

© 2025 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 28: 1-7, 2025.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2025.738>

## Efecto antiamiloide de la avenantramida-C en la fibrilación de insulina

Leztly Marlene de Luna Pérez†, María Guadalupe Quiroz Vázquez†, Dvorak Montiel Condado, Brenda González Hernández y Azucena González-Horta\*

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Ciencias Genómicas, Ciudad Universitaria, Pedro de Alba s/n, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66455. México.

Email: \*azucena.gonzalezhr@uanl.edu.mx ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8222-2111>

### RESUMEN

La insulina es una proteína globular, pequeña, con estructura alfa-helicoidal que regula la homeostasis de glucosa en el organismo; al fallar su función en los pacientes diabéticos; se recurre a un auxiliar que se produce a través de un proceso químico industrial, este procedimiento, plantea desafíos importantes para los laboratorios farmacéuticos debido a la formación de agregados amiloides de insulina. Los compuestos fenólicos como el fenol y el *m*-cresol se emplean habitualmente para estabilizar la forma hexamérica de la insulina durante su preparación comercial. Pero, su uso a largo plazo puede ser tóxico debido a los efectos adversos que provocan los fenoles. Por tanto, en este trabajo se seleccionó a la avenantramida-C, principal polifenol de la avena, para evaluar su capacidad antiamiloide debido a la similitud estructural que tiene con los compuestos fenólicos mencionados. Los resultados demuestran que la avenantramida-C disminuye la formación de amiloides de insulina de manera dosis-dependiente. El análisis espectrofotométrico realizado con la sonda ANS muestra que la avenantramida-C se une a las regiones hidrofóbicas de intermediarios de insulina parcialmente desplegados, por lo que puede considerarse como un nuevo agente para inhibir la formación de amiloides durante la fabricación biofarmacéutica.

**Palabras clave:** insulina, actividad antiamiloide, inhibición, polifenol, avenantramida-C.

### Antiamyloid effect of avenanthramide-C on insulin fibrillation

### ABSTRACT

Insulin is a small globular protein with an alpha-helical structure that regulates glucose homeostasis in the body. When its function fails in diabetic patients, the protein produced through an industrial chemical process is used. This procedure poses significant challenges for pharmaceutical laboratories due to the formation of insulin amyloid aggregates. Phenolic compounds, such as phenol and *m*-cresol, are commonly used to stabilize the hexameric form of insulin during its commercial preparation. However, their long-term use can be toxic due to the adverse effects caused by phenols. Therefore, in this study, avenanthramide-C, the main polyphenol in oats, was selected to evaluate its antiamyloid capacity due to its structural similarity to the aforementioned phenolic compounds. The results demonstrate that avenanthramide-C decreases the formation of insulin amyloids in a dose-dependent manner. Spectrophotometric analysis using the ANS probe shows that avenanthramide-C binds to hydrophobic regions of partially unfolded insulin intermediates and can therefore be considered as a novel agent to inhibit amyloid formation during biopharmaceutical manufacturing.

**Keywords:** insulin, antiamyloid activity, inhibition, polyphenol, avenanthramide-C.

## INTRODUCCIÓN

**L**a insulina es una proteína secretada por el páncreas en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans, su estructura es altamente conservada y está compuesta por dos cadenas, la cadena A y la cadena B, de 21 y 30 aminoácidos respectivamente unidas por tres puentes disulfuro. Puede encontrarse como hexámero, tetrámero o dímero de acuerdo a las condiciones del medio en el que se encuentre y a su concentración (Jarosinski, Dhayalan, Chen, Chatterjee, Veras & Weiss, 2021). Una de las funciones clave de la insulina es en la regulación de los niveles de glucosa sanguínea y en la prevención de la hiperglucemia. En los pacientes diabéticos, el organismo no produce suficiente insulina o no la utiliza de forma eficaz, lo que conduce a niveles elevados de glucosa en la sangre, por lo que los afectados, dependen de la terapia de reemplazo de insulina a través de inyecciones subcutáneas y a la fecha, ya son numerosos los casos de pacientes diabéticos que reportan la formación de depósitos amiloides de insulina o amiloidosis en el sitio de inyecciones repetidas, lo que se observa como una masa subcutánea (Okamura, Hayashino, Kore-Eda & Tsujii, 2013). La amiloidosis empeora los niveles de glucosa en sangre y da como resultado la necesidad de un aumento en la dosis de insulina pasando de 36 unidades a 176 unidades por día. El control deficiente de la glucemia provoca varias complicaciones como: la retinopatía diabética, el coma hipoglucémico, un infarto cerebral y la gangrena. La amiloidosis subcutánea, normalmente se trata mediante remoción quirúrgica del área afectada, lo que provoca complicaciones postoperatorias como infección en las heridas o retraso en la cicatrización, especialmente cuando hay un mal control de la glucosa sanguínea (Jarosinski *et al.*, 2021). La insulina y sus análogos también plantean un problema en los entornos comerciales al producirse en grandes cantidades, debido a que factores como el pH ácido, la agitación, la temperatura elevada, el contacto con superficies hidrofóbicas o la variación en la fuerza iónica, agravan su capacidad para formar amiloides (Ziaunys, Mikalauskaite, Sakalauskas & Smirnovas, 2024; Iannuzzi, Borriello, Portaccio, Irace & Sirangelo, 2017). Esto reduce la biodisponibilidad de la insulina lo que resulta en una inadecuada actividad funcional. Por lo que, es importante desarrollar estrategias que prevengan la formación de los depósitos de insulina y, aunque la terapia de reemplazo para los pacientes diabéticos se introdujo hace aproximadamente 100 años, generar moléculas pequeñas que acompañen a la insulina en las formulaciones y que sean capaces de evitar la formación de amiloides de manera específica y efectiva, todavía es un reto. Actualmente el *m*-cresol y el fenol se utilizan como conservadores en las fórmulas químicas de insulina para mantener la esterilidad y estabilizar su estado hexamérico; sin embargo, la exposición prolongada al fenol, a través de las inyecciones de insulina puede resultar tóxico y provocar arritmia, convulsiones y coma al afectar el sistema nervioso central. Se ha reportado que el *m*-cresol causa daño gastrointestinal, problemas en la piel en el lugar de inyección

e incluso la muerte celular después de un periodo de tiempo (Weber, Kammerer, Streit & Licht, 2015), por lo que surge la necesidad de reemplazar los excipientes actuales por moléculas con un perfil más biocompatible.

Los polifenoles se han estudiado con amplitud por ser inhibidores amiloides con la capacidad de unirse a las proteínas y formar complejos a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Entre ellos destacan el galato de epigallocatequina (EGCG), la curcumina, el resveratrol, la quercetina y el ácido ferúlico (Gancar *et al.*, 2020; Jayamani, Shanmugam, Ramaprasad & Singam, 2014; Rabiee, Ebrahim-Habibi, Ghasemi & Nemat-Gorgani, 2013). La avenantramida-C (Avn-C), (Figura 1A), principal polifenol de la avena, comparte varias características estructurales con la curcumina y el resveratrol y, en trabajos previos se demostró que tiene la capacidad de inhibir la formación de fibras amiloides al emplear como proteína modelo la albúmina sérica bovina (Quiroz Vázquez, Montiel Condado, González Hernández & Gonzalez-Horta, 2020); sin embargo, a la fecha, no se han encontrado reportes que demuestren el efecto inhibitorio de la Avn-C sobre la formación de amiloides de insulina

## MATERIALES Y MÉTODOS

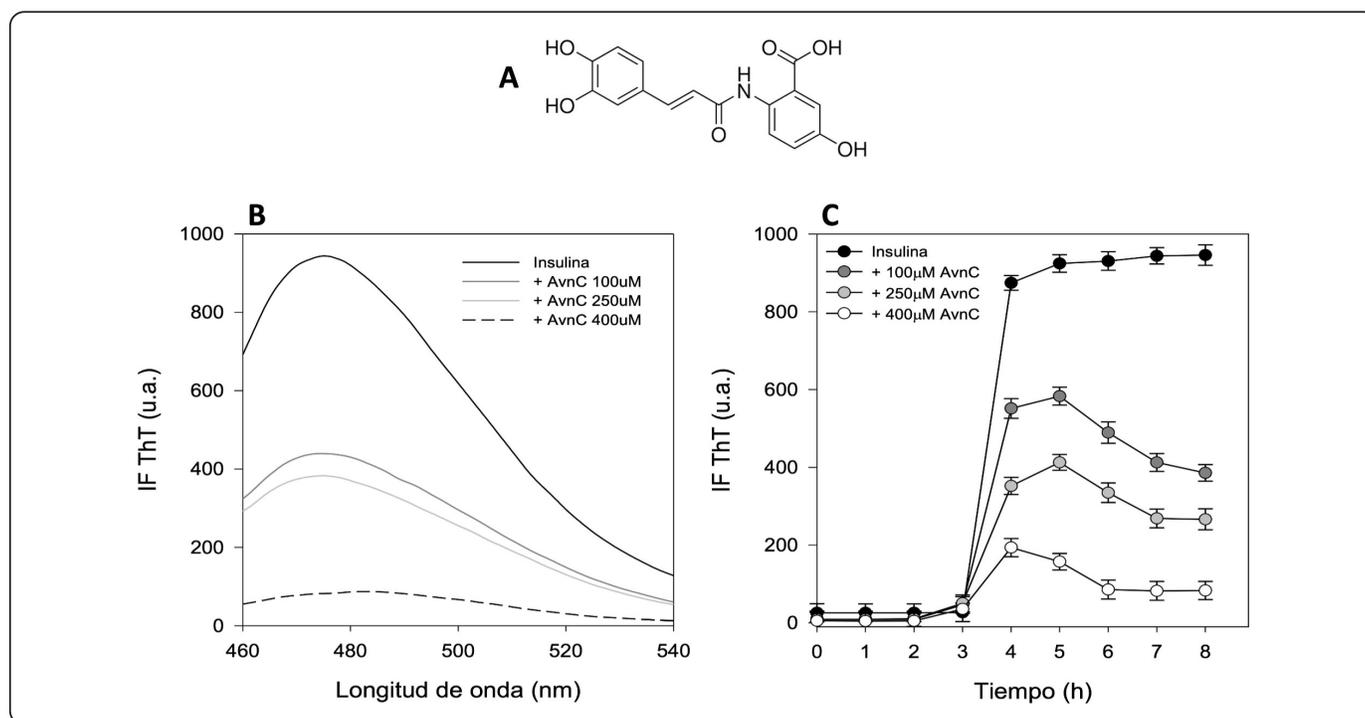
La insulina humana, la avenantramida-C, la sonda Tioflavina T (ThT) y el 1-Anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) se obtuvieron de Sigma Aldrich Inc. Todos los reactivos que se emplearon fueron de calidad analítica y de J.T. Baker.

### Preparación de las muestras

Se disolvió insulina en polvo en una solución de ácido acético al 20%, pH2 y 100mM de NaCl para lograr una solución a 172 $\mu$ M de insulina humana. Se preparó una solución stock de Avenantramida-C en metanol a [1mg/mL] y de ThT a la misma concentración y se almacenaron a 4°C hasta su utilización. La sonda ANS se preparó en buffer Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico) 20mM a pH 7.4.

### Ensayo de fluorescencia de ThT

Para evaluar la capacidad antiamiloides de la avenantramida-C, las muestras de insulina en ausencia y presencia de distintas concentraciones del polifenol (100, 250 y 400 $\mu$ M) se incubaron a 60°C en un termomixer (Eppendorf) por 8h con agitación a 300rpm para inducir la formación de fibras amiloides. Se tomaron alícuotas de las muestras preincubadas a diferentes tiempos, se monitoreó el incremento en la intensidad de fluorescencia a 480nm tras la unión a ThT y a una longitud de onda de excitación de 440nm en un espectrofluorímetro LS-45 (Perkin-Elmer). Los espectros se realizaron a 25°C en una celda de cuarzo de 0.1cm de paso óptico. La concentración final de ThT en la celda fue de 10 $\mu$ M y de insulina de 0.5 $\mu$ M en buffer fosfato de sodio (PBS) 50mM a pH 7.4. Todos los espectros fueron corregidos restando el blanco correspondiente.



**Figura 1. Inhibición de la formación del agregado amiloide de insulina en presencia de avenantramida-C monitoreada por espectroscopía de fluorescencia de ThT. A) Estructura de la Avn-C utilizada en este estudio. B) Espectros de fluorescencia de insulina (172 μM) incubados a 60°C durante 8 h en ausencia (línea negra) y presencia de Avn-C a 100 μM (línea gris oscuro), 250 μM (línea gris claro) y 450 μM (línea punteada). Los espectros se realizaron empleando una  $\lambda_{exc}=440\text{nm}$  C) Cinética de fluorescencia de la insulina en ausencia (círculo negro) y presencia de Avn-C a 100 μM (círculo gris oscuro), 250 μM (círculo gris claro) y 450 μM (círculo blanco). Los datos se representan como la media de tres experimentos realizados de manera independiente.**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar de 3 determinaciones independientes.

### Ensayo de fluorescencia de ANS

El agregado amiloide (0.5 μM) en ausencia y presencia de avenantramida-C se mezcló en una relación molar 1:200 (insulina/sonda) y las mezclas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se monitoreó la intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 380 nm y se recogieron los espectros de emisión entre 400 y 600 nm en el espectrofluorímetro LS-45 (Perkin-Elmer).

### Apagamiento de la fluorescencia intrínseca

El apagamiento de la fluorescencia intrínseca de los residuos de tirosina de la insulina (8 μM) disuelta en buffer PBS 20 μM a pH 7.4 se monitoreó en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de avenantramida-C (0 a 20 μM) a 25°C empleando una longitud de onda de excitación de 276 nm. Los espectros se registraron de 300 a 360 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los valores se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar de experimentos independientes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la avenantramida-C sobre la propensión a la fibrilación de la insulina

El efecto de la avenantramida-C sobre la formación de amiloides de insulina se evaluó al medir la intensidad de la fluorescencia de la ThT, una sonda sensible a la presencia de láminas  $\beta$  como la que presentan los amiloides (Hudson, Ecroyd, Kee & Carver, 2009). Los espectros de fluorescencia de ThT de las muestras de insulina incubadas por 8 h a 60°C en ausencia y presencia de la Avn-C se representan en la Figura 1B. Se observa que en ausencia del polifenol la insulina muestra un máximo de emisión a 480 nm, lo que indica la existencia de estructuras amiloides de tipo lámina  $\beta$  y que, en presencia de cantidades crecientes de Avn-C, la intensidad de la fluorescencia de ThT se reduce sustancialmente y de forma dependiente de la concentración del polifenol por lo que puede decirse, que las muestras coincubadas con la Avn-C presentan una disminución en la formación de las estructuras de tipo lámina- $\beta$ . La cinética de formación amiloide (Figura 1C) demuestra que la intensidad de la fluorescencia de la ThT en ausencia de Avn-C presenta una típica forma sigmoide. El tiempo de la fase lag resultó de 3 h aproximadamente, después de las cuales, la intensidad de fluorescencia de la ThT se incrementó con rapidez hasta alcanzar un plató a partir de las 5 h de incubación, lo que

demuestra la polimerización dependiente de la nucleación de la insulina como lo han reportado previamente (Gong *et al.*, 2014). En contraste, las muestras coincubadas con Avn-C presentaron una menor intensidad de fluorescencia conforme aumentó la concentración del polifenol lo que demuestra, que la Avn-C es capaz de inhibir la formación de fibras amiloides de forma dosis-dependiente presentando el máximo efecto inhibitorio a una concentración de 400 $\mu$ M. En presencia de Avn-C el tiempo de meseta permaneció casi sin cambios si se compara con el control, aunque, a partir de las 5h de incubación, la intensidad de la fluorescencia máxima se redujo hasta un 50%, 60% y 90% en presencia de 100, 250 y 400 $\mu$ M de Avn-C respectivamente, lo que indica una disminución en la formación de las estructuras de tipo lámina  $\beta$ . La disminución en la intensidad de la fluorescencia de la ThT en presencia del polifenol manifiesta el potencial antiamiloides de la Avn-C. Esto es probable que se deba a la capacidad que tienen los polifenoles y por tanto la Avn-C, de interactuar con las proteínas a través de los grupos hidroxilo localizados en sus anillos aromáticos, al formar puentes de hidrógeno e interferir con la formación de amiloides. Cabe señalar, además, que la Avn-C no solo cuenta en su estructura con dos grupos aromáticos terminales, que se requieren para interactuar con las proteínas, sino que también presenta un linker alifático corto, que cumple con las características estructurales propuestas por Reinke & Gestwicki (2007) para que, moléculas pequeñas, sean capaces de inhibir la formación de amiloides proteicos. Con la finalidad de evitar cualquier falso positivo en el ensayo de ThT, se realizaron los espectros de absorbancia (de 400 a 700nm) y de fluorescencia (460-590nm con una  $\lambda_{exc}$  440nm) a la insulina, a la ThT y a la Avn-C. Los resultados mostraron que la Avn-C no presenta

absorbancia a la longitud de onda de excitación de la ThT y tampoco se origina un incremento en la intensidad de la fluorescencia tras ser incubada con la sonda en ausencia de la insulina, lo que demuestra que la Avn-C no forma fibras amiloides por sí misma ni tampoco interactúa con la sonda libre descartando así, cualquier interferencia en el ensayo con ThT (Figura 2).

#### Modulación hidrofóbica superficial de la insulina

El plegamiento incorrecto de las proteínas y su desdoblamiento de manera parcial, son los pasos previos necesarios para la formación de amiloides. Dado que el núcleo de una proteína globular está enriquecido con residuos hidrofóbicos en comparación con la superficie, su desplegamiento da como resultado la exposición de los residuos hidrofóbicos al medio externo. Esta alteración en su estructura se detecta mediante los cambios característicos en la fluorescencia del ANS, una sonda fluorescente muy útil para seguir la transformación estructural de las proteínas en solución. La unión preferencial del ANS a grupos hidrofóbicos da lugar a un incremento en la emisión de la fluorescencia acompañada de un desplazamiento hacia el azul del máximo espectral (Younan & Viles, 2015). Así, al utilizar como sonda el ANS, se evaluó si en presencia del polifenol hay una reducción hidrofóbica en la superficie proteica. En la Figura 3 se muestran los espectros de emisión de la fluorescencia del ANS medidos para las muestras de insulina co-incubadas en ausencia y presencia de la Avn-C. Las fibras de insulina presentan un máximo de emisión  $\sim$ 460nm y un desplazamiento hacia el azul si se compara con la intensidad de la fluorescencia máxima de la sonda en un entorno polar. En presencia del polifenol, se observa una

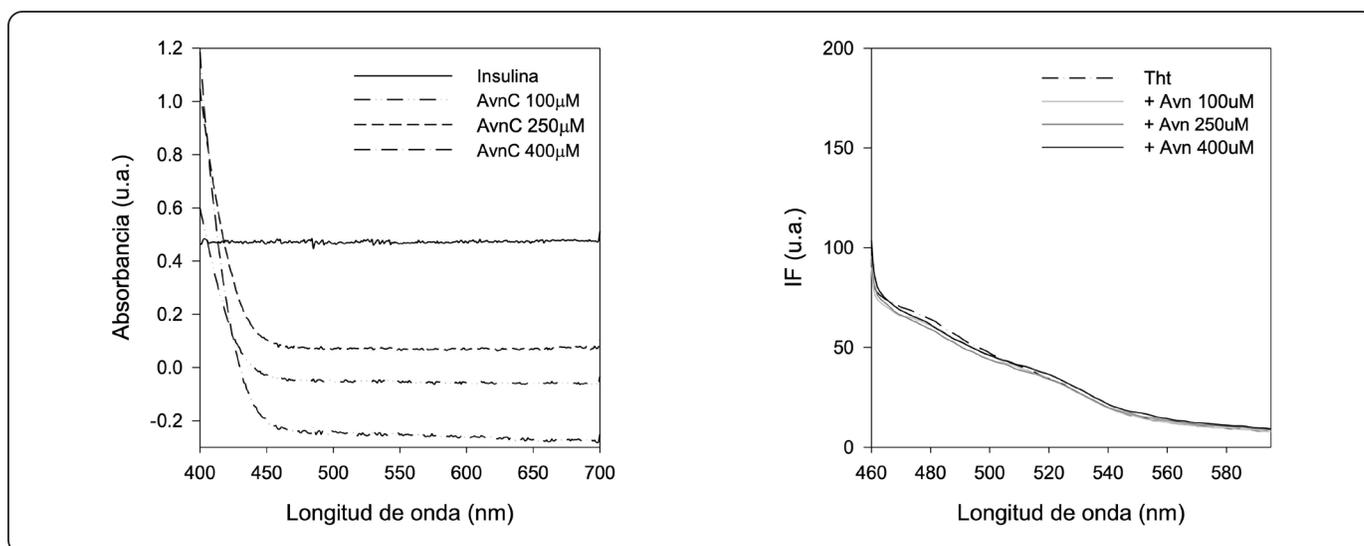


Figura 2. Espectros de absorbancia de la insulina y la Avn-C a las concentraciones utilizadas en este trabajo. Los espectros muestran que no se produce dispersión debido a la limitada solubilidad de los compuestos (panel izquierdo). Espectros de fluorescencia de la insulina y la Avn-C excitados a 440nm, ninguno de ellos produce emisión a 480nm, donde la ThT muestra el pico de fluorescencia asociado a los amiloides (panel derecho).

marcada disminución en la intensidad de la fluorescencia en la sonda conforme se aumenta la concentración de Avn-C en la muestra. Estos resultados indican que la Avn-C reduce la exposición de los residuos hidrofóbicos de los amiloides de insulina. Es probable que esto se deba a la capacidad del

polifenol de interactuar con las regiones hidrofóbicas de la proteína y que esté relacionado con su potencial inhibitorio frente a la fibrilación de insulina (Das *et al.*, 2020). Los controles realizados en ausencia de la insulina no mostraron fluorescencia significativa de ANS en presencia de la Avn-C en las mismas condiciones experimentales.

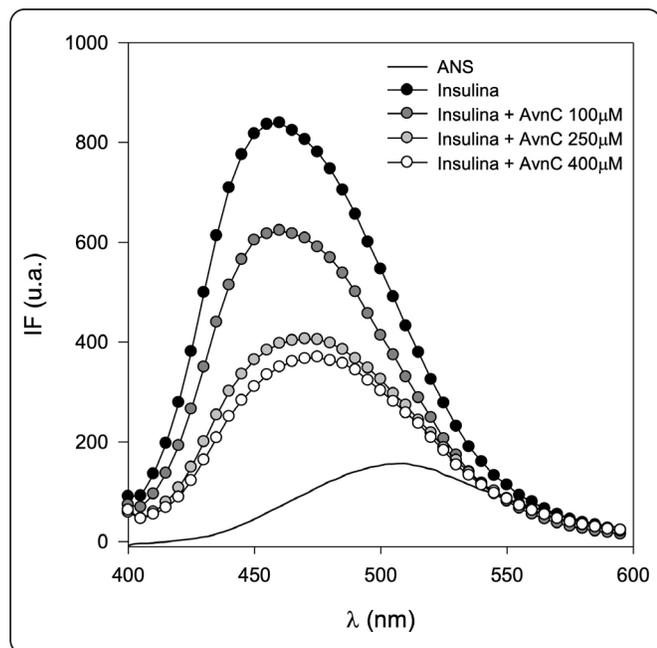


Figura 3. Espectros de fluorescencia ANS de la insulina (0.5µM) incubada a 60°C durante 8 h en ausencia y presencia de Avn-C (100, 250 y 400 µM). Los datos que se muestran corresponden al promedio de tres experimentos realizados de manera independiente.

### Pérdida de la fluorescencia intrínseca de la insulina

La fluorescencia intrínseca de una proteína se debe a la presencia de residuos aromáticos en su estructura y se utiliza para estudiar la interacción proteína/ligando (Alam *et al.*, 2017). La insulina humana tiene 4 residuos de tirosina que se usan como fluoróforos, ya que tienen un máximo de absorción a la  $\lambda=276\text{nm}$ . Los fluoróforos son capaces de interactuar con otras moléculas presentes en una solución y debido a esas interacciones presentan el fenómeno conocido como pérdida de la fluorescencia o *quenching*, que consiste en la falta de emisión fluorescente siempre y cuando exista contacto molecular entre un fluoróforo y un *quencher* o apagador. En la Figura 4A se observa que la adición de concentraciones crecientes de Avn-C (0–20µM) sobre una concentración fija de insulina dan lugar a una disminución gradual en la intensidad de la fluorescencia, sin que se observe un desplazamiento significativo en la longitud de onda de emisión lo que significa que, la interacción entre la Avn-C y la insulina desactiva o apaga la fluorescencia intrínseca de la proteína. El mecanismo de interacción entre este tipo de moléculas se clasifica como estático o dinámico. En el *quenching* estático, se forma un complejo fluoróforo/*quencher* en donde tras ocurrir la absorción de energía por parte del complejo, ésta regresa al estado fundamental sin la emisión de un fotón. Cuando la desactivación resulta de un choque entre el *quencher* y el fluoróforo, el mecanismo es dinámico.

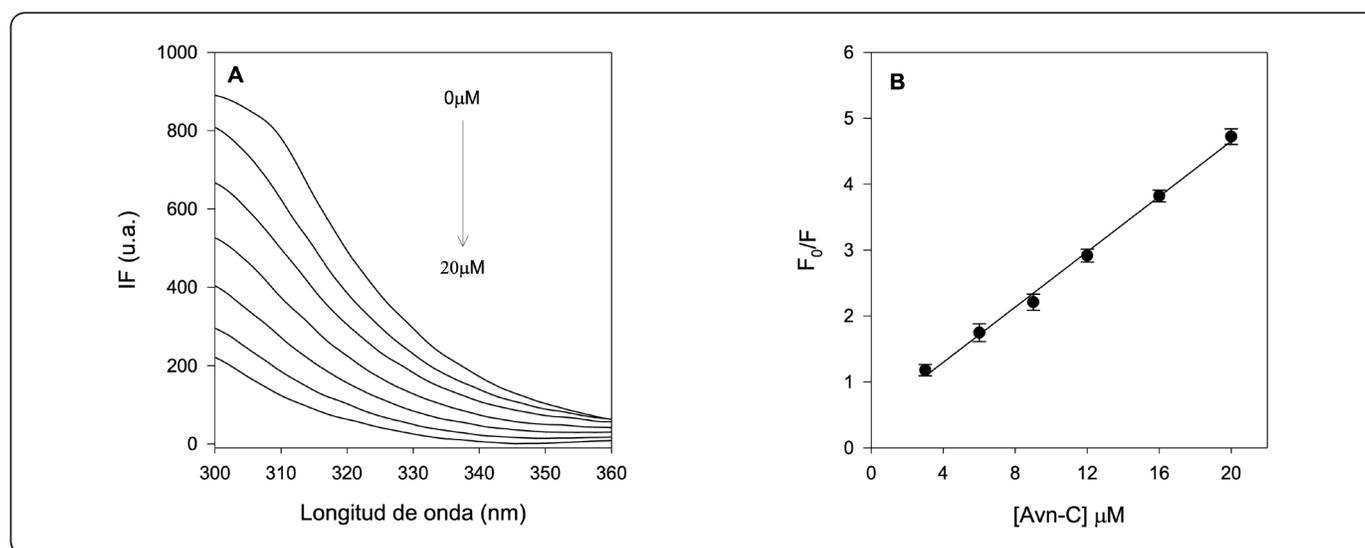


Figura 4. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la insulina (8µM) por Avn-C. A) Espectros de emisión de fluorescencia de la insulina en función de concentraciones crecientes de Avn-C, de 0 (línea superior) a 20 µM (línea inferior). B) Gráfico de Stern-Volmer contra diferentes concentraciones del polifenol.

Los datos de *quenching* de la fluorescencia en presencia del polifenol se analizaron mediante la gráfica de Stern-Volmer y, como se observa en la Figura 4B, se obtuvo una relación lineal. La pendiente de la gráfica se denomina constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) interpretada como la constante de unión del complejo insulina/Avn-C con un valor de  $7 \times 10^4 \text{ mL mol}^{-1}$ . A partir de este valor se calculó la constante de *quenching* ( $K_q$ ) asumiendo que el valor conocido para la fluorescencia del triptófano en biopolímeros y en ausencia de un *quencher* ( $t_0$ ) es de  $10^{-8} \text{ s}$  (Lakowicz, 2006). El valor resultante fue  $K_q = 7 \times 10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y, debido a que el valor de  $K_q$  es mayor a  $2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , se trata de un mecanismo estático.

Se ha reportado que es posible inhibir la formación de amiloides proteicos al emplear compuestos aromáticos policíclicos que la previenen debido a la presencia de varios grupos -OH en su estructura. Los grupos -OH interactúan con la insulina a través de interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno que la estabilizan, como la curcumina y el EGCG (Gong *et al.*, 2014). La curcumina, una molécula natural que se encuentra en la cúrcuma, ayuda si se usa en concentraciones micromolares, aunque tiene la desventaja de que es relativamente insoluble en soluciones acuosas a temperatura ambiente. Los estudios de acoplamiento molecular revelan que, el posible sitio de interacción entre la insulina y la curcumina es la cadena B de la proteína (Rabiee *et al.*, 2013). Por otra parte, el EGCG que se encuentra principalmente en el té verde, inhibe parcialmente la formación de amiloides de insulina si se emplea un pH ácido (Dubey, Anand, Shekhawat & Kar, 2017) mientras que, a pH neutro, actúa como un puente y se asocia con la forma tetramérica o hexamérica de la insulina, lo que ralentiza su desnaturalización y por tanto su capacidad para formar amiloides (Nie, Zhu, Peng, Ge & Li, 2016). Estudios de *docking* molecular realizados previamente en nuestro laboratorio, mostraron que la avenantramida-C interactúa con la cadena B de la insulina a través de la formación de puentes de hidrógeno tal y como ocurre con la curcumina, lo que sugiere que el principal polifenol de la avena podría estabilizar la forma hexamérica y de cierta forma impedir la formación de amiloides de insulina.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la avenantramida-C es una molécula con potencial terapéutico para inhibir la formación de amiloides de insulina debido a su capacidad para interactuar y formar un complejo con esta proteína, al lograr disminuir los sitios hidrofóbicos disponibles para la asociación de monómeros proteicos. Si bien es esencial realizar más investigaciones para aclarar si el polifenol estabiliza la estructura nativa alfa-helicoidal de la insulina o bien su forma hexamérica, consideramos que estos resultados son importantes para el diseño racional de posibles terapias antiamiloidogénicas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto ProACTI con clave 36-MCS-2024.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- Alam, P., Beb, A.Z., Siddiqi, M.K., Chaturvedi, S.K., Rajpoot, R.K., Ajmal, M.R., Zaman, M., Abdelhameed, A.S. & Khan, R.H. (2017). Ascorbic acid inhibits human insulin aggregation and protects against amyloid induced cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **621**, 54-62. DOI: 10.1016/j.abb.2017.04.005
- Das, A., Gangarde, Y.M., Tomar, V., Shinde, O., Upadhyay, T., Alam, S., Ghosh, S., Chaudhary, V. & Saraogi, I. (2020). Small-molecule inhibitor prevents insulin fibrillogenesis and preserves activity. *Molecular pharmaceutics*, **17**, 1827-1834. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01080
- Dubey, K., Anand, B.G., Shekhawat, D.S. & Kar, K. (2017). Eugenol prevents amyloid formation of proteins and inhibits amyloid-induced hemolysis. *Scientific Reports*, **7**, 40744-40754. DOI: 10.1038/srep40744
- Gancar, M., Kurin, E., Bednarikova, Z., Marek, J., Mucaji, P., Nagy, M. & Gazova, Z. (2020). Amyloid aggregation of insulin: An interaction study of green tea constituents. *Scientific Reports*, **10**, 9115-9126. DOI: 10.1038/s41598-020-66033-6
- Gong H., He, Z., Peng, A., Zhang, X., Cheng, B., Sun, Y., Zheng, L. & Huang, K. (2014). Effect of several quinones on insulin aggregation. *Scientific Reports*, **4**, 5648-5655. DOI: 10.1038/srep05648
- Hudson, S.A., Ecroyd, H., Kee, T.W. & Carver, J.A. (2009). The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *The FEBS Journal*, **276**, 5960-5972. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x
- Iannuzzi, C., Borriello, M., Portaccio, M., Irace, G. & Sirangelo, I. (2017). Insights into insulin fibril assembly at physiological and acidic pH and related amyloid intrinsic fluorescence. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 2551-2564. DOI: 10.3390/ijms18122551
- Jarosinski, M.A., Dhayalan, B., Chen, Y., Chatterjee, D., Varas, N. & Weiss, M.A. (2021). Structural principles of insulin formulation and analog design: A century of innovation. *Molecular Metabolism*, **52**, 101325-101343. DOI: 10.1016/j.molmet.2021.101325
- Jayamani, J., Shanmugam, G., Ramaprasad, E. & Singam, A. (2014). Inhibition of insulin amyloid fibril formation by ferulic acid, a natural compound found in many vegetables and fruits. *Royal Society of Chemistry Advances*, **4**, 62326-62336. DOI: 10.1039/c4ra11291a

- Lakowicz, J.R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3<sup>rd</sup> edition. Baltimore, MD. Springer pp 277-282.
- Nie, R., Zhu, W., Peng, J. Ge, Z. & Li, C. (2016). A-type dimeric epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a more potent inhibitor against the formation of insulin amyloid fibril than EGCG monomer. *Bichimie*, **125**, 204-212. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.03.011
- Okamura, S., Hayashino, Y., Kore-Eda, S. & Tsujii, S. (2013). Localized amyloidosis at the site of repeated insulin injection in a patient with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **36**, e200. DOI: 10.2337/dc13-1651
- Qafary, M., Rashno, F., Khajen, K., Khaledi, M. & Moosavi-Movahedi, A. (2022). Insulin fibrillation: Strategies for inhibition. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **175**, 49-62. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2022.09.001
- Quiroz Vázquez, M.G., Montiel Condado, D., Gonzalez Hernandez, B. & Gonzalez-Horta, A. (2020). Avenantramide-C prevents amyloid formation of bovine serum albumin. *Biophysical Chemistry*, **263**, 106391-106399. DOI: 10.1016/j.bpc.2020.106391
- Rabiee, A., Ebrahim-Habibi, A., Ghasemi, A. & Nemat-Gorgani, M. (2013). How curcumin affords effective protein against amyloid fibrillation in insulin. *Food and Functio*, **4**, 1474-1480. DOI: 10.1039/c3fo00019b
- Reinke, A.A. & Gestwicki, J.E. (2007). Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility. *Chemical Biology & Drug Design*, **70**, 206-215. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2007.00557.x.
- Weber, C., Kammerer, D., Streit, B. & Licht, A. (2015). Phenolic excipients of insulin formulations induce cell death, pro-inflammatory signaling and MCP-1 release. *Toxicology Reports*, **2**, 194-2020. DOI: 10.1016/j.toxrep.2014.11.019
- Younan, N.D. & Viles, J.H. (2015). A comparison of three fluorophores for the detection of amyloid fibers and prefibrillar oligomeric assemblies. Tht (Thioflavin T) ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid) and bisANS (4,4-Dianilino-1,1-binaphthyl-5,5-disulfonic acid). *Biochemistry*, **54**, 4297-4306. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00309
- Ziaunys, M., Mikalauskaite, K., Sakalauskas, A. & Smirnovas, V. (2024). Study of insulin aggregation and fibril structure under different environmental conditions. *International Journal of Molecular Science*, **25**, 9406-9422. DOI: 10.3390/ijms25179406