

## Potenzialità cliniche del trifoglio rosso

V. UNFER, M. MINOZZI

RIASSUNTO: **Potenzialità cliniche del trifoglio rosso.**

V. UNFER, M. MINOZZI

*Vengono analizzate le caratteristiche e le peculiarità dell'uso in terapia degli isoflavoni del trifoglio rosso. In particolare sono esaminati nuovi dati sulla farmacocinetica dei metabolici attivi degli isoflavoni.*

*L'emivita di questi, particolarmente più lunga rispetto a isoflavoni da soia, offre al trifoglio nuove applicazioni cliniche, diverse dalla mera gestione degli effetti vasomotori della menopausa.*

KEY WORDS: Sintomatologia menopausale - Isoflavoni - Fitoestrogeni - Trifoglio rosso.

Le terapie ormonali sostitutive, pur in grado di dare notevoli benefici alla donna, hanno una scarsa compliance, sia perché possono causare un incremento del rischio di tumori mammari, sia perché spesso causano effetti collaterali da sovradosaggio con mastodinia, aumento di peso, gonfiore e ritenzione idrica, cefalea, bleeding.

La necessità di ottimizzare la compliance ha portato a studi clinici con dosaggi fino a un quarto di quelli usati solo pochi anni fa.

Il tumore al seno è il tumore più diffuso nei nostri Paesi industrializzati. Una donna su 10 ha un tumore al seno nella vita. La progressione del tumore al seno è influenzata da estrogeni, progesterone e dai loro recettori. Il rischio di tumore al seno è il principale limite della diffusione della terapia HRT: gli studi epidemiologici mostrano un incremento del 20-40% del rischio per trattamenti di lunga durata (più di 5 anni). Meno

del 10% delle donne in postmenopausa continua la HRT per un periodo superiore ad un anno.

Cresce l'interesse a principi attivi che, mantenendo un buon profilo d'azione, siano dotati di sicurezza e innocuità.

Gli estrogeni di provenienza vegetale sono conosciuti sino dagli anni '40.

Il trifoglio rosso può essere catalogato nella categoria dei cumestani. Contiene tutti e quattro gli isoflavoni che hanno attività biologica: biochanina A, precursore della genisteina, la formononetina, la genisteina stessa e la daidzeina; tutti, con simili cinetiche, metabolizzano verso l'equolo.

È stato proposto un meccanismo genomico e uno non genomico per giustificare gli effetti terapeutici degli isoflavoni del trifoglio sulla regolazione della attività proteica, la regolazione del metabolismo cellulare e la attività antiossidante.

Dal punto di vista generale, gli isoflavoni vengono definiti come estrogeni deboli, poiché l'attività biologica, ossia la loro potenza, è notevolmente inferiore agli estrogeni (si consideri che un livello plasmatico di estradiolo di 100 picomoli/l è equivalente a un livello di isoflavoni di 500.000 picomoli/l).

Gli isoflavoni tuttavia, se introdotti in adeguate quantità, sono in grado di esercitare interessanti effetti biologici.

## **Metabolismo degli isoflavoni. Somiglianze e diversità tra soia e trifoglio**

Nella ricerca di un più sicuro approccio alla HRT, una grande popolarità è stata ottenuta dall'uso di estrogeni di origine vegetale, normalmente denominati fitoestrogeni. Questi composti possono essere estratti da differenti piante, come soia o trifoglio rosso (*Trifolium Pratense*).

Gli estratti sono tuttavia caratterizzati da differenti composizioni. Il trifoglio contiene quattro isoflavoni: biochanina A, formononetina, genisteina e daidzeina. Tutti questi composti hanno una debole attività estrogenica e vengono sottoposti a metabolismo intestinale dove la biochanina A e la formononetina sono trasformate in genisteina e daidzeina.

Gli isoflavoni agiscono principalmente attraverso il legame ai recettori degli estrogeni.

Si caratterizzano per una affinità di legame maggiore nei confronti del recettore di tipo beta rispetto a quello alfa.

Dopo l'assunzione, gli isoflavoni subiscono un rapido metabolismo a livello gastrico e, in seguito, a livello enterico. La caratteristica peculiare degli isoflavoni del trifoglio rispetto a quelli della soia è la particolare biodisponibilità della coniugazione naturale tale da rendere disponibili le forme agliconiche attive del trifoglio senza una preliminare idrolisi enzimatica a livello intestinale. Questa caratteristica determina per il trifoglio un tempo di raggiungimento della massima concentrazione ematica nell'ordine delle 3 ore (la soia richiede almeno 6 ore) e un tempo di dimezzamento della stessa nell'ordine di 17 ore (la soia si dimezza in sole 7 ore). Questa originale farmacocinetica determina che il pool degli isoflavoni del trifoglio sviluppi particolari attività specifiche prima di arrivare al metabolita comune sia per la soia che per il trifoglio, l'equolo.

## **Gli effetti degli isoflavoni del trifoglio**

Gli effetti dei fitoestrogeni del trifoglio sul sistema cardiovascolare sono scarsamente conosciuti, e non sono mai stati descritti effetti sulle cellule del sistema vascolare da parte degli stessi. I quattro fitoestrogeni sono stati cimentati in un sistema di cellule endoteliali umane. Sono stati misurati dopo 48 ore gli incrementi nella sintesi dell'ossido nitrico (NO), incrementi dipendenti dalla concentrazione dei fitoestrogeni e sulla attività della sintetasi endoteliale dell'ossido nitrico (eNOS).

Sebbene l'azione dei composti singoli fosse piuttosto debole, la miscela delle quattro sostanze alle con-

centrazioni relative riproducenti la concentrazione plasmatica ricavata dal metabolismo e dalla farmacocinetica era invece capace di indurre attività sia su NO che eNOS.

Queste azioni sono riferibili all'aumento dell'espressione di eNOS e indicano un effetto trascrizionale.

Poiché i deboli estrogeni possono agire anche come antagonisti degli estrogeni, abbiamo anche valutato le azioni degli estratti di trifoglio rosso in presenza di differenti livelli di estradiolo, nel primo caso livelli piuttosto elevati corrispondenti al periodo di fertilità della donna, nel secondo caso bassi livelli corrispondenti a una situazione di post menopausa. I risultati degli esperimenti hanno dimostrato un'attivazione additiva di eNOS quando i fitoestrogeni sono addizionati a basse concentrazioni di estradiolo e nessun effetto quando aggiunti ad alte concentrazioni di estrogeni.

In conclusione i nostri risultati dimostrano che gli estratti di trifoglio rosso esercitano effetti diretti protettivi sulle cellule endoteliali umane attraverso la regolazione dell'enzima eNOS.

Un altro aspetto che è importante valutare per determinare il rischio cardiovascolare è l'espressione endoteliale delle molecole d'adesione leucocitarie, in quanto queste molecole giocano un ruolo importante nello sviluppo dell'aterosclerosi e nella destabilizzazione della placca. È noto che gli estrogeni sono in grado di ridurre l'espressione di queste molecole. È stato dimostrato che anche gli estratti di trifoglio hanno questa proprietà e che la esprimono attraverso l'inibizione sia delle molecole intracellulari (ICAM-1) che di quelle vascolari (VCAM-1).

In più, è stato validato che la presenza degli isoflavoni non altera l'attività estrogenica nel periodo fertile della donna e la sostiene nella menopausa.

Questi dati confermano che gli isoflavoni possono essere sia agonisti che antagonisti degli estrogeni a seconda del modello sperimentale o del momento fisiologico della donna.

In sintesi, gli isoflavoni del trifoglio rosso esercitano un'attività anti-infiammatoria e anti-aterogena attraverso l'inibizione delle chinasi cellulari NF- $\kappa$ B.

## **Trifoglio rosso e validazione clinica dell'efficacia vascolare**

Lo studio è stato intrapreso per individuare negli effetti vascolari dei singoli isoflavoni del trifoglio rosso le proprietà cardioprotettive riferite agli estratti di trifoglio rosso.

Sono state studiate in particolare la biochanina e la formononetina.

In uno studio randomizzato, pubblicato su *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23:1066-1071 in

doppio cieco, 80 soggetti sani, 46 uomini e 34 donne, di età tra 45 e 75 anni hanno ricevuto un pool di isoflavoni arricchito di biochanina o formononetina (precursori della genisteina e daidzeina, per totali 80 mg/giorno), con cross-over dei gruppi in due periodi di 6 settimane. L'end-point della ricerca è stato valutato al tempo zero e dopo ogni periodo di trattamento e includeva la valutazione della rigidità dalle grandi arterie (*systemic arterial compliance-SAC e pulse wave velocity-PWV A|F*), la funzione endoteliale nelle arterie brachiali (*flow-mediated vasodilatation*), la misurazione ambulatoriale della pressione sanguigna e la resistenza periferica totale-TPR.

La presenza degli isoflavoni riduce significativamente la rigidità arteriosa con miglioramento della "*systemic arterial compliance*" ( $P=0.04$ ), dato attribuibile alla riduzione della resistenza periferica totale ( $P=0.03$ ) ed una corrispondente riduzione della "*central pulse wave velocity*" ( $P=0.02$ ) nei confronti con il gruppo placebo.

Gli isoflavoni non modificavano significativamente la pressione sanguigna ( $P=0.5$ ) o la *flow-mediated vasodilatation* ( $P=0.44$ ).

I miglioramenti significativi sembrano limitati al gruppo di isoflavoni ricchi di formononetina ( $P=0.06$ ).

Il gruppo trattato con trifoglio arricchito di formononetina mostrava anche una riduzione delle molecole di adesione vascolare circolanti-VCAM-1 ( $P=0.01$ ).

In conclusione negli uomini normotesi e nelle donne in postmenopausa, gli isoflavoni del trifoglio rosso, specialmente se ricchi in formononetina, riducono la rigidità arteriosa e la resistenza vascolare totale, ma non hanno significativi effetti sulla pressione sanguigna.

## Sicurezza del trifoglio

Un altro aspetto che ha caratterizzato la ricerca di base sul trifoglio rosso è stata l'attenzione posta alla sicurezza dell'uso su pazienti a rischio.

La significativamente inferiore incidenza del tumore al seno e alla prostata nelle popolazioni dell'Estremo Oriente è stata associata a differenze nella dieta e specialmente ad un significativamente più alto consumo di fitoormoni.

Scopo dello studio di M. Imhof (Università di Vienna), che riprendiamo per esaminare l'attività genetica e nongenomica del trifoglio rosso, era di caratterizzare le conseguenze funzionali di un consumo di fitoormoni sull'espressione di mRNA di determinate linee cellulari.

Sono state studiate le linee cellulari MCF-7 del tu-

more mammario. È stata usata la tecnologia *Chip array (Affimetrix)* per comparare l'effetto dell'estratto naturale di trifoglio rosso MF11RCE con una miscela di fitoormoni purificati e sintetici, genisteina e daidzeina. Le linee cellulari, sia quelle di controllo che quelle trattate con una miscela di genisteina e daidzeina o con l'estratto di trifoglio, sono state analizzate dopo 12 ore di cultura.

Sono stati analizzati circa 20.000 geni valutando le ibridizzazioni del mRNA positive con una specificità con  $P \text{ inf a } 0.001$ .

Le ibridizzazioni positive nella linea di controllo erano pari a 4.470, nel gruppo trifoglio erano 4.842 e nel gruppo fitoormoni sintetici erano 4.981. Un incremento di mRNA di 2 volte rispetto ai controlli si verificava in 117 casi.

Il repertorio dei geni iperespressati aveva funzioni che spaziavano tra crescita della crescita cellulare e geni dedicati alla riparazione del DNA (*GADD34*) e *l'insulin-like growth factor binding protein 4*. Nella linea MCF-7 l'estratto di trifoglio stimolava significativamente la sintesi di 39 geni a 12 ore e di 68 a 24 ore, mentre con il pool di ormoni sintetici i geni stimolati erano rispettivamente 36 e 47.

L'analisi differenziale tra trifoglio e ormoni sintetici dei geni "up-regolati" mostrava che tra i 10 geni "up-regolati" dal gruppo sintetico, ben 7 erano del gruppo delle metallothioneine (MT).

Le MT sono *binding proteins* a basso peso molecolare che hanno un ruolo importante nella genesi del tumore. Anche se questa attribuzione è da definire con più precisione e con maggiori dati, è importante notare che il trifoglio non stimola l'espressione di queste MT.

L'espressione in vivo di una di queste MT, la MT-2A, è stata associata con un processo di accresciuta proliferazione del tumore al seno.

Una conclusione da questa ricerca è che l'estratto del trifoglio è meglio bilanciato e assolutamente meno pericoloso dei fitoormoni sintetici purificati.

Un dato nuovo, presentato a Torino nel settembre 2007, in occasione di "Breast", convegno internazionale sullo sviluppo del tumore del seno, da Simoncini-Pisa è la dimostrata capacità degli isoflavoni del trifoglio di agire, similmente al Tamoxifene, come anti-estrogeno su linee ER alfa positive (T47D), inibendo l'attivazione della moesina, proteina della famiglia ERM (ezrina, radixina, moesina) che, una volta fosforilata, provvede al rimodellamento cellulare ed è "over-espressa" in caso di prognosi negativa dei vari tipi di tumore.

Un altro effetto biologico valutato in questo lavoro è stata la capacità di interferire sulla migrazione cellulare indotta dall'estradiolo. Questi dati hanno rilevanza nella valutazione globale di sicurezza del trifoglio.

## La prevenzione dell'osteoporosi

**Premessa.** La terapia con isoflavoni è stata proposta come naturale alternativa alla HRT.

La HRT ha dimostrato di avere effetti benefici sull'osso; peraltro pochi lavori su pazienti sostengono gli effetti degli isoflavoni sull'osso.

L'obiettivo dello studio di Atkinson et al., pubblicato su *Am. J. Clin. Nutr.* nel 2004, era di determinare l'effetto di un complesso di isoflavoni del trifoglio rosso che forniva alla paziente per un intero anno di terapia 40 mg di isoflavoni.

Nello studio venivano seguiti i marker biochimici del turnover osseo e la composizione corporea.

**Disegno dello studio.** 205 donne in età compresa tra 49 e 65 anni sono state seguite in uno studio in doppio cieco, randomizzato, contro placebo. La densità ossea, la composizione corporea, il turnover osseo, i

marker del turnover osseo e la dieta sono stati misurati all'inizio e dopo 12 mesi.

**Risultati.** La perdita alla mineralometria ossea della zona lombare della colonna e la densità ossea minerale erano significativamente ( $P=0.04$  e  $P=0.03$  rispettivamente) inferiori nelle donne che ricevevano l'integratore con gli isoflavoni rispetto a quelle del gruppo placebo. Non c'erano effetti significativi sul contenuto mineralico del femore o sulla relativa densità sui marker del riassorbimento osseo o sulla composizione corporea, ma i marker della formazione ossea erano significativamente aumentati ( $P=0.04$  e  $P=0.01$  per la fosfatasi alcalina osso-specifica e l'N-propeptide del collagene di tipo I, rispettivamente) nel gruppo trattato rispetto al placebo nelle donne in post-menopausa.

**Conclusioni.** Questi dati suggeriscono che, a causa della riduzione della perdita ossea, gli isoflavoni del trifoglio hanno un potenziale effetto protettivo sulla spina dorsale delle donne in trattamento.

## Bibliografia

1. THE WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial.* JAMA 2002;288:321-333.
2. THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE STEERING COMMITTEE. *Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial.* JAMA 2004;291:1701-1712.
3. CLARKSON TB. *Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease.* J Nutr 2002;132:566S-569S.
4. CHEN YM, HO SC, LAM SF, HO SS, YUO JL. *Beneficial effect of soy isoflavones on bone mineral content was modified by years since menopause, body weight, and calcium intake: a double-blind, randomized, controlled trial.* Menopause 2004;11:246-254.
5. KREJKAMP-KASERS S, KOK L, GROBBEE DE, et al. *Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial.* JAMA 2004;292:65-74.
6. ATKINSON C, COMPSTON JE, DAY NE, DOWSETT M, BINGHAM SA. *The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.* Am J Clin Nutr 2004;79:326-333.
7. SCHULTZ TM, ENSRUD KE, BLACKWELL T, ETTINGER B, WALLACE R, TICE JA. *Effect of isoflavones on lipids and bone turnover markers in menopausal women.* Maturitas 2004;48:209-218.
8. WU J, OKA J, TABATA J, et al. *Effects of isoflavone and exercise on BMD and fat mass in postmenopausal Japanese women: a 1-year randomized placebo-controlled trial.* J Bone Miner Res 2006;21:780-789.
9. FUJIOKA M, SUDO Y, OKUMURA M, et al. *Differential effects of isoflavones on bone formation in growing male and female mice.* Metabolism 2007;56:1142-1148.
10. EDEN JA. *Managing the menopause: phyto-estrogens or hormone replacement therapy?* Ann Med 2001;33:4-6.
11. ATKINSON C, WARREN RM, SALA E, et al. *Red clover-derived isoflavones and mammographic breast density: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.* Breast Cancer Res 2004;6:R170-R179.
12. HA TC, LYONS-WALL PM, MOORE DE, et al. *Phytoestrogens and indicators of breast cancer prognosis.* Nutr Cancer 2006;56:3-10.
13. RICE S, WHITEHEAD SA. *Phytoestrogens and breast cancer: promoters or protectors?* Endocr Relat Cancer 2006;13:995-1015.
14. DIEL P, HERTRAMPF T, SEIBEL J, LAUDENBACH-LESCHOWSKY U, KOLBA S, VOLLMER G. *Combinatorial effects of the phytoestrogen genistein and of estradiol in uterus and liver of female Wistar rats.* J Steroid Biochem Mol Biol 2006;102:60-70.
15. CASSIDY A, HOOPER L. *Phytoestrogens and cardiovascular disease.* J Br Menopause Soc 2006;12:49-56.
16. ROSS R. *Atherosclerosis: an inflammatory disease.* N Engl J Med 1999;340:115-126.
17. GIMBRONE MA Jr. *Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis.* Am J Cardiol 1995;75:67B-70B.
18. DE CATERINA R, GIMBRONE MA Jr. *Leukocyte-endothelial interactions and the pathogenesis of atherosclerosis.* In: Kristensen SD, Schmidt EB, De Caterina R, Endres S, eds. n-3 Fatty Acids: Prevention and Treatment in Vascular Disease. London: Springer Verlag, 1995:9-24.
19. IMHOF M, GOCAN A, REITHMAYR F, LIPOVAC M, SCHIMITZEK C, CHEDRAUI P, HUBER J. *Effects of a red clover extract (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in postmenopausal women.* Maturitas. 2006 Aug 20;55(1):76-81.
20. HIDALGO L A, CHEDRAUI PA, MOROCHO N, ROSS S, & SAN MIGUEL G. *The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: A randomized, double-blind, placebo-controlled study.* Gynecological Endocrinology, November 2005; 21(5): 257-264.