

L'IPOFISECTOMIA ED IL PROFESSORE DI MODENA

Praticando un'ipofisectomia ad un essere vivente che è portatore di cancro questo regredisce.

Su questa osservazione si è iniziato a considerare la possibilità di praticare con la somatostatina e la bromocriptina una ipofisectomia farmacologica, ciò è stato integrato con l'acido retinico tutto trans induttore del suicidio cellulare (apoptosi) e la melatonina utilizzandone le sue proprietà, già analizzate nel capitolo specifico.

A questo si è aggiunta la ciclofosfamide per le sue capacità di indurre apoptosi e quindi potenziare l'effetto dell'acido retinico tutto trans ed inoltre vitamina A, vitamina E e vitamina C per le loro note caratteristiche anticancro ed infine il calcio con lo scopo d'inibire il flusso dei canali del calcio a livello cellulare sfruttandone gli effetti conseguenti.

Questa idea è stata definita dalla Comunità Scientifica "acqua di Lourdes".

Io non credo a questa affermazione, ritengo possa avere una sua validità.

Da questa convinzione ho scrupolosamente ricercato tutto ciò che il mondo scientifico ha sperimentato e sperimenta sull'argomento giungendo a conclusioni che vanno ben al di là delle banali osservazioni empiriche che si attribuiscono al professor Di Bella, in virtù di "carenza" di pubblicazioni in merito.

Vediamo quindi di comprendere il razionale della terapia Di Bella attraverso le ricerche ufficiali:

- riduzione della produzione di fattori di crescita
- inibizione della proliferazione cellulare
- inibizione della neo-angiogenesi tumorale
- azione antiossidante
- aumento dell'adesività cellulare.
- induzione del differenziamento cellulare
- induzione dell'apoptosi quale atto finale di guarigione

RIDUZIONE DELLA SINTESI DEI FATTORI DI CRESCITA

- 1) somatostatina ed analoghi octapeptidici

INIBIZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

- 1) somatostatina e analoghi octapeptidici
- 2) acido all-trans retinoico, acido 9-cis retinoico, acido 13-cis retinoico
- 3) N2 (idrossifenil) retinamide, fenretinide e CD437
- 4) melatonina
- 5) bromocriptina e analoghi
- 6) vitamina D3 e deltanoidi

INIBIZIONE DELLA NEO-ANGIOGENESI TUMORALE

- 1) somatostatina ed analoghi octapeptidici
- 2) bromocriptina e analoghi

AZIONE ANTIOSSIDANTE

- 1) melatonina
- 2) alfa tocoferolo
- 3) acido ascorbico

AUMENTO DELL'ADESIVITÀ CELLULARE

- 1) acido all-trans retinoico, acido 9-cis retinoico, acido 13-cis retinoico

INDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

- 1) acido all-trans-retinoico
- 2) fenretinide
- 3) vitamina D3

INDUZIONE DELL'APOPTOSI QUALE ATTO FINALE DI GUARIGIONE

Le sostanze impiegate in grado di determinare l'apoptosi cellulare sono:

- 1) l'acido all-trans-retinoico, l'acido 9-cis-retinoico, l'acido 13 cis-reitnoico, la N(2 idrossi-fenil) retinamide, la fenretinide e CD437
- 2) vitamina D3, deltanoidi
- 3) alfa-tocoferolo succinato

INIBIZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE ED APOPTOSI COME OBIETTIVI DELLA TERAPIA ANTITUMORALE

Un obiettivo della terapia anti-tumorale è rappresentato dal controllo della proliferazione cellulare.

La fase cruciale del ciclo cellulare è la fase G1, intervallo tra la fase M in cui avviene la mitosi e la S (in cui avviene la sintesi del DNA). È in questa fase che la cellula risente della regolazione in senso inibitorio o di stimolazione della crescita da parte di numerosi fattori.

La cellula in G1 può diventare quiescente ovvero progredire nel ciclo cellulare fino alla duplicazione del DNA ed alla mitosi.

La progressione del ciclo cellulare è portata avanti da cicline che sono associate in complessi alle proteine chinasi ciclina-dipendenti (CDKs) che ricevono segnali dai fattori di crescita.

In particolare la progressione in G1 fino ad arrivare alla fase S è legata alla ciclina E, associata alla cdk2. Queste due proteine determinano il passaggio da G1 ad S fosforilando la proteina del retinoblastoma (pRb) ed inattivando in questo modo la sua attività di soppressione della crescita cellulare.

Avviene in tal modo il completamento della fase G1 e la duplicazione del DNA (fase S).

In fase G1 è presente anche la ciclina D, associata a cdk4.

La ciclina A è presente nelle cellule nella tarda fase G1 alla fase M, associata a cdk2 in G1 ed S (con attività sovrapponibile a quella della ciclina E) ed associata a cdk2 in fase M.

In fase M, mediante la fosforilazione di proteine della membrana nucleare (in particolare la lamina), la ciclina E è associata a cdk2 determinando la rottura della membrana nucleare.

Nelle cellule normali le cicline si trovano in complessi quaternari associate al p21.

Questi complessi non si ritrovano nelle cellule neoplastiche che sono infatti caratterizzate da una crescita illimitata.

Un altro degli obiettivi della terapia dei tumori è rappresentato dall'induzione dell'apoptosi, la cosiddetta morte programmata o suicidio della cellula.

Per comprendere come alcuni farmaci antitumorali possano intervenire sulle cellule inducendone la morte "per suicidio" è indispensabile conoscere l'apoptosi nelle cellule normali.

Il concetto di apoptosi deve essere distinto da quello di necrosi sia da un punto di vista concettuale che fisiopatologico e morfologico.

Per apoptosi s'intende la morte della cellula dovuta a stimoli esogeni che agiscono, attraverso cascate di attivazione sul DNA nucleare determinando, con meccanismi attivi, la frammentazione.

A dimostrare il fatto che si tratta di un fenomeno attivo (al contrario della necrosi) vi è la constatazione che gli stessi stimoli possono indurre alternativamente apoptosi o necrosi nella cellula a seconda dei livelli di ATP cellulari disponibili.

Alti livelli di ATP consentono infatti alla cellula di attivare i meccanismi che provocheranno il suicidio come l'attivazione di proteasi ATP-dipendenti che intervengono nelle cascate di induzione con il trasporto attivo di "messaggi apoptotici" dal citoplasma al nucleo.

Bassi livelli di ATP non consentono l'innescamento di questi meccanismi per cui lo stimolo esogeno provocherà la necrosi o morte passiva della cellula dovuta direttamente alla noxa.

Questo fenomeno si osserva in vivo nelle aree centrali di tumori solidi dove la vascolarizzazione è meno efficiente. Si ritrovano infatti cellule apoptotiche frammiste a cellule necrotiche.

L'ipossia determina una minore capacità di produrre energia da parte della cellula e di conseguenza le impedisce di andare incontro ad una morte apoptotica.

Vi sono poi differenze morfologiche tra cellula in **apoptosi** e cellula in **necrosi**.

Le **cellule apoptotiche** presentano alterazioni nucleari che consistono in addensamento della cromatina e frammentazione del nucleo, mentre il plasmalemma rimane integro, potendo presentare talvolta dilatazioni dette blebs.

Le **cellule necrotiche** presentano invece una dilatazione mitocondriale e la perdita di integrità del plasmalemma.

Le cellule apoptotiche inoltre, al contrario delle necrotiche, non rilasciano enzimi ed altre molecole presenti nel citoplasma e negli organelli intracellulari non risultando quindi flogogene.

Il rilascio di sostanze intracellulari durante la necrosi è responsabile dell'estendersi del danno ad altre cellule, del richiamo di cellule del sistema immunitario e dell'insorgenza di una risposta infiammatoria.

Le cellule apoptotiche, grazie all'espressione di segnali di superficie ("eat me"), vengono riconosciute dalle cellule vicine e dai macrofagi ed immediatamente fagocitate.

Numerosi studi sono stati condotti allo scopo di conoscere il significato dell'apoptosi, le vie intracellulari che la determinano e gli stimoli che la inducono o la inibiscono.

L'apoptosi è un fenomeno presente fisiologicamente nello sviluppo e nella differenziazione dei tessuti durante l'embriogenesi oltre che nel normale equilibrio tra crescita e morte cellulare nell'adulto, compresi i tessuti ormono-dipendenti.

L'apoptosi è un meccanismo di difesa nei confronti della carcinogenesi.

La perdita infatti di geni con significato pro-apoptotico, quale è ad esempio il gene oncosoppressore p53¹, comporta l'acquisizione dell'immortalità da parte della cellula che perde la sua capacità di andare incontro ad un certo momento della sua vita alla morte per apoptosi.

L'importanza dell'equilibrio tra proliferazione cellulare ed apoptosi per il mantenimento di cellule normali può essere compresa studiandone il significato in un tessuto ormono-dipendente quale è la ghiandola mammaria.

Nella ghiandola mammaria vi è un equilibrio tra le cellule epiteliali che proliferano e quelle che vanno incontro ad apoptosi, equilibrio che si mantiene ad ogni ciclo mestruale.

Durante la gravidanza e l'allattamento vi è un importante aumento della proliferazione cellulare, mentre durante l'involuzione della ghiandola mammaria si osserva il predominare dell'apoptosi.

Il venir meno dei meccanismi apoptotici nella carcinogenesi è confermato dal fatto che geni oncosoppressori ed oncogeni agiscono rispettivamente come induttori ed inibitori dell'apoptosi.

Il gene p53 agisce in favore dell'apoptosi, l'oncogene bcl2² inibisce l'apoptosi, essendo in grado di per sé di rendere immortale la cellula.

La cellula dunque è sottoposta normalmente ad una serie di stimoli che possono avviarla in due direzioni:

- verso la progressione nel ciclo cellulare in vista della proliferazione cellulare
- verso l'apoptosi.

La fase del ciclo cellulare in cui è maggiore la sensibilità della cellula nei confronti degli stimoli esogeni è la G1.

È dunque la fase G1 il momento cruciale del ciclo cellulare nel quale viene deciso il destino della cellula.

Meccanismi di sopravvivenza si realizzano attraverso i recettori per i fattori di crescita, la comunicazione intercellulare e le interazioni con la matrice extracellulare.

Il **bcl2** proteina di 24 kDa, codificata dall'oncogene bcl2, è presente negli organelli intracellulari in forma di omodimeri ed è in grado di sopprimere l'apoptosi indotta dalla deprivazione di fattori di crescita o dai chemioterapici.

Il **bax** è una proteina che presenta estese omologie con il bcl2 e che può trovarsi nella cellula in omodimeri o formare eterodimeri con il bcl2.

Dal rapporto di omodimeri di bcl2 e di bax dipende il destino cellulare che sarà o la sopravvivenza o l'apoptosi.

Il gene **p53** ha significato pro-apoptotico, è un cosiddetto sensore del danno genomico. In presenza di danni al DNA nucleare infatti aumentano i livelli della proteina p53 che determina l'arresto del ciclo cellulare in G1 ed apoptosi. Il gene p53 impedisce che cellule con mutazioni genomiche possano andare in fase M.

Le vie d'induzione dell'apoptosi sono complesse e non del tutto chiarite.

Tutte le cellule possiedono un recettore di superficie il **Fas**³, che appartiene alla famiglia del TNF, insieme a FasL e linfotossina.

Ad esso possono legarsi sia il TNF che il FasL ovvero il Fas in forma libera.

Il FasL viene prodotto da linfociti T attivati e cellule natural killer e risulta implicato nella risposta antivirale ed antitumorale oltre che in corso di malattie autoimmuni (ad esempio la tiroidite di Hashimoto).

Il legame del FasL al Fas determina l'internalizzazione del complesso recettoriale.

In conseguenza di questa interazione vi è una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale con rigonfiamento del mitocondrio e rilascio del citocromo C e delle caspasi.

Le caspasi⁴ agiscono attivando a loro volta delle nucleasi dette CAD ovvero Dnasi attivate dalle caspasi. Questi enzimi sono in grado di degradare il DNA nucleare provocando la morte programmata della cellula.

Con il termine anoikis (parola di origine greca che significa "senza casa") s'intende una forma particolare di apoptosi. Si tratta della morte programmata della cellula che interviene qualora le cellule si staccano dalla matrice extracellulare o quando sono legate alla matrice in modo non corretto.

I principali recettori della matrice sono rappresentati dalle integrine.

L'anoikis, documentata in vitro nelle cellule epiteliali della cute, della mucosa del colon, della ghiandola mammaria, impedisce che tali cellule, una volta staccate dal tessuto di origine, colonizzino altre sedi.

Le cellule vengono normalmente preservate dall'andare incontro ad anoikis dall'interazione tra le integrine ed il citoscheletro.

È inoltre interessante sapere che le interazioni intercellulari rendono le cellule più sensibili all'anoikis, al contrario di quanto accade in cellule sparse. La rottura delle relazioni intercellulari, rendendo le cellule resistenti all'anoikis e potrebbe contribuire alla loro trasformazione.

L'aumentata espressione di bcl2 riducendo l'attivazione della caspasi, sopprime l'anoikis. Anche l'inattivazione della proteina del retinoblastoma a causa di una riduzione degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (p21 e p27) sarebbe in grado di sopprimere l'anoikis.

- 1 p53 è un gene, localizzato sul cromosoma 17, che interviene nella normale crescita e proliferazione cellulare.
L'alterazione o l'inattivazione di tale gene, dovuta a mutazione, rappresenta un primo passo verso la crescita cellulare incontrollata e di conseguenza verso lo sviluppo del cancro.
Si tratta di un gene oncosoppressore, dal momento che è la sua inattivazione a determinare la trasformazione maligna della cellula.
Mutazioni di p53 sono di comune riscontro in numerose neoplasie maligne, compresi il cancro della mammella, il cancro gastrico, il cancro della colecisti, il cancro del colon e la leucemia promielocitica.
Tumori che esprimono p53 sono caratterizzati da un'alta proporzione di cellule apoptotiche e rispondono meglio alla radioterapia ed alla chemioterapia.
- 2 bcl2 è un oncogene che agisce negativamente nell'induzione dell'apoptosi ha un significato anti-apoptotico e quindi protumorale.
- 3 Fas - CD95 - apo 1 è una proteina di superficie, presente nelle cellule normali, ed appartenente alla superfamiglia del nerve growth factor (NGF) e del TNF. L'espressione di questa proteina (dunque dei livelli del suo mRNA) appare ridotta nelle cellule tumorali maligne.
Nel cancro della mammella si è osservato che la perdita d'espressione del FAS avviene in una fase precoce.
Nelle cellule che perdono l'espressione di FAS si manterrebbe comunque le vie intracellulari d'induzione dell'apoptosi.
La reinduzione dell'espressione di FAS, ad opera dell'alfa-IFN, comporta l'induzione di apoptosi.
Anche la vitamina E succinato è in grado di indurre apoptosi FAS-mediata nelle cellule tumorali maligne mammarie prive di recettori per gli estrogeni.
L'apoptosi FAS indotta sarebbe mediata dalle caspasi, di cui parleremo in seguito.
- 4 Le caspasi (dette anche ICE o enzimi di conversione dell'IL1 alpha sono cisteina-proteasi ed intervengono nell'induzione dell'apoptosi, nella riorganizzazione del citoscheletro e nella rottura del nucleo al momento della fecondazione.
Le caspasi hanno un significato fondamentale nell'ambito dell'apoptosi indotta da chemioterapici.
L'inibizione sperimentale di questi enzimi in cellule T leucemiche ad opera di una molecola (CrmA del core pox virus) comporta l'insorgenza di una resistenza alla chemioterapia.