

Effetti citotossici dei rimedi ultradiluiti su cellule cancerose del seno

Titolo originale: *Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells*, International Journal of Oncology 36: 395-403, 2010. Traduzione di Elisa Mastromatteo

RIASSUNTO

L'uso di prodotti naturali ultradiluiti nel trattamento delle malattie e del cancro ha generato molto interesse e molte controversie. Abbiamo condotto uno studio in vitro per determinare se i prodotti prescritti da una clinica in India abbiano qualche effetto sulle linee cellulari cancerose del seno. Abbiamo studiato quattro rimedi ultradiluiti (Carcinosin, Phytolacca, Conium e Thuja) contro due linee cellulari umane di adenocarcinoma del seno (MCF-7 e MDA-MB-231) e una linea cellulare derivata da normali cellule epiteliali mammarie umane (HMLE: human mammary epithelial cells) immortalizzate. Questi rimedi hanno esercitato degli effetti citotossici preferenzialmente contro le linee cellulari cancerose del seno, causando il rallentamento/arresto e l'apoptosi del ciclo cellulare. Questi effetti sono stati accompagnati da un'alterata espressione delle proteine regolatrici del ciclo cellulare, incluse una sottoregolazione dell'Rb fosforilata e una sovraregolazione dell'inibitore di CDK p27, che sono state probabilmente responsabili del rallentamento/arresto del ciclo cellulare come dell'induzione della cascata apoptotica che si è manifestata nell'attivazione del caspasi 7 e nel clivaggio della PARP nelle cellule trattate. I risultati dimostrano un'attività biologica di questi prodotti naturali quando presenti in dosi ultradiluite. Ulteriori e approfonditi studi con l'utilizzo di più linee cellulari e di modelli animali indagheranno l'applicabilità clinica di questi agenti.

PAROLE CHIAVE

Cancro al seno, cellule cancerose del seno, ciclo cellulare, apoptosi, omeopatia, cura del cancro, medicina alternativa, medicina complementare, medicina integrativa, oncologia integrativa

ABSTRACT

The use of ultra-diluted natural products in the management of disease and treatment of cancer has generated a lot of interest and controversy. We conducted an in vitro study to determine if products prescribed by a clinic in India have any effect on breast cancer cell lines. We studied four ultra-diluted remedies (Carcinosin, Phytolacca, Conium and Thuja) against two human breast adenocarcinoma cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) and a cell line derived from immortalized normal human mammary epithelial cells (HMLE). The remedies exerted preferential cytotoxic effects against the two breast cancer cell lines, causing cell cycle delay/arrest and apoptosis. These effects were accompanied by altered expression of the cell cycle regulatory proteins, including downregulation of phosphorylated Rb and upregulation of the CDK inhibitor p27, which were likely responsible for the cell cycle delay/arrest as well as induction of the apoptotic cascade that manifested in the activation of caspase 7 and cleavage of PARP in the treated cells. The findings demonstrate biological activity of these natural products when presented at ultra-diluted doses.

Further indepth studies with additional cell lines and animal models are warranted to explore the clinical applicability of these agents.

KEYWORDS

Breast cancer, breast cancer cells, cell cycle, apoptosis, homeopathy, cancer care, alternative medicine, complementary medicine, integrative medicine, integrative oncology.

INTRODUZIONE

L'uso di erbe, minerali, vitamine, rimedi omeopatici e altre medicine complementari e alternative (MCA, o CAM: Complementary and Alternative Medicine) è in crescita a livello mondiale, e i pazienti col cancro stanno progressivamente optando per trattamenti con regimi terapeutici MCA (1-3). La sicurezza e l'efficacia di molti approcci MCA non è stata adeguatamente studiata, soprattutto nella cura del cancro. Per questo l'Istituto Nazionale per il Cancro degli Stati Uniti (NCI: National Cancer Institute) ha sviluppato il programma Serie dei Casi Migliori invitando i praticanti MCA a livello mondiale a presentare

le loro esperienze cliniche e i loro 'casi migliori' nell'uso della medicina alternativa nel trattamento del cancro, con l'obiettivo di sviluppare ulteriore ricerca in direzione di una rigorosa conferma scientifica.

Nel 1999 l'NCI valutò un protocollo per il trattamento del cancro sviluppato alla Fondazione P. Banerji per la Ricerca Omeopatica (PBHRF: P. Banerji Homeopathic Research Foundation) di Kolkata, India. Il 'protocollo Banerji' usava specifiche sostanze naturali ultradiluite per trattare pazienti con differenti tipi di cancro. L'NCI riesaminò 10 pazienti trattati secondo il protocollo Banerji. In quattro dei casi di cancro polmonare e esofageo l'NCI confermò delle risposte parziali (4). Tutti i pazienti riesaminati avevano una patologia e studi di imaging adatti a confermare la diagnosi e la risposta. I pazienti ricevettero soltanto i rimedi prescritti alla clinica PBHRF e nessun ulteriore trattamento convenzionale, quale chirurgia, radiazioni o chemioterapia. Dopo una rigorosa valutazione l'NCI concluse che c'era un'evidenza di efficacia sufficiente a permettere ulteriore ricerca del protocollo Banerji. Come documentato dalla clinica, 21.888 pazienti con tumori maligni trattati soltanto secondo il protocollo Banerji vennero seguiti alla PBHRF tra il 1990 e il 2005. Dei pazienti, 941 avevano il cancro al seno. I medici della clinica registrarono che nel 19% dei pazienti i tumori maligni regredirono completamente, e nel 21% i tumori rimasero stabili o progredirono con il trattamento. Per i pazienti con tumore stabile i controlli di follow-up proseguirono per almeno 2 anni e fino a un massimo di 10 (5).

Nel 2003 Pathak *et al.* registrarono che una dose ultradiluita del rimedio omeopatico *Ruta graveolens*, comunemente prescritto come agente terapeutico standard del protocollo Banerji

per il cancro del cervello, aveva indotto la morte in maniera selettiva nelle cellule di glioblastoma multiforme, promuovendo al contempo la proliferazione dei normali linfociti del sangue periferico (6).

Da quando quei risultati sono stati resi pubblici, abbiamo notato che i pazienti che vengono alla Clinica di Medicina Integrativa M.D. Anderson (M.D. Anderson's Integrative Medicine Clinic) già usano l'omeopatia o hanno un marcato interesse ad integrare questo trattamento con le loro terapie convenzionali, perché gli agenti non sono tossici e sono facili da usare. Gran parte delle informazioni sull'uso di questi agenti è disponibile ai pazienti su Internet e tramite gruppi di sostegno, e molti dei prodotti possono essere acquistati nei negozi di integratori alimentari, nei supermercati o da venditori online.

Considerando il crescente interesse nel protocollo Banerji tra i pazienti della nostra clinica, molti dei quali con cancro al seno in stato avanzato, abbiamo deciso di valutare l'effetto *in vitro* di quei rimedi. In questo studio abbiamo messo a confronto gli effetti di quattro medicinali ultradiluiti in due ben definite linee cellulari cancerose del seno umano e in una linea cellulare epiteliale mammaria umana immortalizzata cresciuta *in vitro*.

MATERIALI E METODI

Sostanze. I rimedi ultradiluiti usati dalla PBHRF sono stati ottenuti dai Laboratori Sharda Boiron Ltd India e altri simili rimedi dalla Standard Homeopathic Company (King of Prussia, PA, USA). Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e ripetuti almeno due volte per ogni tipo di rimedio. I rimedi usati e le loro diluizioni erano gli stessi prescritti dalla PBHRF per il trattamento

del cancro umano del seno: *Carcinosin*, 30C; *Conium maculatum*, 3C; *Phytolacca decandra*, 200C e *Thuja occidentalis*, 30C. I rimedi sono stati diluiti con un 87% di alcool neutro supplementare, chiamato 'solvente'. Il solvente è stato anche preso in esame per i suoi effetti sulle cellule, sia per se stesso che dopo essere stato processato attraverso un processo del metodo di succussione, simile a quello usato per ottenere le diluizioni (ovvero la potenza) dei rimedi.

Cromatografia con liquido ad alta prestazione (High-performance liquid chromatography, HPLC) per l'individuazione di componenti chimici in rimedi ultradiluiti. I rimedi ultradiluiti possono contenere molti costituenti chimici, poiché sono derivati da estratti di cellule vegetali e animali. I rimedi sono stati perciò sottoposti a fingerprinting tramite HPLC per identificare i costituenti. Il fingerprinting è stato attuato con i sistemi di Waters Delta 600 HPLC (Waters Co., Milford, MA) dotati di una pompa erogatrice di solvente, una Waters 717 plus autosampler, e un rivelatore a serie di fotodiadi Waters 2996. La separazione cromatografica è stata raggiunta usando una colonna C18 (5,0 m, 250x4,6 mm) (Agilent) con una cartuccia pre-colonna (5,0 m, 20x3,9 mm I.D.). La fase mobile consisteva di metanolo (A) e acqua (B), e la separazione è stata raggiunta usando un gradiente lineare di 10-90% di metanolo con un tempo di scarto tra una iniezione e la successiva di 60 minuti. L'indice di fluidità era di 1 ml/min. Le lunghezze d'onda di rivelazione erano di 254 e 220 nm. Tutti i campioni sono stati processati alle stesse condizioni e avevano la medesima scala di 0,2 unità astronomiche.

Linee cellulari. Due linee cellulari di un adenocarcinoma umano del seno, MCF-7 e MDA-MB-231, sono state prese dalla American Tissue Culture Collec-

1. INTEGRATIVE MEDICINE PROGRAM; 2. DEPARTMENT OF MOLECULAR PATHOLOGY; 3. DEPARTMENT OF MELANOMA MEDICAL ONCOLOGY, THE UNIVERSITY OF TEXAS M.D. ANDERSON CANCER CENTER, HOUSTON, TX, USA; 4. P. BANERJI HOMEOPATHIC RESEARCH FOUNDATION, KOLKATA, INDIA.

Corrispondenza:

Dr Moshe Frenkel, Integrative Medicine Program-Unit 145, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd., Houston, TX 77030-4009, USA – frenkelm@netvision.net.il; mshfrenkelmd@gmail.com.

Dr Prasanta Banerji and Dr Pratip Banerji, PBH Research Foundation, 10/3/1 Elgin Road, Kolkata-700 020, India – info@pbhfindia.org; pbhfrf@vsnl.com.

tion (Manassas, VA). Le cellule MCF-7 contengono lo wild-type del gene p53 e sono estrogeno- e progesterone-recettore positive, mentre le cellule MDA-MB-231 contengono un gene p53 mutante e sono estrogeno- e progesterone-recettore negative. Le cellule sono state coltivate nel medium di Eagle modificato di Dulbecco addizionato di un 10% di siero fetale bovino sottoposto a disattivazione termica (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA), un 1% di L-glutammina (Invitrogen, Carlsbad, CA) e un 1% di pen-strep (Invitrogen). Una linea cellulare di controllo, HMLE, che è stata derivata da normali cellule epiteliali mammarie umane immortalizzate con la sottounità catalitica di telomerase e con gli antigeni SV40 grande T e piccola T, è stata gentilmente fornita dal Dr. Sendurai Mani dell'M.D. Anderson. Le cellule HMLE sono state coltivate in un rapporto 1:1 di medium di Eagle modificato di Dulbecco: Ham's F12 (Mediatech, Manassas, VA) e il Medium di Crescita delle Cellule Epiteliali Mammarie (Lonza, Allendale, NJ); la coltura è stata addizionata di 2,5 g/ml di insulina (Sigma), 5 ng/ml di Fattore di Crescita Epidermale umano (Sigma) e 250 ng/ml di idrocortisone (Sigma). Tutte le linee cellulari sono state messe in incubazione a 37°C in un'atmosfera di 5% di CO₂ e 95% di aria.

Saggio al bromuro di metiltiazolidifenil-tetrazolio (MTT). Le linee cellulari sono state analizzate rispetto alla vitalità cellulare con un saggio MTT. All'incirca 5.000 cellule cresciute in triplicato in piatti matrice a 96 pozzi per 24 ore sono state trattate coi rimedi per 24, 48, 72 e 96 ore. Per determinare la vitalità cellulare, 50 l di MTT (5 mg/ml) sono stati aggiunti alle cellule al buio e in condizioni sterili per 2 ore a 37°C. Dopo 2 ore il medium è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 l di dimetil solfossido. I piatti matrice sono stati sotto-

posti a incubazione a temperatura ambiente per 8-10 minuti. L'assorbanza a OD 570 nm è stata poi misurata tramite un lettore di piastra di analisi di immunosorbente enzima-collegato.

Preparazioni citologiche e ibridazione in situ in fluorescenza (FISH: fluorescence in situ hybridization). Le colture cellulari trattate con i rimedi e quelle di controllo sono state trattate con 0,04 l/ml di colcemid (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) per circa 1 ora a 37°C e poi processate per preparazione cromosomica a seguito di un breve trattamento ipotonico in uno 0,9% di citrato di sodio e della fissazione in una soluzione 3:1 di metanolo e acido acetico. Le lastre sono state asciugate all'aria e impregnate con impregnante Giemsa, e le colture sono state esaminate relativamente ai loro indici mitotici. Le lastre sono state anche processate per FISH usando un probe telomerico di acido peptido nucleico marcato al Cy-3 (Dako Corporation, Carpinteria, CA), secondo le indicazioni del produttore. Almeno 200 cellule, tra i campioni trattati e quelli non trattati, sono state analizzate per l'indice mitotico e per i segnali di DNA telomerico con un microscopio Nikon Eclipse 80i dotato di un dispositivo digitale monocromatica Photometrics ColSNAP HQ2.

Citometria di flusso per l'esame della distribuzione del ciclo cellulare e della popolazione subdiploide. La progressione del ciclo cellulare e la sua apoptosi sono state analizzate con un'analisi di separazione cellulare attivata a fluorescenza (FACS: fluorescence activated cell sorting). All'incirca 1x10⁶ sia delle cellule di controllo che di quelle trattate coi rimedi sono state tripsinate, lavate due volte con salina a tampone fosfato fredda (1X PBS) e fissate in 2 ml di et-

nolo ghiacciato (70%) per tutta la notte a 4°C. Le cellule fissate sono state lavate due volte con 1X PBS e poi incubate con 1 ml di PBS, contenente 20 g/ml di RNasi e 50 g/ml di propidio-iodidio (PI), per 30 minuti a 37°C. Le cellule impregnate sono state analizzate usando un contacellule Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Brea, CA).

Rilevamento di apoptosi tramite marcatura con annexin V e citometria di flusso. Le cellule trattate e quelle di controllo (ca. 1x10⁶ per gruppo) sono state coltivate in piatti di 60 mm per 72 ore. Sia le cellule in sospensione che quelle aderenti sono state raccolte tramite centrifuga a 1.200 rpm per 5 minuti a 4°C. Il pellet cellulare è stato lavato una volta con 1X PBS fredda. Il pellet è stato risospeso in 500 l di TBS/Ca²⁺ [20 mM di Tris più 150 mM di NaCl (pH 7.4) e 2 mM di Ca²⁺]. Poi sono stati aggiunti alla soluzione 25 l di annexin V/PI soluzione (Trevigen, Gaithersburg, MD) e il tutto è stato lasciato in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente. La reazione è stata analizzata tramite FACS a una lunghezza d'onda di emissione di circa 525 nm con un laser blu per l'impregnamento da annexin V-fluoresceina isotiocianato (FITC) e a una lunghezza d'onda di emissione di circa 620 nm con un laser rosso per l'impregnamento da PI.

Immunoblotting. L'espressione delle proteine associate con la regolazione del ciclo cellulare e con l'apoptosi è stata rilevata tramite analisi Western blot delle cellule trattate e di controllo. Per l'analisi del ciclo cellulare abbiamo usato anticorpi contro le proteine regolatrici del ciclo cellulare ciclina D1, ciclina D3, chinasi 4 ciclina-dipendente (CDK4), chinasi 6 ciclina-dipendente (CDK6), p27 (un inibitore di CDK) e la forma fosforilata della proteina Rb,

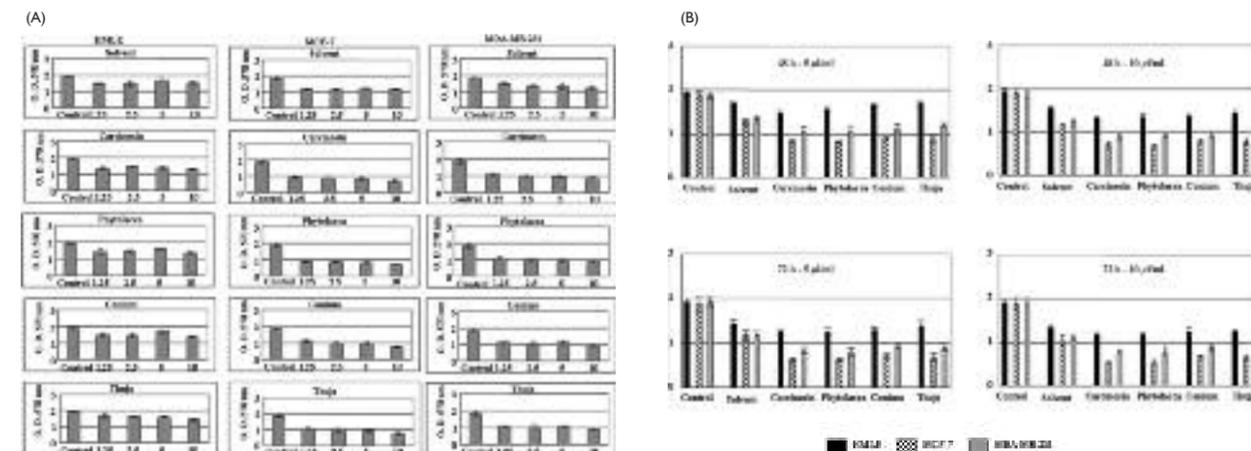


Figura 1. (A) Saggio di vitalità al bromuro di metiltiazolidifenil-tetrazolio (MTT) delle cellule HMLE, MCF-7 e MDA-MB-231 a seguito di trattamenti con solvente, Carcinosin, Phytolacca, Conium e Thuja per 48 ore a varie concentrazioni (0; 1,25; 2,5; 5 e 10 µl/ml). I valori sono stati ottenuti in esperimenti indipendenti attuati in triplicato e sono stati rappresentati come media ± errore standard vs. controllo (barre). (B) Saggio MTT per la vitalità delle cellule trattate con 5 e 10 µl/ml di solvente, Carcinosin, Phytolacca, Conium e Thuja per 48 e 72 ore. I valori sono stati ottenuti in esperimenti indipendenti attuati in triplicato e sono presentati come media errore standard (barre) vs. controllo.

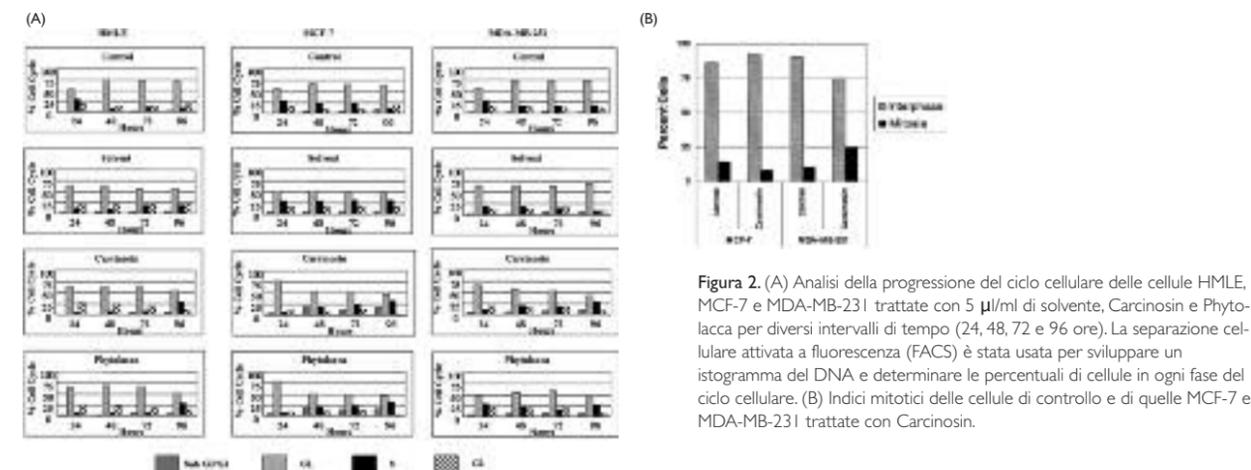


Figura 2. (A) Analisi della progressione del ciclo cellulare delle cellule HMLE, MCF-7 e MDA-MB-231 trattate con 5 µl/ml di solvente, Carcinosin e Phytolacca per diversi intervalli di tempo (24, 48, 72 e 96 ore). La separazione cellulare attivata a fluorescenza (FACS) è stata usata per sviluppare un istogramma del DNA e determinare le percentuali di cellule in ogni fase del ciclo cellulare. (B) Indici mitotici delle cellule di controllo e di quelle MCF-7 e MDA-MB-231 trattate con Carcinosin.

mentre per analizzare la risposta apoptotica sono stati usati anticorpi contro le proteine associate all'apoptosi poli (ADP-ribosio), polimerasi (PARP) e caspasi 7 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Per isolare le proteine totali, i pellet cellulari sono stati lavati una volta con 1X PBS ghiacciata e poi risospesi in 100 l di soluzione litica lysis buffer fredda (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,1 mM fenilmetilsulfonil fluorato, 1 mM acido etilen-diammino tetracetico, 1% Triton, X-100, 0,5% sodio deossicolato, 0,1%

sodio dodecilsolfato (SDS), 0,5 mg di cocktail di inibitori di proteasi Complete), omogeneizzati e centrifugati. Le concentrazioni di proteine sono state determinate usando un kit di analisi delle proteine Bio-Rad (Richmond, CA). Quantità equivalenti di proteina cellulare totale (50 g) sono state sospese in sample buffer 1X (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% glicerolo, 0,1% blu di bromofenolo e 1% -mercaptoetanolo) e denaturate tramite ebollizione per 5 minuti. I campioni preparati sono stati risolti con elet-

troforesi su 10% di gel di SDS-poliacrilamide e trasferiti su una membrana nitrocellulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Le membrane sono state poi incubate con gli anticorpi designati per tutta la notte a 4°C. Le membrane sono state successivamente incubate per 1 ora con l'anticorpo immunoglobulina anti-coniglio G coniugato alla perossidasi di cavallo e visualizzate utilizzando kit di chemiluminescenza di tipo avanzato (GE Healthcare, Bucks, UK).

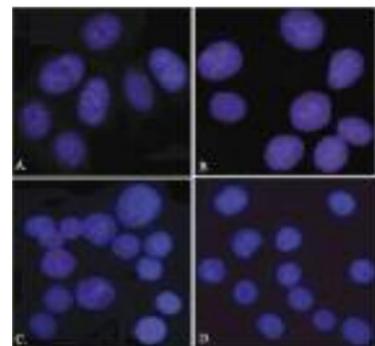


Figura 3. (A) Immagini rappresentanti l'ibridazione in situ in fluorescenza del DNA telomerico delle cellule MCF-7 non trattate. (B) Cellule MCF-7 trattate con Carcinisin. (C) Cellule MDA-MB-231 non trattate. (D) Cellule MDA-MB-231 trattate con Carcinisin. Le cellule trattate sono state esposte a 5 µl/ml di Carcinisin per 72 ore.

RISULTATI

Fingerprinting cromatografico. Il solvente ha mostrato un solo picco distinto, eluito a circa 2 minuti, nel cromatogramma. Per determinare se la succussione avesse causato qualche cambiamento chimico nel solvente, abbiamo messo a confronto i profili di fingerprinting del solvente prima e dopo la succussione. Il cromatogramma dei solventi trattati e non trattati è apparso identico, a indicare che la succussione non aveva causato cambiamenti chimici nel solvente. Tutti e quattro i rimedi avevano dei cromatogrammi HPLC molto simili tra loro, con soltanto piccolissime quantità di numero limitato di picchi. I rimedi non erano significativamente distinti dal solvente e non avevano il picco distinto visto nel solvente. *I rimedi ultradiluiti riducono la vitalità delle cellule dell'adenocarcinoma umano del seno.* Come mostrato nella fig. 1A, il solvente ha ridotto la vitalità di tutti e tre i tipi di cellule; la riduzione complessiva nelle cellule a dosi differenti di solvente è stata all'incirca del 30% per le cellule MCF-7, del 20-30% per quelle MDA-MB-231 e del 20% per quelle HMLE. Curiosamente, gli effetti inibitori dei rimedi sulla vitalità delle cellule, sia in quelle MCF-7 che in quelle MDA-MB-231, sono stati

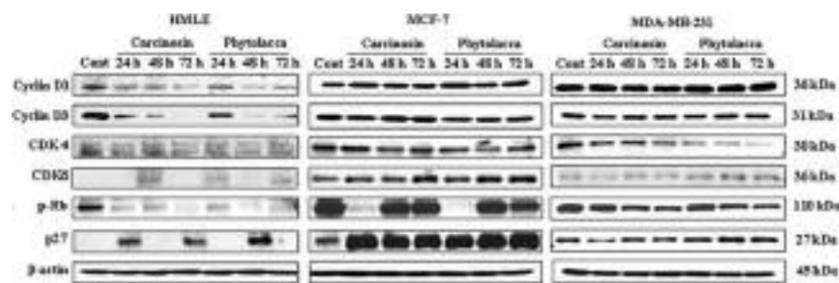


Figura 4. Analisi Western blot delle proteine regolatrici del ciclo cellulare nelle cellule HMLE, MCF-7 e MDA-MB-231, trattate con 5 µl/ml di Carcinisin o Phytolacca per diversi periodi di tempo (24, 48 e 72 ore). Il caricamento delle proteine è stato verificato attraverso la rilevazione di β-actina negli stessi gel.

chiaramente maggiori per ciascuna delle dosi sottoposte a test rispetto a quelli visti nelle cellule trattate solo con solvente. Le cellule MCF-7 sono state trovate più sensibili a tutti e quattro i rimedi rispetto a quelle MDA-MB-231 (fig. 1A, pannelli 2 e 3). Gli effetti inibitori dei rimedi si sono mostrati anche dose-dipendenti sia per le cellule MCF-7 che per quelle MDA-MB-231, con una inibizione progressivamente maggiore a dosi più elevate (50-75% di perdita di vitalità nelle due linee cellulari). Per indagare se gli effetti inibitori aumentassero in base al tempo di trattamento, abbiamo trattato le cellule con il solvente e i rimedi a concentrazioni di 5 e 10 l/ml per 48 e 72 ore. I risultati hanno rivelato che gli effetti inibitori erano maggiori per il periodo più lungo di trattamento e che è stata causata una più forte inibizione dai rimedi piuttosto che dal solvente. Tra i quattro rimedi presi in esame, *Carcinosin* e *Phytolacca* hanno rivelato in maniera riproducibile degli effetti inibitori relativamente più alti in esperimenti replicati. Questi due rimedi hanno ridotto la vitalità delle cellule MCF-7 per il 60-75% alla dose di 5 l/ml e per il 70-80% alla dose di 10 l/ml, rispettivamente dopo 48 e 72 ore di trattamento. Per le cellule MDA-MB-231 la riduzione è stata del

50-65% a 5 l/ml e del 65-70% a 10 l/ml agli stessi tempi utilizzati per le altre cellule. Dall'altro lato il solvente ha causato una riduzione nella sopravvivenza delle due linee cellulari per il 30-35%, alle stesse condizioni (fig. 1B). In modo incisivo, gli effetti dei quattro rimedi sulla vitalità delle cellule HMLE sono stati quasi indistinguibili da quelli del solo solvente (figg. 1A e 1B). In considerazione del fatto che *Carcinosin* e *Phytolacca* si sono rivelati inibitori relativamente più potenti della sopravvivenza delle cellule cancerose, abbiamo deciso di indagare ulteriormente su questi due rimedi per comprendere i meccanismi responsabili dei loro effetti osservati sulla proliferazione e sulla sopravvivenza delle cellule.

Induzione dell'arresto del ciclo cellulare e della morte cellulare da parte dei rimedi. Abbiamo successivamente esaminato i profili di progressione del ciclo cellulare delle cellule MCF-7, MDA-MB-231 e HMLE trattate con una dose di 5 l/ml di *Carcinosin* e *Phytolacca*. Come mostrato nella fig. 2A, a 24 ore di trattamento con i rimedi le cellule MCF-7 hanno mostrato l'arresto della fase G1 con una concomitante diminuzione nelle popolazioni delle fasi S e G2/M. A

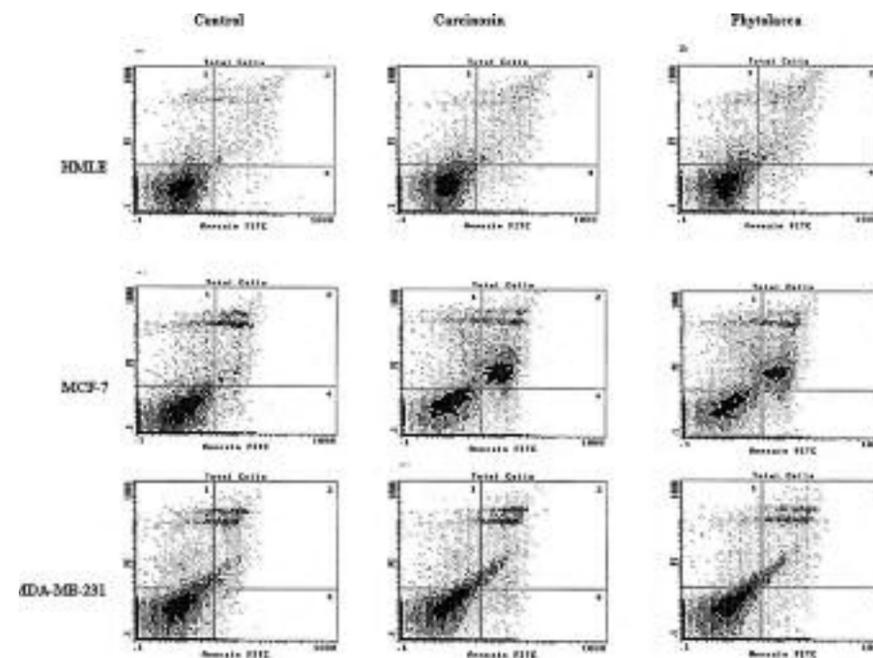


Figura 5. Grafico di densità della risposta apoptotica nelle cellule HMLE, MCF-7 e MDA-MB-231 trattate con 5 µl/ml di Carcinisin o Phytolacca per 72 ore. La risposta apoptotica è stata determinata per mezzo di separazione cellulare attivata a fluorescenza. Le cellule vitali sono nel quadrante inferiore sinistro e le cellule apoptotiche di primo e ultimo stadio sono nei quadranti inferiore destro e superiore destro. Si noti l'aumento nelle cellule MCF-7 e MDA-MB-231 apoptotiche di ultimo stadio.

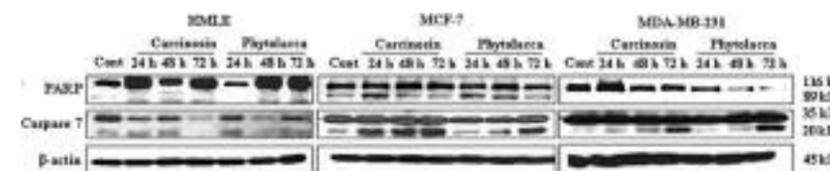


Figura 6. Analisi Western blot del clivaggio di poli (ADP-ribosio) polimerasi e della caspasi 7 clivata attivata nelle cellule HMLE, MCF-7 e MDA-MB-231 trattate con Carcinisin e Phytolacca. Il caricamento delle proteine nel gel è stato verificato attraverso la rilevazione di β-actina.

48 ore e oltre sono apparse distinte popolazioni sub-G0, rappresentanti la morte cellulare, e le cellule della fase G1 sono diminuite. La popolazione sub-G0 ha mostrato un aumento marginale a 96 ore post-trattamento, mentre le cellule della fase S erano aumentate e quelle della fase G2/M erano quasi completamente assenti. Nelle cellule HMLE è stato evidente un arresto relativamente meno pronunciato della fase G1 dopo 24 ore di trattamento sia con il solvente che con i rimedi, mentre è stato visto un arresto o un rallentamento relativamente più grande della

fase G2/M a seguito del trattamento con i rimedi rispetto alle cellule sia trattate che non trattate con il solvente. Una popolazione sub-G0 è diventata evidente a 72 e 96 ore nei campioni trattati, sebbene il picco fosse distintamente più piccolo rispetto alle cellule MCF-7 trattate con i rimedi. I profili del ciclo cellulare delle cellule MDA-MB-231 trattate con i rimedi sono apparsi differenti da quelli delle cellule MCF-7 trattate con i rimedi. Mentre l'arresto di G1 nelle cellule trattate per 24 ore con il solvente e con *Carcinosin* è stato simile a quello visto per le cellule

HMLE, lo stesso non è stato osservato dopo il trattamento con *Phytolacca*. Le cellule trattate con *Phytolacca* hanno presentato un maggiore accumulo nella fase G2/M dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento rispetto alle cellule MCF-7. Picchi di sub-G0 sono stati visibili a 48, 72 e 96 ore, ma questi picchi non sono stati visti nelle cellule non trattate di controllo ed erano maggiori di quelli visti nei campioni trattati col solvente. Un rallentamento o un arresto preferenziale nella crescita delle cellule MDA-MB-231 nella fase G2/M dopo il trattamento coi rimedi è stato rivelato dall'analisi microscopica delle cellule trattate coi rimedi. Il numero di cellule mitotiche era chiaramente elevato nelle cellule MDA-MB-231 trattate rispetto a quelle MCF-7 trattate e a quelle non trattate di controllo (fig. 2B).

Perdita preferenziale di DNA telomerico nelle cellule di adenocarcinoma trattate coi rimedi. Le cellule MCF-7, MDA-MB-231 e HMLE trattate con *Carcinosin* e *Phytolacca* sono state analizzate tramite FISH per quantificare il DNA telomerico. Come mostrato in fig. 3, c'è stata una riduzione significativa nei segnali di DNA telomerico nelle cellule trattate con i rimedi rispetto a quelle non trattate di controllo. I segnali di DNA telomerico nelle cellule HMLE trattate sono stati molto meno interessati rispetto a quelli delle cellule dell'adenocarcinoma. Questa riduzione preferenziale dei segnali di DNA telomerico ha indicato che *Carcinosin* e *Phytolacca* hanno causato la perdita di integrità del genoma, la quale forse ha contribuito all'induzione della morte delle cellule. *Aterati profili di espressione delle proteine regolatrici del ciclo cellulare nelle cellule trattate con Carcinisin e Phytolacca.* Dal momento che le cellule trattate coi rimedi hanno mostrato un rallentamento/arresto del ciclo cellulare, abbiamo analizzato i profili di espressione delle proteine regolatrici del ciclo cellulare nelle cellule

HMLE, MCF-7 e MDA-MB-231 trattate con *Carcinosin* e *Phytolacca* (fig. 4). Le proteine di ciclo cellulare analizzate in questi esperimenti hanno incluso le cicline D1 e D3, CDK4, CDK6, l'Rb fosforilata (pRb) e la p27. Ciascuno dei tre tipi di cellule ha mostrato cambiamenti sia unici che comuni nei profili di espressione delle proteine regolatrici del ciclo cellulare, rispecchiando le alterazioni molecolari del ciclo associate al pathway che erano occorse in risposta ai trattamenti con i rimedi. Nelle cellule HMLE i livelli delle cicline D1 e D3 sono diminuiti significativamente, ma queste cicline non hanno mostrato nessun cambiamento percepibile nell'espressione nelle cellule MCF-7 e MDA-MB-231. I livelli di CDK4 e CDK6 si sono abbassati a 24 ore e poi, a successivi intervalli di tempo, si sono innalzati di poco nelle cellule HMLE. I bassi livelli di espressione delle CDK hanno coinciso con elevati livelli di p27 e bassi livelli di pRb, probabilmente a rispecchiamento del meccanismo di rallentamento/arresto del ciclo cellulare in queste cellule. Nelle cellule MCF-7 e MDA-MB-231, mentre i livelli delle cicline D1 e D3 sono rimasti quasi inalterati nelle cellule trattate, i livelli di CDK4 e CDK6 hanno mostrato modelli di espressione contrastanti a seguito dei trattamenti con i rimedi. Nelle cellule MCF-7 CDK4 e CDK6 sono rimasti elevati a 24 ore, sono diminuiti a 48 e si sono innalzati a 72, mentre nelle cellule MDA-MB-231 i livelli hanno mostrato una diminuzione graduale. Questi cambiamenti minimi nelle CDK in fase G1 nelle cellule MCF-7 hanno coinciso con il loro rallentamento/arresto a questo stadio del ciclo, e la loro diminuzione nelle cellule MDA-MB-231 ha rispecchiato la progressione non inibita attraverso questa fase del ciclo cellulare. In modo interessante, a dispetto del mantenimento dei livelli di CDK4 e CDK6 elevati a 24 ore nelle cellule MCF-7 trattate, il livello del substrato fosforilato, Rb, ha mostrato un netto crollo a 24 ore.

Questo ha coinciso con un'elevata espressione di p27, a indicare che l'induzione di p27 a seguito del trattamento coi rimedi ha giocato un ruolo importante nella regolazione della proliferazione e della vitalità di queste cellule MCF-7 attraverso il ciclo cellulare. Una progressiva diminuzione di pRb nelle cellule MDA-MB-231 dalle 24 alle 72 ore di trattamento coi rimedi, dall'altro lato, ha dimostrato che i rimedi hanno avuto un effetto minimo durante la transizione attraverso la fase G1 di queste cellule. Comunque il crescente livello di p27 attraverso 72 ore di trattamento ha suggerito che l'induzione di questo inibitore di chinasi è responsabile del verificarsi delle risposte citostatiche e citotossiche ai rimedi nelle cellule MDA-MB-231.

Induzione dell'apoptosi e attivazione della cascata apoptotica nelle cellule trattate con Carcinosin e Phytolacca. Per confermare che i rimedi ultradiluiti inducessero l'apoptosi, le cellule HMLE, MCF-7 e MDA-MB-231 trattate con *Carcinosin* e *Phytolacca* per 72 ore sono state impregnate con PI e annexin V-Alexa Fluor 488 e analizzate con FACS.

La fig. 5 mostra che *Carcinosin* e *Phytolacca* hanno aumentato marcatamente la popolazione apoptotica di ultimo stadio, come messo in evidenza dall'aumentato numero di cellule MCF-7 nel quadrante superiore destro dell'istogramma di FACS; l'apoptosi di ultimo stadio è stata più alta anche nelle cellule MDA-MB-231 rispetto a quelle di controllo. In contrasto con questo, i numeri di tali cellule di apoptosi di ultimo stadio sono stati soltanto marginalmente elevati nelle cellule HMLE. Quantitativamente *Carcinosin* e *Phytolacca* hanno aumentato la popolazione delle cellule apoptotiche solo dal 5 al 10% nelle cellule di controllo trattate con solvente. L'aumento nella popolazione delle cellule MCF-7 apoptotiche è stato molto più ampio, andando dal 7% nelle cellule trattate con solvente al 27% e 28%, rispettivamente,

nelle cellule trattate con *Carcinosin* e *Phytolacca*. L'aumento nella popolazione delle cellule apoptotiche nelle cellule MDA-MB-231 trattate con *Carcinosin* e *Phytolacca* è stato meno pronunciato, andando dal 10% nelle cellule di controllo al 18 e 16%, rispettivamente, nelle cellule trattate con *Carcinosin* e *Phytolacca*. Poiché l'iniziazione della cascata apoptotica è associata con la generazione di forme attivate di caspasi clivate così come con il clivaggio della PARP, abbiamo analizzato questi marcatori molecolari di apoptosi nelle cellule HMLE, MCF-7 e MDA-MB-231 trattate con *Carcinosin* e *Phytolacca*. Come mostrato in fig. 6, il trattamento delle cellule MCF-7 ha accelerato la degradazione della PARP, risultante nell'apparizione del frammento di PARP 85-kDa nelle analisi Western blot. Sorprendentemente, nelle cellule MDA-MB-231 la quantità di PARP intatta è diminuita progressivamente con l'aumento del tempo di trattamento, ma la banda clivata 85-kDa non era evidente. Le cellule HMLE hanno mostrato un clivaggio minimo della PARP dopo il trattamento con i rimedi. Inoltre, l'attivazione della cascata apoptotica nelle cellule trattate coi rimedi è risultata evidente dall'apparire della forma attivata di caspasi 7 clivata sia nelle cellule MCF-7 che in quelle MDA-MB-231. Mentre l'attivazione della caspasi 7 è stata minima nelle cellule HMLE trattate, nelle cellule MCF-7 la forma attivata dell'enzima è risultata evidente successivamente alle 24 ore durante il trattamento con *Carcinosin* e a 72 ore di trattamento con *Phytolacca*. Dall'altro lato l'attivazione della caspasi 7 nelle cellule MDA-MB-231 è stata chiaramente rilevabile dopo 72 ore di trattamento con *Carcinosin* e *Phytolacca*. I risultati dimostrano quindi che la cascata apoptotica è stata attivata in maniera preferenziale nelle cellule carcinomatose trattate coi rimedi, rispetto alle cellule normali, e

che l'attivazione nelle cellule cancerose è stata regolata, dal punto di vista temporale, in maniera tipo-specifica.

DISCUSSIONE

I nostri risultati suggeriscono che i rimedi omeopatici ultradiluiti prescritti nel 'protocollo Banerji' esercitano degli effetti citotossici in maniera preferenziale contro le linee cellulari umane di carcinoma del seno MCF-7 e MDA-MB-231. Inoltre, abbiamo scoperto che questi effetti sono il risultato di un'espressione alterata delle proteine regolatrici del ciclo cellulare, che causa il rallentamento/arresto del ciclo cellulare così come l'induzione della morte cellulare tramite l'attivazione della cascata apoptotica. L'inibizione della sopravvivenza e l'induzione della morte cellulare in maniera preferenziale in presenza dei rimedi, rispetto al solvente, e anche la dipendenza di questi effetti dalla dose dei rimedi convalidano la nostra conclusione. Lo studio ha rivelato anche, in maniera importante, che questi rimedi hanno degli effetti relativamente meno tossici sulla sopravvivenza delle cellule derivate da un epitelio mammario normale e inibiscono moderatamente la proliferazione delle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC: peripheral blood mononuclear cells). La proliferazione di CD3 e delle PBMC stimulate da IL-2, saggiata tramite incorporazione di ³H-thymidine, è stata inibita per circa il 10-15% in presenza dei rimedi e per circa il 5% in presenza del solvente (dati non mostrati). L'effetto citotossico di due dei rimedi indagati in questo studio, *Carcinosin* e *Phytolacca*, in maniera interessante è apparso simile all'attività di 0,12 M di paclitaxel (Taxol), il farmaco chemioterapico più comunemente usato per il cancro al seno, quando questo effetto è stato testato nelle due linee cellulari di adenocarcinoma esaminate in questo studio con esperimenti paralleli (dati non mostrati). Mentre è si-

gnificativo che i rimedi abbiano influito negativamente sulla sopravvivenza delle cellule con wild-type del gene p53 e estrogeno-sensibili MCF-7 così come su quella delle cellule MDA-MB-231, con gene p53 mutato ed estrogeno-indipendenti, la scoperta di una suscettibilità differenziale in questi due tipi cellulari indica anche che le attività citotossiche dei rimedi sono dipendenti dal background genetico delle cellule cancerose trattate. In questo contesto è intrigante che in una pubblicazione si sia relazionato di una mancanza di attività inibitoria della crescita *in vitro*, da parte dei rimedi esaminati in questo studio, nella linea cellulare adenocarcinomatosa del seno MDA-MB-231 e in tre altre linee cellulari del cancro della prostata, sebbene gli stessi studiosi avessero precedentemente attestato una significativa attività antitumorale dei rimedi in un modello *in vivo* di cancro della prostata nei ratti (Copenhagen rats) (7). Mentre questi risultati *in vitro* e *in vivo*, apparentemente paradossali, sono in qualche modo sconcertanti e dubbi, i risultati di questo studio offrono una spiegazione determinata meccanicamente a sostegno dei precedentemente osservati effetti antitumorali *in vivo* di questi rimedi, effetti relazionati dall'altro gruppo di ricerca. Vale comunque la pena menzionare il fatto che lo studio *in vitro* pubblicato da questo gruppo di ricerca ha compiuto un'analisi delle alterazioni dell'espressione dei geni a livello di transcript tramite un test di protezione dell'RNAsi, il quale non è tenuto a rilevare i cambiamenti nei profili di espressione delle proteine dei geni regolatori della morte cellulare, osservati invece in questa nostra indagine. La transizione attraverso le fasi del ciclo cellulare è regolata dalle CDK insieme alle cicline specifiche (8). Le cicline D1 e D3 interagiscono con le loro sottounità regolatrici, CDK4 e CDK6, e le chinasi attive fosforilano la proteina Rb per rilasciare i fattori di trascrizione della famiglia

E2F, i quali transattivano i geni che regolano la transizione di fase G1-S. Il fatto che le cellule HMLE e MCF-7 trattate coi rimedi mostrassero una marcata sottoregolazione di Rb fosforilata insieme a cambiamenti nei livelli di cicline e di CDK, dimostra che i rimedi interferiscono con i pathways di regolazione del ciclo cellulare, causando il rallentamento/arresto della fase G1 in queste cellule.

La regolazione della progressione del ciclo cellulare è controllata anche dalla disattivazione ben coordinata delle CDK (9, 10). I membri della famiglia di proteine inibitrici di CDK, quali p21 e p27, sono noti per disattivare i complessi cicline/CDK per regolare le transizioni di fase G1-S e G2-M (8, 11). Sia la p21 che la p27 interagiscono fisicamente con le CDK nel dominio amino-terminale per inibire la loro attività di chinasi, e nel caso di danno al genoma attivano i pathways di risposta di checkpoint prevenendo l'iniziazione della duplicazione e della mitosi del DNA da parte delle cellule. Questo aiuta a mantenere l'integrità del genoma (12, 13). In aggiunta, esistono delle relazioni pubblicate sulla sovraespressione della p27 inducente apoptosi in diverse linee cellulari cancerose epiteliali (14). In questo contesto è rilevante che il rallentamento/arresto del ciclo cellulare e l'induzione della cascata apoptotica, evidente dalla presenza di ridotto DNA telomeric (15) e dal clivaggio della PARP così come dall'attivazione della caspasi 7 nelle cellule carcinomatose trattate coi rimedi, fossero accompagnati da sovraregolazione della p27. Si crede che la disattivazione degli inibitori di CDK, comunemente osservata nel cancro, doti le cellule tumorali di sopravvivenza illimitata e potenziale proliferazione. Così, sembra logico che la sovraregolazione degli inibitori di CDK avrebbe attivato i meccanismi di risposta di checkpoint e avrebbe controllato la sopravvivenza e la proliferazione nelle cellule cancerose (16). Anche agli agenti chemiopreventivi sono stati attribuiti simili effetti sulla regolazione degli inibitori

di CDK in funzione dell'induzione di una risposta proapoptotica (17). Coerentemente con questi risultati e in considerazione delle nostre presenti osservazioni, i rimedi omeopatici naturali ultradiluiti esaminati in questo studio promettono di essere agenti preventivi e/o terapeutici efficaci per il cancro al seno e degni di ulteriore studio. Per riassumere, il nostro studio dimostra che i rimedi da prodotti naturali ultradiluiti prescritti nel 'protocollo Banerji' inducono il rallentamento/arresto del ciclo cellulare con conseguente apoptosi nelle cellule adenocarcinomatose del seno. Sebbene il livello dell'effetto antisopravvivenza abbia mostrato correlazioni con

la presenza dello wild-type del gene p53, la generale suscettibilità agli effetti inibitori dei rimedi è apparsa indipendente dalla condizione funzionale legata al p53 e alla sensibilità agli estrogeni delle cellule carcinomatose del seno. Infine, gli elevati effetti citotossici in modo preferenziale sulle cellule adenocarcinomatose del seno rispetto a quelle derivate dal normale epitelio mammario sollevano l'eccitante possibilità di una finestra di opportunità terapeutiche per un'eliminazione preferenziale delle cellule cancerose del seno con minimo danno al normale tessuto mammario che le circonda, grazie all'uso dei rimedi ultradiluiti esaminati in

questa relazione. I risultati di questo studio dovrebbero incoraggiare un'ulteriore indagine preclinica e animale di questi rimedi come trattamenti preventivi e/o terapeutici del cancro del seno.

RINGRAZIAMENTI

Lo studio è stato integralmente sovvenzionato da fondi interni del Centro per i Tumori M.D. Anderson (M.D. Anderson Cancer Center). Ringraziamo inoltre Zhijun Liu, Ph.D. alla Louisiana State University per l'analisi dei costituenti dei rimedi ultradiluiti.

BIBLIOGRAFIA

1. BARNES P, BLOOM B AND NAHIN R: *Complementary and alternative medicine use among adults and children*: United States, 2007. National Health Statistics Reports; no. 12 National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD, 2008.
2. JOHANNESSEN H, VON BORNEMANN HJELMBORG J, PASQUARELLI E, FIORENTINI G, DI COSTANZOS F AND MICCINESI G: *Prevalence in the use of complementary medicine among cancer patients in Tuscany, Italy*. Tumori 94: 406-410, 2008.
3. TRAGER-MAURY S, TOURNIGAND C, MAINDRAULT-GOEBEL F, AFCHAIN P, DE GRAMONT A, GARCIA-LARNICOL ML, GERVAIS H AND LOUVET C: *Use of complementary medicine by cancer patients in a French oncology department*. Bull Cancer 94: 1017-1025, 2007.
4. BANERJI P AND CAMPBELL DR: *Cancer patients treated with the Banerji protocols utilising homeopathic medicine: A Best Case Series Program of the National Cancer Institute USA*. Oncol Rep 20: 69-74, 2008.
5. BANERJI P: *P. Banerji Homeopathic Research Foundation (PBHRF) in Kolkata, India*, 2008.
6. PATHAK S, MULTANI AS AND BANERJI P: *Ruta 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: a novel treatment for human brain cancer*. Int J Oncol 23: 975-982, 2003.
7. THANGAPAZHAM RL, GADDIPATI JP, RAJESHKUMAR NV, SHARMA A, SINGH AK, IVES JA, MAHESHWARI RK AND JONAS WB: *Homeopathic medicines do not alter growth and gene expression in prostate and breast cancer cells in vitro*. Integr Cancer Ther 5: 356-361, 2006.
8. SHERR CJ AND ROBERTS JM: *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev 13: 1501-1512, 1999.
9. SHAPIRO GI: *Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment*. J Clin Oncol 24: 1770-1783, 2006.
10. LEE YM AND SICINSKI P: *Targeting cyclins and cyclin-dependent kinases in cancer: lessons from mice, hopes for therapeutic applications in human*. Cell Cycle 5: 2110-2114, 2006.
11. SPANKUCH B, KURUNCI-CSACSKO E, KAUFMANN M AND STREBHARDT K: *Rational combinations of siRNAs targeting Plk1 with breast cancer drugs*. Oncogene 26: 5793-5807, 2007.
12. SCHWARTZ GK AND SHAH MA: *Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy*. J Clin Oncol 23: 9408-9421, 2005.
13. ENDERS GH AND MAUDE SL: *Traffic safety for the cell: influence of cyclin-dependent kinase activity on genomic stability*. Gene 371: 1-6, 2006.
14. WANG X, GOROSPE M, HUANG Y AND HOLBROOK NJ: *p27Kip1 overexpression causes apoptotic death of mammalian cells*. Oncogene 15: 2991-2997, 1997.
15. PATHAK S, MULTANI AS, NARAYAN S, KUMAR V AND NEWMAN RA: *Anvirzel, an extract of Nerium oleander, induces cell death in human but not murine cancer cells*. Anticancer Drugs 11: 455-463, 2000.
16. ROY S, GU M, RAMASAMY K, SINGH RP, AGARWAL C, SRIRWARDANA S, SCLAFANI RA AND AGARWAL R: *p21/Cip1 and p27/Kip1 are essential molecular targets of inositol hexaphosphate for its antitumor efficacy against prostate cancer*. Cancer Res 69: 1166-1173, 2009.
17. SINGH RP AND AGARWAL R: *Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells*. Curr Drug Targets 7: 345-354, 2006.



CONGRESSO NAZIONALE DI MEDICINA OMEOPATICA

Ventennale Fiamo: 20 anni di crescita dell'omeopatia italiana

Con la partecipazione straordinaria di Fritjof Capra

Centro Carraro
28, 29, 30 Maggio 2010

Lungadige Attiraglio 45 – 37124 Verona
www.centrocarraro.it – Email: info@centrocarraro.it
Telefono: 045915877 – Fax: 0458301929

Richiedi crediti ECM

Info e programma su: www.fiamo.it | www.omeopatia.org

FEDERAZIONE ITALIANA ASSOCIAZIONI e MEDICI OMEOPATI

FIAMO

LA VOCE FORTE DELLA MEDICINA DOLCE

Iscriviti o rinnova la tua iscrizione per il 2010
Le quote di Iscrizione per il 2010 sono le seguenti:

• Soci ordinari* Medici/ Iscrizione FIAMO-LIGA	€ 120,00
• Soci ordinari* Veterinari/ Iscrizione FIAMO-LIGA	€ 90,00
• Soci aggregati** Iscrizione FIAMO	€ 60,00
• Allievi Scuole del Dipartimento Fiamo	€ 50,00
• Iscrizione ECH	€ 25,00

*Socio Ordinario: Medico Omeopata italiano o non, che opera e risiede in Italia.
**Socio Aggregato: studente di Medicina e Chirurgia e di Medicina Veterinaria nonché Medico Chirurgo, Medico Veterinario e Farmacista che non eserciti l'Omeopatia.

Abbonamento Il GRANULO:	
• n° 100 copie per 3 numeri / 2010	€ 90,00

MODALITÀ di PAGAMENTO

• **Bollettino postale:**
FIAMO sede Amm.va, via C. Beccaria, 22 05100 Terni C/C/P 12334058

• **Bonifico Bancario:**
FIAMO – Banca delle Marche sede di Terni CIN-K
ABI 06055 – CAB 14400 – C/C/B 000 000 000 443
IBAN IT89 K 06055 14400 000 000 000 443 BIC: BAMAIT3A
con causale: Iscrizione Fiamo 2010

Info: Sede Amm.va FIAMO
via C. Beccaria, 22 – 05100 Terni – tel./fax 0744.429900
www.fiamo.it – omeopatia@fiamo.it