconosciuta e assorbita dalle APC (cellule che presentano l'antigene) e successivamente presentata alle cellule T. Inoltre, è stato proposto che i dAGEs possano indurre la segnalazione di allarmine, il cui compito è quello di segnalare alle cellule del sistema immunitario la presenza di patologie o condizioni di stress, e quindi avere il potenziale di imitare il danno tissutale attraverso la glicazione. In altre parole, i dAGEs potrebbero mimare gli allarmi innati e orientare le risposte allergiche in alcuni soggetti che hanno una predisposizione genetica e ambientale. Studi epidemiologici hanno rilevato ulteriori elementi che possono spiegare l'aumento dell'incidenza delle allergie alimentari, le quali sembrano essere collegate al numero di fast food presenti che producono cibi con un alto contenuto di grassi e all'elevato consumo di zucchero e dolcificanti. Inoltre, le aree urbane hanno una maggiore incidenza di allergia alimentare rispetto ai luoghi rurali, dove il consumo di cibi lavorati risulta minore. Tuttavia, attualmente, non ci sono prove dirette che gli AGEs scatenino allergie alimentari attraverso l'interazione con RAGE, sebbene RAGE sia altamente espresso sulle cellule dendritiche, macrofagi, linfociti T e cellule B. Pertanto, mancano prove che colleghino direttamente le allergie alimentari all'asse AGE-RAGE e non è ancora noto quali molecole di glicazione si leghino esattamente a quali recettori in vivo. Finora, non ci sono prove precise per prevedere le conseguenze degli AGEs derivati dagli alimenti sulla allergenicità delle proteine alimentari e sono necessari ulteriori studi per comprendere le caratteristiche e le conseguenze biologiche e immunologiche dei prodotti della Reazione di Maillard. La lavorazione degli alimenti e alcune forme di cottura possono nascondere, distruggere o rivelare epitopi allergenici modificando la conformazione o, in alcuni casi, cambiando la digeribilità delle proteine. Pertanto, trasmettere l'importanza della lavorazione/cottura degli alimenti e la capacità di poter alterare le proprietà allergeniche delle proteine dovrebbe essere di grande utilità nelle popolazioni in cui le allergie alimentari sono in aumento.

6.6 Limitazioni degli studi animali dei dAGEs

La bassa qualità valutata per gli studi sugli animali e sull'uomo che studiano l'effetto degli AGEs dietetici sui diversi processi di salute è dovuta a diversi limiti metodologici: piccola dimensione del campione, durata limitata dell'intervento e del follow-up, mancanza di risultati clinici dell'endpoint, randomizzazione inadeguata e prevalentemente sottostima. Gli studi sugli animali che hanno studiato gli effetti dei dAGEs sulla salute e sulla malattia presentano una significativa eterogeneità nel disegno dello studio, nei modelli dietetici utilizzati correlati al contenuto di AGE, nelle misurazioni ed infine nella presentazione dei risultati. Tuttavia, gli studi esistenti stimano solamente alcuni dei composti AGE, sebbene N-carbossimetil lisina e il metilgliosale siano quelli maggiormente presenti in varie patologie e associati a marcatori di salute e malattia. La breve durata di follow-up è considerato un altro fattore limitante, poiché le conseguenze negative di una dieta ad alto contenuto di AGEs (H-AGEs) possono insorgere con gli anni anziché in settimane o mesi. Tuttavia, il fatto che le diete ad alto contenuto di AGEs e a basso contenuto di AGEs (L-AGEs) fossero associate a marcatori di malattia in vari modelli animali sperimentali supporta comunque il loro ruolo in varie patologie. Inoltre, anche il database esistente degli AGEs alimentari presenta dei limiti, incluso il fatto che gli alimenti sono stati selezionati da diete comuni nella popolazione degli Stati Uniti e dunque potrebbero non rappresentare la media internazionale. Pertanto, il fatto che entrambe le diete (H-AGEs e L-AGEs) fossero associate a marcatori di malattia nei soggetti sani e che quest'ultimi fossero elevati nei pazienti con diabete e malattie renali conferisce credibilità al loro ruolo di agenti patogeni negli alimenti consumati dal pubblico e nelle persone con determinate malattie croniche. Vi sono comunque studi che presentano prove contrastanti contro l'associazione tra l'assunzione di dAGEs e la loro presenza nell'organismo o i loro effetti patologici reali. Gli studi futuri dovrebbero continuare ad espandere il database dei dAGEs e studiare metodi aggiuntivi per ridurre la formazione di AGEs durante la cottura casalinga e la lavorazione degli alimenti industriali.

Capitolo 7. Strategie per ridurre i danni sulla salute connessi ai dAGEs

7.1 Restrizione durante la lavorazione degli alimenti: fattori chiave che influenzano la formazione di dAGEs

Per limitare il contenuto di AGEs negli alimenti, dovrebbero essere prima illustrati i fattori che influiscono sulla loro generazione durante la lavorazione e/o trasformazione. Come mostrato nella *figura 9*, i fattori decisivi della formazione degli AGEs possono essere categorizzati come aspetti interni ed esterni. I fattori interni includono le specie ed il contenuto dei composti reattivi, ossia carbonili e ammine. Il gruppo amminico N della lisina e il gruppo guanidinico dell'arginina sono due siti attivi principali della reazione di Maillard, così come i gruppi amminici N-terminali delle catene polipeptidiche. Pertanto, gli alimenti ad alto contenuto di lisina e arginina, come latticini, carni e prodotti con certe quantità di amminoacidi liberi, per esempio la salsa di soia, sono inclini a formare AGE durante la lavorazione e i trattamenti a cui sono sottoposti. A tal proposito, l'accessibilità dei residui attivi sulla superficie delle proteine influenza l'efficienza e la diversità degli AGEs prodotti. I carbonili reattivi nella formazione di AGEs derivano principalmente da zuccheri riducenti quali monosaccaridi, disaccaridi riducenti, oligo- e polisaccaridi. Tuttavia, al riscaldamento, i saccaridi possono degradarsi in composti dicarbonilici, ovvero G, 3DG e MG, le quali sono molecole glicanti altamente reattive e definiti come precursori degli AGEs. Oltre alle proteine e ai carbonili, anche la perossidazione lipidica produce derivati dicarbonilici; così, gli alimenti ricchi di grassi hanno dimostrato di avere contenuti più elevati di CML, rispetto alle loro controparti a basso contenuto di grassi. Oltre ai reagenti, la presenza di composti antiossidanti potrebbe avere un impatto significativo sulla formazione di AGE attraverso il blocco della reazione di Maillard. Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi per sollevare e mettere in luce nuovi inibitori della formazione di AGEs. Oltre ai composti sintetizzati chimicamente, non pochi studi hanno descritto estratti botanici e ingredienti correlati come efficaci candidati antiglicazione. Infatti una grande varietà di bioattivi naturali, principalmente fenolici, oligo- e polisaccaridi sono stati ritratti come inibitori degli AGEs in sistemi modello o in alimenti trasformati. I meccanismi antiglicazione che sono stati riportati riguardano perlopiù: scavenging dei radicali liberi, chelazione degli ioni metallici, intrappolamento degli intermedi carbossilici reattivi e formazione di addotti proteico-bioattivi. Rispetto all'amminoguanidina (un farmaco sintetico anti-AGE che agisce attraverso un residuo amminico che intrappola il gruppo aldeidico degli zuccheri riducenti), alcuni composti fenolici di fonti diverse hanno mostrato una maggior inibizione percentuale della glicazione nei sistemi modello BSA-glucosio/fruttosio. Attraverso studi di relazione struttura-attività, è stato rilevato che l'efficienza antiglicativa dei polifenoli dipende in gran parte dalla loro posizione, dal numero di gruppi ossidrilici e dalla metilazione o glicosilazione di alcuni gruppi funzionali. Per quanto riguarda gli oligo-/polisaccaridi, la potenza inibitoria sugli AGE è

strettamente associata alla loro composizione, al rapporto molare degli zuccheri e al grado di ramificazione. Per i fattori esterni i parametri più citati sono la temperatura, il tempo di lavorazione, la disponibilità di acqua, il pH e i metalli di transizione. Il pH iniziale dei reagenti e la capacità tamponante del sistema influenzano sia il tasso che la direzione del percorso della reazione di Maillard. È stato dimostrato che la reazione di Maillard procede più lentamente a pH acido; con l'aumento del pH, la velocità di reazione aumenta fino a raggiungere il suo massimo intorno a pH 10. In presenza di metalli di transizione, ad esempio ferro e rame, è noto che l'imbrunimento di Maillard e la degradazione dei prodotti Amadori sono accelerati. Tuttavia, quando il riscaldamento avviene a livelli di umidità più elevati, si osserva una diminuzione del tasso di MR a causa della diluizione dei reagenti nella fase acquosa. In questo contesto, rispetto ai metodi di riscaldamento ad umido (ad esempio la bollitura), il riscaldamento a secco (ad esempio cottura al forno), è risultato favorire la formazione di AGEs nelle carni cotte. Oltre ai parametri di lavorazione, anche le condizioni di conservazione degli alimenti hanno un impatto sulla reazione di Maillard. Il materiale di imballaggio sembra essere un anello trascurato nella formazione degli AGEs. Poiché il materiale esterno influisce sull'ambiente interno degli alimenti durante il trasporto e la conservazione, in futuro si raccomanda di effettuare studi sulla parte di imballaggio. Inoltre, negli ultimi anni sono emerse nell'industria alimentare numerose tecnologie di trattamento non termico. Alcune di esse si basano sull'azione di campi elettrici o sulla generazione di specie reattive che possono essere coinvolte nel percorso di risonanza magnetica e nella formazione di AGE (ad esempio, i ROS che si formano con il trattamento al plasma freddo); tuttavia, gli effetti di queste nuove tecniche sulla generazione di AGE devono ancora essere studiati. In breve, tutti i fattori sopra citati possono essere applicati singolarmente o in combinazione per limitare il contenuto di AGE negli alimenti trasformati. Tuttavia, qualsiasi alterazione delle condizioni di lavorazione può portare a cambiamenti indesiderati nella qualità degli alimenti. Pertanto, per raggiungere un equilibrio tra sapore, aspetto, accettazione da parte dei consumatori e aspetti salutistici, la riduzione degli AGEs attraverso la modulazione delle fasi di lavorazione dovrebbe essere meglio ottimizzata.

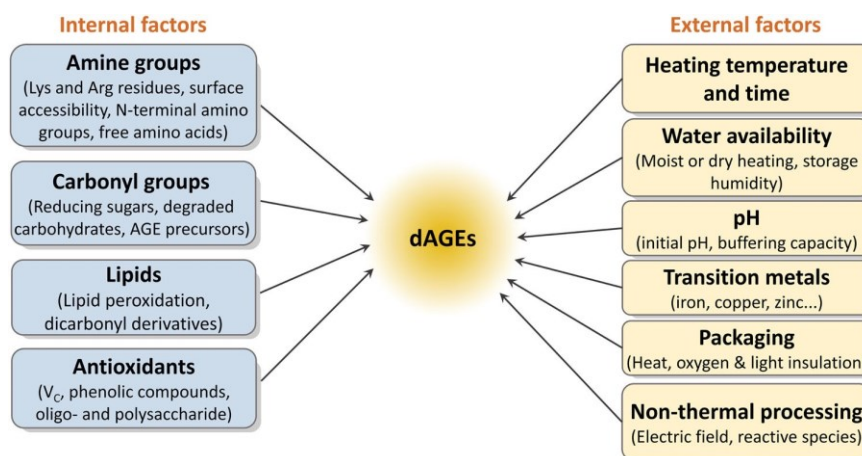


Figura 9. Fattori interni ed esterni che influenzano la formazione di AGE negli alimenti trasformati. (Zhang et al, 2020)

7.2 Controllo dell'assunzione di AGEs con la dieta

Considerando gli effetti deleteri degli AGE, una riduzione diretta dei dAGE dalla dieta sembra essere un approccio semplice, efficace e non invasivo per contrastare i disturbi associati. Tuttavia, i vantaggi delle diete con un basso introito di AGEs nell'uomo non sono chiari e universalmente condivisi. In pazienti con diabete di tipo 2, la restrizione di dAGEs ha soppresso l'espressione di citochine proinfiammatorie e marcatori legati allo stress ossidativo, all'insulino resistenza e alla disfunzione endoteliale. Nel 2013 è stata effettuata una interessante revisione sistematica in questo settore pubblicata su *European Journal of Clinical Nutrition*. Questa recensione mirava a determinare l'effetto della restrizione dietetica di AGEs sui profili infiammatori di adulti sani e adulti con diabete o insufficienza renale. Sono state analizzate otto banche dati informatiche che includevano studi con restrizione dietetica degli AGEs pubblicati in lingua inglese tra il gennaio 1997 (quando furono postulati per la prima volta gli effetti potenzialmente deleteri del consumo di AGEs con la dieta) e il dicembre 2012. Nella revisione sono stati inclusi di 12 studi con un totale di 289 partecipanti, cinque dei quali di alta qualità metodologica. In 10 trials si sono misurate le concentrazioni nel siero di carbossimetil-lisina (CML) dopo che gli individui sono stati sottoposti a diete con basso contenuto di AGEs versus diete standard. La meta-analisi di due studi omogenei e di buona qualità a lungo termine (16 settimane) condotti su adulti sani hanno mostrato l'efficacia della riduzione degli AGEs dietetici sulla riduzione degli 8-isoprostani (marcatori di stress ossidativo) e del Tumor Necrosis Factor Alpha (marcatore di infiammazione). La restrizione dietetica AGEs a medio termine negli adulti con insufficienza renale cronica ha ridotto VCAM-1 (un marcatore metabolico di disfunzione endoteliale) nel siero. Prove contrastanti sono state trovate sugli effetti a medio termine (4 settimane) e lungo termine (16 settimane) di diete ristrette in AGEs sulla resistenza all'insulina (misurati con HOMA index) in individui sani. Questa recensione fornisce alcune prove preliminari che suggeriscono come l'utilizzo di una dieta con un basso contenuto di AGEs potrebbe ridurre la concentrazione di AGEs totali sia in individui sani che in persone con diabete di tipo 2 e quindi potrebbe essere uno strumento efficace per ridurre con successo il processo di glicazione. Tuttavia, è richiesta cautela nell'interpretazione di questi risultati perché esistono dei limiti e dei potenziali bias metodologici. Tutti i trial che hanno evidenziato un effetto positivo delle diete low-AGEs sulla riduzione dei livelli di CML sistemici sono stati eseguiti dallo stesso gruppo di ricerca, e anche se una parte dei loro studi erano di alta qualità, questi studi devono essere replicati da altri gruppi di ricerca per rafforzare queste evidenze. I Bias di pubblicazione possono essere un fattore da considerare in questo particolare settore di ricerca, dal momento che esistono studi trasversali pubblicati che non riescono a rilevare una correlazione tra il consumo AGEs alimentari e i livelli di CML circolanti. Senza contare che studi con risultati negativi simili potrebbe essere rimasti inediti. Inoltre, risulta difficile la distinzione fra AGEs endogeni ed esogeni nel contribuire al pool totale di AGEs misurando la CML e suggerire diete con diverso contenuto di AGEs, ma con contenuti simili di altri nutrienti, come le vitamine sensibili al calore. Infine, otto dei 12 studi inclusi in questa revisione hanno stimato il contenuto di AGEs delle loro diete basandosi su database pubblicati da Goldberg et al., e successivamente aggiornato da Uribarri et al., in cui era stato

utilizzato un test immunoenzimatico non validato per la misurazione della CML nei prodotti alimentari. Queste discrepanze tra gli studi potrebbero essere attribuite, inoltre, alla dimensione del campione e alla popolazione, al periodo di follow-up, all'analisi dei dati, nonché alle specie e alle dosi di dAGEs ingeriti. Sono necessari ulteriori studi randomizzati controllati con periodi di studio a lungo termine, metodologie di alta qualità e campioni di dimensioni maggiori per poter fortificare i risultati a sostegno dei benefici per la salute della riduzione dei dAGEs.

Capitolo 8. Conclusioni e prospettive future

Gli AGEs sono addotti formati durante la cottura e la lavorazione degli alimenti o prodotti endogenamente come conseguenza del metabolismo. La dieta occidentale contiene elevati livelli di alimenti altamente trasformati e come tale rappresenta una fonte di AGEs, che contribuisce a promuovere l'obesità, l'insulino-resistenza e il deterioramento della salute metabolica. Gli effetti deleteri degli AGEs sono sostenuti dalla loro capacità di innescare meccanismi ben noti per provocare disfunzioni metaboliche, tra cui l'attivazione di vie infiammatorie, stress ossidativo e alterazione del metabolismo ossidativo mitocondriale. Nonostante i progressi svolti fino ad ora nel dimostrare gli effetti dei dAGEs sulla salute umana, molto è ancora sconosciuto sulla loro biodisponibilità, sui comportamenti metabolici e sui meccanismi per interagire con le proteine biologiche del corpo umano. Attualmente esistono ancora molte limitazioni per quanto riguarda la stima del contenuto di AGEs nella dieta; in particolare modo i dati analizzati sul contenuto di AGEs negli alimenti con metodi strumentali convalidati sono limitati; così come i dati attuali sui diversi AGEs in un gran numero di alimenti. Inoltre articoli alimentari simili differiscono spesso per il loro loro profilo nutrizionale, per cui la comparabilità con le banche dati esistenti è difficile. Il contenuto di AGEs negli alimenti potrebbe dipendere anche da piccole variazioni nella lavorazione degli alimenti, rendendo difficile la generalizzazione dei livelli di AGEs misurati. Pertanto, non sorprende che le informazioni sul contenuto di AGEs nelle diete utilizzate negli studi varino notevolmente. Nonostante ciò, è opinione comune che i metodi di cottura a bassa temperatura siano in grado di ridurre l'assunzione di AGEs nella dieta e sembrano essere benefici per la salute.

Sono necessarie tecnologie semplici, rapide e precise per costruire un database affidabile che comprenda i dAGEs contenuti negli alimenti comunemente consumati. L'elaborazione dei profili digestivi e di assorbimento, insieme all'affinità di legame con i propri recettori, deve, pertanto, essere effettuata su AGEs con strutture ben definite utilizzando approcci meccanicistici. La limitazione dei dAGEs attraverso l'alterazione delle condizioni di preparazione e l'aggiunta di bioattivi antiglicativi sembra essere promettente. Tuttavia, il loro peso molecolare e la loro complessità, l'interazione con il microbiota intestinale e l'influenza dei prodotti non-AGE negli alimenti trasformati sono alcuni dei punti mancanti nell'illustrare il ruolo biologico dei dAGEs in alcuni processi patologici. Gli studi esistenti sono controversi, inconcludenti o di bassa qualità e sono necessari ulteriori studi qualitativi, da parte di gruppi di ricerca, per chiarire il ruolo degli AGEs alimentari. I dati attuali sostengono la necessità di un cambiamento di paradigma che riconosca che, il modo in cui prepariamo e lavoriamo gli alimenti, può essere altrettanto importante della composizione dei nutrienti. Non solo, i cardini dell'intervento preventivo sono rappresentati, oltre che dalle modalità di cottura, anche da una alimentazione che preveda la stabilizzazione e l'ottimizzazione dei livelli di glicemia e insulina per evitare condizioni che favoriscano la glicazione e la scelta di cibi che limitino l'assunzione di AGEs esogeni e che ne favoriscano l'eliminazione.

BIBLIOGRAFIA:

Aleksandra Kazan, *Toxicity of advanced glycation end products. Biomedical reports*, January 26, 2021,

Domenico Sergi, Hakim Boulestin, Fiona M. Campbell, and Lynda M. Williams, *The Role of Dietary Advanced Glycation End Products in Metabolic Dysfunction. Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, 65, 1900934,

Masayoshi Takeuchi, Akiko Sakasai-Sakai, Takano Takata, Jun-ichi Takino, Yoshiki Koriyama, Chigusa Kikuchi, Ayako Furukawa, Kentaro Nagamine, Takamitsu Hori and Tamihide Matsunaga, *Intracellular Toxic AGEs (TAGE) Triggers Numerous Types of Cell Damage. Biomolecules* 11, 387, 5 March 2021,

Jyotiska Chaudhuri, Yasmin Bains, Sanjib Guha, Arnold Kahn, David Hall, Neelanjan Bose, Alejandro Gugliucci, and Pankaj Kapahi, *The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. Cell Metabolism* 28, September 4, 2018.

Ilaria Campo, Patrizia Morbini, Ernesto Pozzi, Maurizio Luisetti, *RAGE: una nuova via pro-infiammatoria per le polmoniti interstiziali?.Maggio 2008, Vol. 99, N. 5, Recenti Prog Med 2008;99(5):271-278 doi 10.1701/348.4064.*

Gemma Aragonès, Sheldon Rowan, Sarah G. Francisco, Elizabeth A. Whitcomb, Wenxin Yang, Giuliana Perini-Villanueva, Casper G. Schalkwijk, Allen Taylor, and Eloy Bejarano, *The Glyoxalase System in Age-Related Diseases: Nutritional Intervention as Anti-Ageing Strategy. Cells*2021,10,1852.

Jakob Morgenstern, Marta Campos Campos, Peter Nawroth and Thomas Fleming, *The Glyoxalase System—New Insights into an Ancient Metabolism, Antioxidants* 2020, 9, 939,.

Juan Salazar, Carla Navarro, Ángel Ortega, Manuel Nava, Daniela Morillo, Wheeler Torres, Marlon Hernández, Mayela Cabrera, Lissé Angarita, Rina Ortiz, Maricarmen Chacín, Luis D Marco, and Valmore Bermúdez, *Advanced Glycation End Products: New Clinical and Molecular Perspectives. Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021,18,7236.

Sara Chiappalupi, Laura Salvadori, Aleksandra Vukasinovica,b, Rosario Donato, Guglielmo Sorcia,b,d,1, Francesca Riuzzia, *Targeting RAGE to prevent SARS-CoV-2-mediated multiple organ failure: Hypotheses and perspectives, Life Sciences* 272 (2021) 119251, 18 February 2021.

Sara Chiappalupi, Laura Salvadori, Rosario Donato, Francesca Riuzzi and Guglielmo Sorci, *Hyperactivated RAGE in Comorbidities as a Risk Factor for Severe COVID-19—The Role of RAGE-RAS Crosstalk, Biomolecules* 2021, 11, 876.

Elif Inan-Eroglu, Aylin Ayaz and Zehra Buyuktuncer, *Formation of advanced glycation endproducts in foods during cooking process and underlying mechanisms: a comprehensive review of experimental studies, Nutrition Research Reviews* 2020.

Qiaozhi Zhang, Yanbo Wang, Linglin Fu, *Dietary advanced glycation end-products: Perspectives linking food processing with health implications, Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020.

Daniela Briceno Noriega, Hannah E. Zenker, Cresci-Anne Croes, Arifa Ewaz, Janneke Ruinemans-Koerts, Huub F. J. Savelkoul, R. J. Joost van Neerven and Malgorzata Teodorowicz, Receptor Mediated Effects of Advanced Glycation End Products (AGEs) on Innate and Adaptative Immunity: Relevance for Food Allergy, Nutrients 2022, 14, 371.

Matthew Snelson and Melinda T. Coughlan, Dietary Advanced Glycation End Products: Digestion, Metabolism and Modulation of Gut Microbial Ecology, 22 January 2019.

Timme van der Lugt, Antoon Opperhuizen, Aalt Bast and Misha F. Vrolijk, Dietary Advanced Glycation Endproducts and the Gastrointestinal Tract, 14 September 2020.

Kerstin Nowotnya, David Schrötera, Monika Schreinerb, Tilman Grune, Dietary advanced glycation end products and their relevance for human health, Ageing Research Review, Volume 47, November 2018, Pages 55-66.