

Incremento della biodisponibilità e delle proprietà terapeutiche della MLT Idrosolubilizzata mediante legame di idrogeno con adenosina e stabilizzata con glicina, riscontri clinici.

Abstract: la melatonina, solo a 40-45°C è idrosolubile, diversamente è solubile solo in alcol e insolubile in acqua con limitazione della sua attività. Essa viene assorbita nel nostro organismo complessata con l'adenosina da un legame di idrogeno. Nella preparazione formulata dal Prof Di Bella, la melatonina con adenosina in rapporto 1:4 stabilizzata con il 30% di glicina (MLT-MDB) è stata impiegata dal 1994 in molte decine di migliaia di casi con varie indicazioni e risposte terapeutiche positive in totale assenza di tossicità. Circa ottocento casi oncologici sono stati positivamente trattati con MLT, pubblicati su www.pubmed.gov, relazionati a congressi mondiali, europei o nazionali. L'esperienza clinica ha evidenziato il ruolo della melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina, MLT), nella prevenzione e terapia di varie neoplasie. Essa agisce sui due denominatori comuni a tutti i tumori: la proliferazione e il differenziamento, punti critici della biologia neoplasica. Oltre che nell'omeostasi antitumorale la MLT ha un documentato ruolo il quella antidegenerativa e immunitaria. Svolge un ruolo rilevante nel contenimento dello stress ossidativo, nella crisi ematica, dinamica midollare, nella regolazione della formula leucocitaria, nella sintesi dell'emoglobina, nella piastrinogenesi, e nell'aggregazione piastrinica, nella resistenza eritrocitaria. Le sue proprietà più note sono sicuramente le meno rilevanti come il controllo del ritmo sonno veglia, e l'azione sul Jet Lag. Attraverso la sua notevole versatilità funzionale, la MLT può infatti esercitare un effetto antitumorale sia diretto che indiretto amplificato dall'interazione e sinergismo fattoriale con altre molecole antiproliferative come la somatostatina e agonisti dei Dr2, immunomodulanti, trofiche, differenzianti, citostatiche, come Retinoidi, Vit. E, Vit. D3, C, tutte componenti del MDB. Queste peculiarità e l'assenza di tossicità ne suggeriscono l'impiego generalizzato nelle patologie oncologiche.

Figura 1 Melatonina (MLT) C₁₃H₁₆N₂O₂

Sinonimi:

N-acetil-5-metossitriptamina

N-[2-(5-Metossi-1H-indol-3-il) etil]acetamide.

La MLT è insolubile in acqua, per poterla assimilare e utilizzare il nostro organismo la deve legare con l'adenosina.

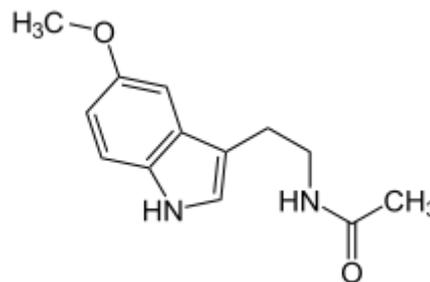
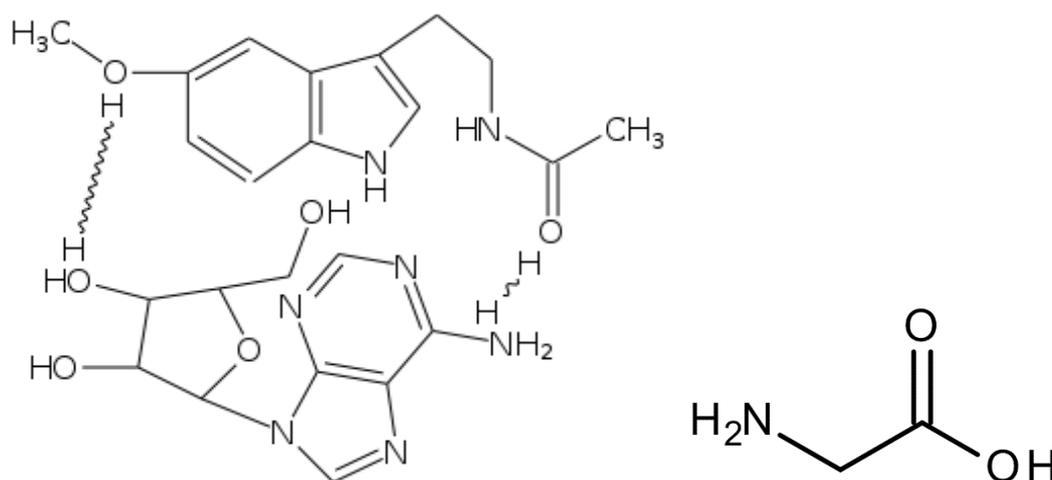


Figura 2

Melatonina idrosolubile secondo la formulazione del Prof Luigi Di Bella



MELATONINA CONIUGATA NELLA MULTITERAPIA BIOLOGICA NEL METODO DI BELLA

Premessa

Il legame con l'adenosina con cui melatonina viene assorbita nel nostro organismo, non ha la forza interatomico-covalente, ionico metallico, ma è più debole (Nebivalent di Hantzsch & Werner, minor valent sec., Huggins). Questo legame d'idrogeno (Hydrogen Bond, Wasserstoffbrück) rappresenta la maggior forza coesiva tra molecole contenenti gruppi-NH₂ e -OH ed altre contenenti gruppi -OH o CO (Pauling); esso è più forte delle cosiddette forze di Van der Waals, ed è relativamente aspecifico, poco energetico (-3Kcal/mol), impiega qualche miliardesimo di secondo per disintegrarsi, per cui può intervenire rapidamente nei processi di riconoscimento

intermolecolare.

La melatonina con adenosina in rapporto 1:4 stabilizzata con circa il 30% di glicina viene impiegata dal 1994 nel MDB, nella forma farmaceutica liofilizzata. Nel preparato magistrale secondo il metodo Di Bella, la melatonina viene coniugata alla adenosina (nucleoside del RNA e del DNA, ove l'adenina funge da base azotata) tramite una liofilizzazione, ciò allo scopo di garantire una migliore biodisponibilità del medicamento.

La melatonina è in grado di formare un complesso, probabilmente di tipo pi greco per overlap degli orbitali dei sistemi aromatici e dei doppietti elettronici degli atomi di azoto, con l'adenosina. Il complesso è poi stabilizzato dalla glicina, che, dato il pKa piuttosto basso, contribuisce alla formazione di ponti d'idrogeno. La formazione del complesso comporta una variazione notevole rispetto alle caratteristiche dei singoli componenti: il complesso è infatti completamente idrosolubile, a concentrazioni a cui adenosina e melatonina da sole precipiterebbero o nemmeno si scioglierebbero.

Preparazione delle fiale da 20 mg:

Melatonina 20 mg

Adenosina 90 mg

Glicina q.b. (all'isotonia)

Tecnologia

Nonostante esso rimanga un preparato galenico, viene procedurato il metodo produttivo per garantire la massima qualità del prodotto. Per le lavorazioni vengono applicate le norme di buona preparazione.

E' previsto un metodo di allestimento per liofilizzazione della soluzione acquosa di melatonina-adenosina- glicina. Il liofilizzato è altamente idrosolubile e può essere preparato in fiale per uso orale o iniettabili intramuscolo o in vena.

Lavorazione in liofilizzatrice

Il procedimento di liofilizzazione permette di realizzare su diverse sostanze un'efficace disidratazione, tale che il prodotto finito mantiene integre le proprie particolari caratteristiche e, addizionato anche a distanza di tempo di acqua bidistillata sterile per preparazioni iniettabili ripristina le specifiche proprietà della soluzione primitiva.

Lavorazione per fiale orali

Il liofilizzato ottenuto può essere impiegato anche in fiale orali, in cui l'acqua viene aggiunta in modo estemporaneo al momento della somministrazione.

Lavorazione per fiale iniettabili

La glicina nelle fiale è presente sia come coadiuvante di liofilizzazione che per rendere isotonica la forma farmaceutica stessa. Non essendo veicolata dalla adenosina intestinale per la melatonina iniettabile è ancora più importante essere legata all'adenosina esogena con legame ad idrogeno. Le fiale devono rispettare la tecnologia dei preparati STERILI-APIROGENI.

La via parenterale viene utilizzata quando esistono difficoltà di assorbimento della melatonina da parte dell'apparato gastrointestinale, impedimenti alla ingestione della melatonina e soprattutto quando bisogna somministrarne dosi elevate. Le fiale iniettabili da 20 mg in MLT liofilizzata, al momento dell'uso vanno diluite in 10 ml d'acqua bidistillata sterile per preparazioni iniettabili. Non c'è bisogno di utilizzare la soluzione fisiologica in quanto la presenza di glicina la rende isotonica.

La quantità ottenuta si può iniettare tutta in una volta ma molto lentamente perché l'adenosina è un vaso dilatatore, le arteriole si dilatano e si potrebbe provocare un calo emopressorio.

Per questo è bene prima saggiare la reattività del paziente, usando da 1 ml di soluzione. La soluzione può essere iniettata intramuscolo o per via endovenosa.

Analisi

Si analizza il prodotto finito eseguendo la determinazione quali-quantitativa dei principi attivi.

Metodo di solubilizzazione della melatonina in acqua.

1) Per migliorare la biodisponibilità, le risposte terapeutiche, è stato studiato un metodo per ottenere una Melatonina della massima purezza e renderla idrosolubile. Infatti come è noto la melatonina è scarsamente solubile in acqua, con solubilità soddisfacente solo a 40-45°C. Dopo lunga sperimentazione, si è individuato nell'adenosina la molecola più adatta a dissolvere facilmente in acqua la melatonina. In particolare, un rapporto ottimale è stato trovato come segue: per una mole di melatonina (252,27 g) devono essere utilizzate quattro moli di adenosina (267,26 g).

2) Un metodo di preparazione di melatonina avente un elevato grado di purezza consiste nei seguenti passi: a) reazione della ftalimide di potassio con dibromopropano cui si ottiene 3-bromopropilftalimide; b) reazione della 3-bromopropilftalimide dal passaggio con uno estere

acetoacetico in presenza di etossido di sodio si ottiene etil-2-acetil ftalimido-pentanoato; c) reazione della etil 2-acetil ftalimido-pentanoato con il sale di diazonio della p-anisidina da cui si ottiene 2-carbossietil-3-(2-ftalimidoetile)-5-metossi-indolo; d) reazione della 2-carbossietil-3-(2-ftalimidoetile)-5-metossi-indolo con idrossido di sodio e poi con acido solforico da cui si ottiene 5-metossitriptamina grezza; e) reazione della 5-metossitriptamina grezza con esametil disilazane per ottenere una miscela di prodotti mono e disostituiti e idrolizzando detta miscela con metanolo acquoso per ottenere essenzialmente 5-metossitriptamina pura; f) reazione della 5-metossitriptamina pura con anidride acetica per ottenere melatonina grezza e purificare detta melatonina grezza mediante cromatografia su gel di silice e una prima separazione con cloruro di metilene seguita da separazione con cloruro di metilene e acetone, ottenendo una soluzione, concentrando detta soluzione di cloruro di metilene e acetone, si ottiene un solido, ricristallizzando detto solido purificato si ottiene melatonina.

3) Il metodo secondo la detta fase d comporta riflusso a 135°C per 2 ore e mezza fino a soluzione completa, aggiungendo poi un 20% (v/v) di soluzione H₂SO₄ ed ulteriore riflusso per quattro ore.

4) Dopo riflusso con detto acido solforico 20%, la soluzione viene raffreddata fino a far precipitare l'acido ftalico e filtrata per l'eliminazione di detto acido ftalico.

5) Dopo filtraggio dell'acido ftalico, è aggiunto idrossido di sodio e la 5-metossitriptamina grezza viene estratta con dicloruro di metilene.

6) Dopo riflusso per 12/14 ore la 5-metossitriptamina grezza è trattata con esametil-disilazano, per ottenere prodotti di sostituzione mono e di silyl, distillare quindi la soluzione sotto pressione normale in modo da recuperare eccesso di esametil-disilazano e idrolizzare i prodotti di sostituzione del silyl con metanolo acquoso allo scopo di ottenere 5-metossitriptamina essenzialmente pura.

(Patent number: RE35631 - Filing date: Jun 2, 1994 - Issue date: Oct 14, 1997Franco Fraschini, Luigi Di Bella)

Considerazioni generali sull'attività antitumorale della MLT

Numerosi studi hanno definito gli effetti in vitro della MLT sulla proliferazione di linee cellulari neoplastiche e sull'apoptosi delle stesse, fenomeni variamente condizionati dalla caratterizzazione istologica, differenziazione, sensibilità a mitogeni endocrini, a fattori di crescita, e alle condizioni del terreno di coltura. Le dinamiche di divisioni delle cellule normali e di quelle tumorali,

dipendono e sono coordinate da una gerarchia di segni tempi circadiani. Le bio-attività della MLT, secondo Bartsch sono in maniera coordinata, disponibili o meno in vivo, in specifiche fasi circadiane. L'autore conclude che la somma dei molti dati raccolti circa l'influenza della MLT sulla biologia tumorale in vitro, fa supporre che anche lo stato circadiano di somministrazione della MLT ai pazienti con cancro, determini la sua attività clinica antitumorale. È stato dimostrato che la MLT, esercita un deciso effetto antiossidante dose dipendente, sperimentalmente riproducibile, con implicazioni rilevanti nella prevenzione e terapia dei tumori per la protezione dallo stress ossidativo potenzialmente neoplastico del DNA nucleare e mitocondriale. Così come è determinante la sua capacità di proteggere il DNA dal danno di sostanze chimiche carcinogene.

Questi concetti sono stati applicati nella pratica clinica dal Prof. Di Bella per il quale né la biochimica di formazione della MLT, o degli altri indoli nella pineale, né la presenza di Taurina e di tanti peptidi, né l'innervazione o i cicli funzionali circadiani o stagionali, o la correlazione con l'ipofisi e le altre ghiandole endocrine o i releasing Factors, possono esaurientemente e totalmente chiarire le modalità d'azione antiblastica della MLT. In queste reazioni che portano sia alla produzione di NO che alle poliamine, la MLT può esercitare un ruolo fondamentale. Il Nel libro "Cancro, siamo sulla strada giusta" il Prof. Di Bella ha prospettato un'innovativa chiave di lettura della complessa, capacità della MLT di interagire con la biologia neoplastica, relativa al dogma centrale della biologia.

Secondo gli attuali concetti di biologia molecolare è fondamentale la preesistenza di una informazione per ogni sequenza amminoacidica, elemento base della protidosintesi, su cui poggia la vita sia fisiologica che neoplastica nelle sue espressioni essenziali della proliferazione e differenziazione morfofunzionale.

Di Bella infatti ha individuato nella disposizione ubiquitaria degli esteri fosforici dell'AMP, ADP, ATP. un primario ruolo della MLT. Questo concetto è condiviso dalla scuola di pensiero che fa capo ad Goldberger, che ammette anche la possibilità dell'autoassemblaggio, e che la proteina possa riprendere spontaneamente la sua struttura tridimensionale con piena attività biologica. Potrebbe essere la stessa o un'altra proteina a influenzare le reazioni intermolecolari. Alcune proteine agiscono da chaperons molecolari e idrolizzando l'ATP attivano quel dispiegamento di strutture proteiche, inerti senza questa reazione. Il meccanismo d'azione è stato spiegato da Ellis, che ha inquadrato le chaperonine come agenti sequestranti contenenti ripiegate nella *Gabbia di Anfinsen* le singole strutture proteiche. Secondo il Prof. Di Bella nella biologia neoplastica l'azione delle chaperonine dovrebbe prevalentemente realizzarsi attraverso l'idrolisi di ATP, ADP, AMP, in legame con l'adenosina, oppure in legame d'idrogeno con la MLT.

Kvetnoy e altri, hanno rilevato che nell'ultimo decennio l'attenzione di molti ricercatori si è

incentrata sulla MLT, che in passato è stata considerata un inreto solo epifisario, mentre attualmente si ritiene che sia un componente del Diffuse NeuroEndocrine System(DNES) definito indifferentemente anche Amine Precursor Uptake and Decarboxylation (APUD) presente in molteplici aggregati cellulari, pressoché ubiquitari, in grado di produrre anche la MLT.

Le piastrine ed il sistema APUD

Le piastrine possono essere considerate elementi onnipresenti, multifattoriali e itineranti di un sistema APUD plastico e ubiquitario, con il suo contenuto di serotonina (5-TH) e norepinefrina, acetilcolina ed epinefrina, di MLT, NAT e HIOMT, di deposito e derivati metabolici dell'adenosina (AMP, ADP, ATP). Le piastrine talvolta si comportano come un neurone melatonergico e dopaminergico, serotonergico e adrenergico, secondo le diverse condizioni locali e la natura ergica dei nuclei. Le piastrine possono assorbire e immagazzinare 5-TH; possono anche sintetizzare la MLT poiché anch'esse sono fornite di 5-TH-decarbossilasi.

Esiste una gran quantità di dati farmacologici che indicano un'ampia affinità funzionale e complementarietà di azione tra le piastrine e i neuroni del sistema serotonergico. Questa funzione delle piastrine, che rilasciano i loro depositi di 5-HT ed espellono materiale dai loro granuli quando vengono attivate da stimoli adeguati è stata considerata molto simile al rilascio di neurotrasmettitori da parte dei neuroni centrali. Il rilascio di molecole biologicamente attive da parte delle piastrine è simile a quello dei neuroni centrali serotonergici e adrenergici.

Al 7° Eur. Pin. Soc. Colloquium a Sitges, in Spagna, nel 1966, furono presentate diverse relazioni sull'effetto oncostatico della MLT e sulla sua proprietà di inibire la diffusione metastatica delle cellule tumorali. Fu dimostrato che alcuni geni oncogeni, tra cui RAS, Hras, KRas, NRas, sono significativamente inibiti dalla MLT. Meccanismi biochimici e molecolari dell'azione oncostatica della MLT comprendono anche l'architettura del citoscheletro e la funzione intracellulare di ossidoriduzione (Redox).

Già da molti anni, concentrazioni variabili di MLT sono state riscontrate a livello di: retina, ghiandole di Harder (lacrimali), mucosa intestinale, cervelletto, epitelio delle vie respiratorie, fegato, reni, ghiandole surrenali, timo, tiroide, pancreas, ovaie, testicoli, bulbo della carotide, placenta, endometrio, mast-cellule, natural killer, leucociti eosinofili, cellule endoteliali e anche nelle piastrine e megacariociti, come evidenziato dalle ricerche del Prof L. Di Bella sull'interazione piastrine-megacariociti-MLT. Questa diffusione generalizzata dimostra che la MLT, ha un ruolo unico tra i componenti del DNES/APUD ed è un componente essenziale dell'apparato sistemico di risposta e controllo della protezione antitumorale dell'organismo, agendo in tutti i sistemi d'organo. Si può considerare la MLT extrapineale, come una molecola chiave del sistema paracrino per la

coordinazione locale delle reazioni intercellulari, pertanto elemento insostituibile sia nella prevenzione che nella cura delle neoplasie.

Una conferma deriva dal fatto che molte cellule limitrofe o comunque prossime alle sedi di produzione della MLT, hanno recettori di membrana per la MLT stessa.

Kvetnoy e altri hanno studiato e sperimentalmente confermato la partecipazione diretta e il ruolo attivo della MLT e degli ormoni DNES/APUD, sia sull'eziopatogenesi e proliferazione tumorale, sia nella terapia antiblastica. L'analisi delle caratteristiche fisiologiche di molte sostanze biologicamente attive, prodotte dalle cellule del sistema DNES/APUD quali: melatonina, serotonina, gastrina, insulina, glucagone, somatostatina, ecc. suggerisce un'importante funzione di queste cellule e ormoni nella crescita tumorale. Perciò lo studio del ruolo e del significato del DNES/APUD, e soprattutto delle cellule extrapineali melatonina secernenti, nella patogenesi tumorale, fornisce una nuova interpretazione dei meccanismi endogeni delle risposte indotte dai tumori in diversi sistemi di organi e di tessuti. Negli stadi di insorgenza e proliferazione neoplastica è stata documentata l'iperplasia delle cellule enterocromaffini che producono MLT, di quelle BETA pancreatiche insulino secernenti, delle D che producono somatostatina, e delle cellule surrenali NEP, produttori nor-epinefrina, mentre è significativa una diminuzione del numero di queste cellule negli stadi molto avanzati o terminali della malattia neoplastica. Gli studi sperimentali di Kvetnoi hanno evidenziato lo stesso comportamento di questi aggregati cellulari nel carcinoma polmonare di Lewis dei topi. Nei tumori iniziali, circoscritti, con modesto indice proliferativo, discretamente differenziati, non metastatizzati, è stata notata una minore attività, evidenziata dagli aspetti morfo funzionali e da ipoplasia delle cellule enterocromaffini

intestinali, tra cui le ECL produttrici di *istamina*, le G dello stomaco che producono *gastrina*, le cellule A pancreatiche, deputate all'increzione di *glucagone*, le surrenaliche EP *epinefrinasecernenti*. Tutti questi aggregati cellulari aumentano notevolmente di numero e attività col procedere dell'attività proliferativa e invasiva neoplastica, raggiungendo un'evidente ipertrofia negli stadi più avanzati o terminali. In studi sperimentali su Topi Wistar maschi con sarcoma-45, si osserva una concentrazione significativamente maggiore di MLT (evidenziata attraverso i legami dei suoi isotopi radiomarcati ^3H -MLT e ^{125}I -MLT), con evidente funzione omeostatica di contenimento dell'espansione neoplastica in molti organi vitali come intestino, fegato, epitelio respiratorio, reni, ghiandole surrenali, pancreas. L'assenza d'incremento della concentrazione melatoninica negli stessi organi in animali sani, conferma il dato che la MLT rientra nei meccanismi omeostatici antitumorali. Fu possibile un'unica volta, alla fine del 1974, usare La melatonina idrosolubilizzata con adenosina e glicina, liofilizzata e preparata secondo la formulazione del Prof Di Bella, in flaconi da 25 mg in alte dosi di mille milligrammi giornalieri per 11 giorni (Interrotta

per esaurimento del prodotto). Su richiesta della paziente e dei familiari col suo consenso informato l'assenso della direzione sanitaria dell'Ospedale e del primario del reparto, per la mancanza di alternative terapeutiche, in una paziente quarantenne ricoverata in un reparto di medicina generale all'Ospedale Maggiore Pizzardi di Bologna affetta da linfosarcoma chemioradioresistente dopo ripetuti cicli di chemioradioterapia in progressione laterocervicale bilaterale, mediastinica linfonodale ascellare e inguinale bilaterale e splenica, furono somministrate in vena molto lentamente (in otto ore circa) mille milligrammi di melatonina al dì per 11 giorni. Nell'arco della giornata vennero somministrate in vena 4 flebo di soluzione fisiologica da 500 ml in ognuna delle quali erano diluiti 10 flaconi di MLT liofilizzata per complessivi 250 mg, a goccia lenta, nell'arco di 2 ore per ogni flebo e complessivi 1000 mg al giorno. Non fu somministrato alcun altro farmaco di nessun genere per verificare l'effetto della MLT senza alcuna interferenze. Si osservò e fu documentata radiograficamente e obiettivamente, refertata in cartella, una risposta obiettiva completa e stabile. Questa durò per oltre 15 anni, poi la paziente mancò nell'arco di pochi giorni per una meningite acuta. Non fu possibile somministrare simili dosaggi in altri casi sia perché la ditta produttrice la IFLO di Milano cessò la produzione, sia per la mancata collaborazione di reparti ospedalieri. Probabilmente le malattie linfoproliferative sono particolarmente sensibili all'azione della melatonina MDB come abbiamo verificato in tanti altri casi pubblicati somministrando per os 80 -100 mg di MLT- MDB/al dì per os liofilizzata e preparata in compresse blisterizzate, unitamente agli altri componenti del MDB. La rapidità della risposta nel caso descritto, l'assenza totale di tossicità e la stabilità del risultato inducono a ipotizzare che si potrebbero ottenere significativi progressi in oncoterapia con particolare efficacia nelle forme linfoproliferative, come confermato non solo in quest'unico caso, ma nei numerosi casi pubblicati di somministrazione orale della MDB.

AZIONI DELLA MELATONINA

- Agisce da agente oncostatico cronobiologico in grado di controllare la proliferazione cellulare e attivare l'apoptosi [Blask DE. 2002]. (1)
- Anche la documentata capacità della MLT di diminuire la trascrizione del recettore dell'estrogeno, di bloccare gli effetti della prolattina e l'effetto blastico indotto dal fattore di crescita epidermico(EGF), sono aspetti di una sicura valenza antitumorale. [Bartsch C. 1999] (2), [Bartsch C. 1997] (3);

- Attiva a livello intercellulare il processo di polimerizzazione del tubulin. A concentrazioni fisiologiche induce un aumento di microtubuli nelle cellule tumorali [Melendez J. 1996] (4);
- Aumenta la radiosensibilità ed esercita effetti stabilizzanti sui disordini metabolici che si sviluppano durante il processo oncologico, esercita capacità immunomodulante, attiva la funzione citotossica dei linfociti natural-killer e la produzione di interferone. [Kvetnoi IM. 1986] (5);
- Azione antiaggregante piastrinica [Di Bella L. 1979; Di Bella L. 1980] (6) (7);
- Concorre sia alla sintesi della NO-Sintase, potenziandone, la complessa attività anche antitumorale, probabilmente in sinergismo con ca-modulina, tirosinkinasi, TGF. [Di Bella L. 1997] (8);
- Contiene decisamente i processi che portano alla cachessia neoplastica [Lissoni P. 1999] (9);
- Diminuisce la trascrizione del recettore dell'estrogeno, blocca l'azione mitogena della prolattina e l'effetto blastico indotto dal fattore di crescita epidermico (EGF) [Bartsch C. 2001] (10);
- Dispone ubiquitariamente gli esteri fosforici dell'AMP,ADP,ATP. Questo rappresenta un ruolo rilevante d'intervento della MLT nella patologia neoplastica. [Di Bella L. 1998] (11);
- Effetto antagonizzante sulla crescita prolattino-dipendente del carcinoma umano del seno [Lemus-Wilson et al., 1995] (12);
- Effetto antiproliferativo dose-dipendente della MLT [Loureiro R. 2015] (13);
- Effetto antiproliferativo sinergico della MLT e Vit. D3 con capacità delle due molecole di inibire con modalità dose-dipendente la proliferazione cellulare esprimendo un reciproco e altamente significativo potenziamento anche nell'aumento dell'espressione di TGF-beta che concorre al blocco proliferativo [Bizzarri M. 2003] (14);
- Effetto inibente in dosi fisiologiche sulla sintesi di DNA in cellule neoplastiche [Cos S. 1996] (15);
- Esaltazione delle proprietà differenzianti, antiproliferative, apoptotiche con tutti gli altri componenti del MDB (Vitamina E, D, C, retinoidi, inibitori prolattinici, somatostatina) [Di Bella G. 2013] (16);
- Esercita attraverso i recettori nell'azione antiproliferativa diretta sulle cellule di cancro umano alla prostata LNCaP androgeno sensibili [Xi SC. 2000] (17);
- Esercita azione radioprotettiva e dimostra di possedere proprietà radiomodificanti e radiosensibilizzanti [Lissoni P. 1996] (18);

- Esercita effetto antiradicalico sinergico a quello della Vit. E, protegge l'intera cellula dallo stress ossidativo con vari mezzi, tra cui il potenziamento di sistemi enzimatici quali la glutatione perossidasi, l'aumento della sintesi del mRNA e conseguentemente la superossidodismutasi. Inibisce la perossidazione lipidica, con effetto sinergico ai retinoidi. Riduce l'incidenza di mutazioni e pertanto le probabilità di cancro [Reiter RJ. 2000] (19);
- Esercita la sua funzione antitumorale anche sugli spazi di giunzione intercellulare inducendo la proteina dello spazio di giunzione CX32 [Kojima T. 1997] (20);
- Esercita un ruolo unico tra i componenti del DNES (Sistema Neuroendocrino diffuso), ed è un componente essenziale dell'apparato sistemico di risposta e controllo della protezione dell'organismo, agendo in tutti i sistemi d'organi. Pertanto si può considerare la MLT extrapineale, come una molecola chiave del sistema paracrino per la coordinazione locale delle reazioni intercellulari. [Kvetnoi IM. 1986] (21); [Kvetnoi IM. 2002] (22); [Kvetnoi IM. 1994] (23); [Kvetnoi IM. 1997] (24);
- Esprime una complessa capacità di interagire con modalità, tempi e meccanismi molteplici con la biologia neoplastica [Di Bella L. 1997] (8);
- Il tasso plasmatico di MLT è inversamente proporzionale all'indice proliferativo dei tumori, immunoistochimicamente determinato attraverso la presenza dell'antigene nucleare delle cellule proliferanti [Bartsc C. 2001] (10);
- In forma fisiologica, omeostatica, l'organismo tende a normalizzare o contenere i processi proliferativi patologici attraverso la MLT [Kvetnoi IM. 1997] (24);
- Incrementa sensibilmente nei pazienti neoplastici l'aspettativa di vita migliorandone la qualità [Lissoni P. 1999] (9);
- Incremento dell'effetto antiossidante e apoptotico, interattivo con retinoidi ed vitamina E [Di Bella L. 2015] (25);
- Inibisce i tumori estrogeno-dipendenti riducendo l'espressione e la trascrizione del recettore dell'estrogeno, la pervietà dei canali ionici delle membrane cellulari al calcio, l'attività delle proteinchinasi, l'architettura e la funzionalità citoscheletrica, la veicolazione, la metabolizzazione e l'utilizzazione dell'acido linoleico e altri acidi grassi da parte delle cellule neoplastiche. Sopprime EGFR (recettore del fattore di crescita epidermico) [Blask DE. 2002] (26);
- Inibisce l'increzione di fattori potenzialmente cancerogeni come la Prolattina [Tenorio FD. 1992] (27), [Di A. 1997] (28), [Griffith D. 1987] (29);
- Inibisce la diffusione metastatica delle cellule tumorali. L'azione si realizza attraverso una ridotta attrazione per la fibronectina [Mediavilla MD. 1999] (30);

- Inibisce nei pazienti neoplastici simultaneamente e velocemente sia il rilascio di acido grasso dai corpi adiposi, sia l'assorbimento dell'acido grasso da parte dei tumori. [Sauer 2001] (31);
- Inibisce reversibilmente la proliferazione neoplastica, mentre aumenta l'espressione delle proteine P53 e P21 WAF 1, regola il ciclo cellulare e l'incidenza di metastasi mediante espressione delle proteine di adesione cellulare E-caderina e di beta-1 integrina; riduce inoltre l'espressione di ER e la risposta del DNA al complesso ER [Pawlikowski M. 2002] (32);
- Inibisce, nei pazienti neoplastici, simultaneamente e velocemente sia il rilascio di acido grasso dai corpi adiposi, sia l'assorbimento dell'acido grasso da parte dei tumori [Sauer et al., 2001] (31);
- Interagisce con modalità, tempi e meccanismi molteplici con la biologia neoplastica [Di Bella 1997] (9);
- La MLT apre un nuovo capitolo della fisiologia del sistema nervoso centrale, che prospetta l'evenienza di un dato evento come la risultante fattoriale di diverse serie di fattori. Tra questi non la MLT nella sua staticità molecolare, bensì nel suo dinamismo chimico esercita un ruolo che limitato prevalentemente al sistema serotonergico, può raggiungere estrema complessità e fine adattamento attraverso il sistema APUD piastrinico, e interferire in funzione antiblastica nell'etiopatogenesi e nell'evoluzione dei tumori [Di Bella L. 1998] (11);
- La produzione di MLT e dei relativi peptidi APUD, in sito, nei carcinomi non endocrini, svolge un ruolo determinante nei meccanismi autocrini di omeostasi antitumorale [Kvetnoi IM. 1986] (21);
- La quantità di cellule neoplastiche che i tessuti possono elaborare, e liberare, è condizionata dalla funzione inibente antitumorale della MLT e dalla sua concentrazione nel sangue e nei tessuti [Di Bella 1997] (8);
- Mobilizza AR (recettore dell'androgeno) dal cariosol al citosol e ne limita l'espressione, limitando così le risposte epiteliali all'androgeno [Rimler et al., 2002] (33);
- Modula l'attività ipofiso-gonadica, immunitaria, e l' azione "scavenger" antitumorale [Di Bella 1998] (37)
- Nei talassemici migliora la sintesi di Hb e ne rallenta la degradazione, aumentando anche la resistenza globulare [Di Bella 1998, Di Bella, 1980] (11) (7);

- Nell’ambito del DNES (Sistema Neuroendocrino Diffuso) esercita un ruolo insostituibile stimolando l’apparato sistemico, di risposta e controllo, per la protezione dell’organismo, agendo in tutti i sistemi d’organi. [Kvetnoi IM. 2002] (22);
- Potenziamiento fattoriale sinergico Apoptotico e antiproliferativo insieme agli altri componenti del MDB nei carcinomi della mammella [Zhong. 2017] (34) [Di Bella L. 2006] (35), [Di Berlla G. 2011] (36);
- Previene e ritarda la carcinogenesi chimica [Hrushesky WJ. 2009] (37);
- Protegge dallo stress ossidativo e dalla perossidazione lipidica in sinergismo con la Vit. D. [Özerkan D. 2014] (38);
- Protegge insieme ai retinoidi e al Betacarotene le cellule sane da molecole cancerogene. [Teplitzky SR. 2001] (39);
- Protegge le cellule nervose dallo stress ossidativo indotto dal cobalto, dalla neurotossicità, ed aumenta la secrezione di beta amiloide [Olivieri et al., 2003] (40);
- Rappresenta la molecola chiave del sistema paracrino per la coordinazione locale delle reazioni intercellulari [Kvetnoi IM. 1994] (23);
- Rappresenta la molecola chiave del sistema paracrino per la coordinazione distrettuale delle relazioni intercellulari [Maestroni et al., 1988] (41):
- Regola diversi messaggeri secondari: cAMP, cGMP, diacilglicerolo, inositolo, ac. arachidonico e la concentrazione intracellulare di Ca²⁺. La MLT regola anche i fattori di trascrizione, cioè la fosforilazione della proteina legante, elemento che risponde al cAMP e l’espressione del c-Fos. Esercita meccanismi inibenti l’adenilciclastasi, e modulante il metabolismo del fosfolipide e (Ca²⁺+O). [Vanecek 1998] (42);
- Riduce l’incidenza di mutazioni e pertanto le probabilità di cancro [Codenotti S. 2015] (43);
- Riduce l’incidenza di noduli alveolari iperplastici, e la presenza della proteina N-ras, nelle lesioni iperplastiche focali, inoltre previene efficacemente anche l’atipia delle cellule epiteliali e gli adenocarcinomi della mammella, in cui riduce anche l’iperplasia del tessuto linfoide [Mediavilla et al., 1999] (30):
- Riduce la tossicità della chemioterapia [Lissoni P. 1999] (9);
- Se somministrata prima della radioterapia riduce i danni epatici delle radiazioni ionizzanti,. La sua azione radioprotettiva viene attuata attraverso l’inattivazione dei radicali liberi prodotti dalle radiazioni ionizzanti. [Taysi 2003] (44);
- Sinergismo apoptotico con Acido retinoico. [Margheri M. 2012] (45), [Eck KM. 1998] (46);

- Inibisce la veicolazione, la metabolizzazione e l'utilizzazione dell'acido linoleico e altri acidi grassi da parte delle cellule neoplastiche [Dauchy RT. 2003] (47);
- Stimola la produzione delle cellule natural killer, monociti e leucociti, ma aumenterebbe la produzione di Interleukina 2-6-10-12 (IL-2-6-10-12) e Interferone-gamma (IFN- γ) da parte delle cellule mononucleate, promuovendo una risposta linfocitaria T helper 1 [García-Mauriño S. 1999] (48);
- Riduce l'angiogenesi tumorale, inibendo l'espressione della proteina HIF-1 α , inducendo ipossia nelle cellule cancerose ed agendo sul Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [Lissoni P. 2001] (49), [Kim KJ. 2013] (50);
- Inibisce il rilascio di Ac. Arachidonico [Kornbliht LI. 1993] (51);
- Inibisce la Proteina-Chinasi C; favorisce l'apertura dei canali di potassio [Martín V. 2007] (52);
- Inibisce geni oncogeni, tra cui Rat sarcoma (RAS; Hras, Kras, NRas) [Mediavilla MD. 1997] See comment in PubMed Commons below
- Attiva e l'incrementa dei geni soppressori p21/WAF1 e p53 che agiscono arrestando il ciclo riproduttivo cellulare tumorale [Mediavilla MD. 1999] (30).

CONCLUSIONI

La revisione della letteratura conferma la notevole versatilità funzionale, della MLT che può infatti esercitare un effetto antitumorale sia diretto che indiretto in sinergismo fattoriale con altre molecole differenzianti/antiproliferative/immunomodulanti/trofiche del metodo di cura antitumorale formulato da Luigi Di Bella (Metodo Di Bella, MDB: Somatostatina, Retinoidi solubilizzati in vitamina E (25), Acido Ascorbico, Vitamina D3, Inibitori prolattinici, Condroitinsolfato). L'interazione della MLT con le molecole MDB contrasta i molteplici processi che caratterizzano il fenotipo neoplastico (induzione, promozione, progressione e/o disseminazione, mutazione tumorale). Tutte queste peculiarità suggeriscono l'impiego di tale molecola nelle patologie oncologiche. La risposta antitumorale positiva in termine di risposta obiettiva, mediane di sopravvivenza, performance status, la tollerabilità e l'assenza di rilevante tossicità è stata verificata in molte di migliaia di pazienti e comunicata a congressi nazionali, europei e mondiali, pubblicata in una trentina circa di lavori scientifici, che documentano in circa ottocento casi delle più varie patologie neoplastiche: sarcomi (54), glioblastomi (55), tumori della mammella (36) (45) (56) (57), della prostata (58), dei neuroblastomi (59), dei carcinomi esofagei (60), tumori polmonari non a

piccolo cellule (61), tumori cervico facciali (62), malattie linfoproliferative (63) (64) (65). Siamo agli inizi di un nuovo capitolo della fisiologia del sistema nervoso centrale, che prospetta l'evenienza di un dato evento come la risultante fattoriale di diverse serie di fattori. Fra questi non la MLT nella sua staticità molecolare, bensì nel suo dinamismo chimico esercita un ruolo, che, limitato prevalentemente al sistema serotonergico, può raggiungere estrema complessità e fine adattamento attraverso il sistema APUD piastrinico, e interferire in funzione antiblastica nell'etiopatogenesi e nell'evoluzione dei tumori. Così il Prof Luigi Di Bella ha definito l'integrazione della Melatonina nel suo Metodo con molecole immunomodulanti, trofiche differenzianti, antiproliferative affermando che con terapia medica senza la Melatonina non si può guarire completamente e stabilmente il tumore, e che essa rappresenta la condizione necessaria, anche se non sufficiente. Ha così sintetizzato il , il razionale la sua concezione terapeutico, il suo metodo biologico: *“Essere essenziale piu' che l'inattuabile ed immaginaria uccisione di tutti gli elementi neoplastici, la realizzazione di tutte le condizioni, note, possibili e non dannose entro determinati limiti, atte a ostacolarne lo sviluppo, fino alla morte anche per apoptosi, soprattutto attraverso l'intergioco fra i numerosi fattori di crescita... L'essenziale sta nell'attivare tutti gli inibitori dei noti fattori di crescita alle dosi e con tempestività e tempi opportuni. Il protocollo MDB è nato in quest'atmosfera, quella della vita e non dell'intossicazione e morte delle cellule, metodo che asseconda o esalta le reazioni vitali, senza ricercare con precisione statistica le dosi più opportune per uccidere. Il tumore è deviazione dalla vita normale, per cui occorre portare le reazioni deviate alla norma, attraverso l'esaltazione di tutti quei mezzi che la Fisiologia considera essenziali per la vita normale” - “Non esiste né esisterà alcun trattamento chemioterapico citotossico (né monoterapia) in grado di guarire un tumore solido, ma unicamente un Metodo, una multiterapia razionale e biologica, un complesso di sostanze sinergiche e fattorialmente interattive, singolarmente dotate di attività antitumorale atossica, che sequenzialmente o contemporaneamente agiscano centripetamente sulla miriade di reazioni biologiche della vita tumorale, riconducendo gradualmente alla normalità le reazioni vitali deviate dal cancro”.*

Bibliografia

1. Blask, D.E.; Sauer, L.A.; Dauchy, R.T. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr. Top Med Chem.* 2002, 2, 113–132.
2. Bartsch C, Bartsch H, Buchberger A, et al. Serial transplants of DMBA-induced mammary tumors in Fischer rats as a model system for human breast cancer. VI. The role of different forms of tumor-associated stress for the regulation of pineal melatonin secretion. *Oncology.* 1999; 56(2): 169–176.
3. Bartsch C, Kvetnoy I, Kvetnaia T, Bartsch H, Molotkov A, Franz H, Raikhlin N, Mecke D. Nocturnal urinary 6-sulfatoxymelatonin and proliferating cell nuclear antigen-immunopositive tumor cells show strong positive correlations in patients with gastrointestinal and lung cancer. *J Pineal Res.* 1997 Sep; 23(2): 90–6.
4. Meléndez J, Maldonado V, Ortega A. Effect of melatonin on beta-tubulin and MAP2 expression in NIE-115 cells. *Neurochem Res.* 1996 Jun;21(6):653-8.
5. Kvetnoĭ IM, Levin IM (1986). Melatonin and tumor growth. *Eksp Onkol.* 8(4): 11–15.
6. Di Bella L., Rossi, M.T.; Scalera, G. Perspectives in pineal function. *Prog. Brain Res.* 1979, 52, 475–478.
7. Di Bella L. Melatonin: An Essential Factor for the Treatment and Recovery from Leukemia and Cancer. In *Proceedings of International Symposium on Melatonin, Bremen, Germany, September 1980*; pp. 161–162.
8. Di Bella L. Melatonina dalla ricerca agli interventi – Atti del convegno – Reggio Calabria 23/01/97.
9. Lissoni P, Barni S, Mandalà M, Ardizzoia A, Paolorossi F, Vaghi M, Longarini R, Malugani F, Tancini G. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer.* 1999 Nov; 35(12): 1688–92. Bartsch H, Bartsch C, Deerberg F, Mecke D. Seasonal rhythms of 6-sulphatoxymelatonin (aMT6s) excretion in female rats are abolished by growth of malignant tumors. *J Pineal Res.* 2001 Aug;31(1):57-61.
10. Bartsch C et al. “The pineal Gland and cancer” Ed Springer 2001.
11. Di Bella L. *Cancro siamo sulla strada giusta?* Travel factory, 1998.
12. Lemus-Wilson, Kelly, Blask, Melatonin blocks the stimulatory effects of prolactin on human breast cancer cell growth in culture. *Br J Cancer.* 1995 Dec;72(6):1435-40.

13. Loureiro R, Magalhães-Novais S, Mesquita KA, Baldeiras I, Sousa IS, Tavares LC, Barbosa IA, Oliveira PJ, Vega-Naredo I. Melatonin antiproliferative effects require active mitochondrial function in embryonal carcinoma cells. *Oncotarget*. 2015 Jul 10;6(19):17081-96.
14. Bizzarri M, Cucina A, Valente MG, Tagliaferri F, Borrelli V, Stipa F, Cavallaro A. Melatonin and vitamin D3 increase TGF-beta1 release and induce growth inhibition in breast cancer cell cultures. *J Surg Res*. 2003 Apr; 110(2): 332–7.
15. Cos S, Verduga R, Fernández-Viadero C, Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture. *Neurosci Lett*. 1996 Sep 27; 216(2): 113–6.
16. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci*. 2013 Jan 24;14(2):2410-30. doi: 10.3390/ijms14022410.
17. Xi SC, Tam PC, Brown GM, Pang SF, Shiu SY. Potential involvement of mt1 receptor and attenuated sex steroid-induced calcium influx in the direct anti-proliferative action of melatonin on androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cells. *J Pineal Res*. 2000 Oct; 29(3): 172–83.
18. Lissoni P, Meregalli S, Nosetto L, Barni S, Tancini G, Fossati V, Maestroni G. Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. *Oncology*. 1996 Jan–Feb; 53(1): 43–6.
19. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept*. 2000 May-Aug;9(3-4):160-71. Review.
20. Kojima T, Mochizuki C, Mitaka T, Mochizuki Y. Effects of melatonin on proliferation, oxidative stress and Cx32 gap junction protein expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Cell Struct Funct*. 1997 Jun; 22(3): 347–56.
21. Kvetnoi IM, Levin IM. Melatonin and tumor growth (In Russian with English abstract). *EkspOnkol*. 1986; 8(4): 11–15.
22. Kvetnoy I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002 Apr; 23 Suppl 1: 92–6. Review. 214
23. Kvetnoy I et al. Melatonin and tumour growth: from experiments to clinical application. In Kvetnoy e Reiter, *Melatonin: general biological and oncoradiological aspects*, MRRC Press, Obninsk, 1994. pp 17–23.
24. Kvetnoy I, Sandvik AK, Waldum HL. The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin. *J Mol Endocrinol*. 1997 Feb;18(1):1-3. Review. No abstract available.

25. Di Bella L, Di Bella G. Solution of retinoids in vitamin E in the Di Bella Method biological multitherapy. *Neuro Endocrinol Lett.* 2015 Dec;36(7):661-76.
26. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/ anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* 2002 Feb; 2(2): 113–32. Review.
27. Tenorio Fd, Simões Mde J, Teixeira VW, Teixeira ÁA. Effects of melatonin and prolactin in reproduction: review of literature. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2015 May-Jun;61(3):269-74. doi: 10.1590/1806-9282.61.03.269
28. Di A., Xu R., Peng S., Shan H., Qian Z., Melatonin inhibits TRH-stimulation prolactin gene expression of anterior pituitary cells in newborn rat in vitro. *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao* 1997 Dec; 19 (6):430-5.
29. Griffith D, Bjoro T, Gautvik K, Haug E, Melatonin reduces the production and secretion of prolactin and growth hormone from rat pituitary cells in culture, *Acta Physiol. Scand.* 1987 Sept; 13 (1):43-9.
30. Mediavilla MD, Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci.* 1999; 65(4): 415–420.
31. Sauer et al. Polyunsaturated fatty acids, melatonin, and cancer prevention, *Biochem Pharmacol.* 2001 Jun 15; 61(12): 1455–62
32. Pawlikowski M, Winczyk K, Karasek M. Oncostatic action of melatonin: facts and question marks. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002 Apr;23 Suppl 1:24–9. Review
33. Rimler et al. Nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 May; 81(1): 77–84.
34. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2017 Mar 28;42(3):346-351. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2017.03.018.[Inhibitory effects of melatonin on breast cancer].Jiang Z1, Ma F1.
35. Di Bella L, Gualano L. Key aspects of melatonin physiology: thirty years of research. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006 Aug;27(4):425-32. Review.
36. Di Bella G. The Di Bella Method (DBM) improved survival, objective response and performance status in a retrospective observational clinical study on 122 cases of breast cancer. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011;32(6):751-62.
37. Hrushesky WJ, Grutsch J, Wood P, Yang X, Oh EY, Ansell C, Kidder S, Ferrans C, Quilton DF, Reynolds J, Du-Quilton J, Levin R, Lis C, Braun D. Circadian clock

- manipulation for cancer prevention and control and the relief of cancer symptoms. *Integr Cancer Ther.* 2009 Dec; 8(4): 387–97. Epub 2009 Nov 18. Review.
38. Özerkan D, Özsoy N, Yılmaz E. Vitamin D and melatonin protect the cell's viability and ameliorate the CCl₄ induced cytotoxicity in HepG2 and Hep3B hepatoma cell lines. *Cytotechnology.* 2015 Dec;67(6):995-1002. doi: 10.1007/s10616-014-9738-8. Epub 2014 Jul 6.
 39. Teplitzky SR, Kiefer TL, Cheng Q, Dwivedi PD, Moroz K, Myers L, Anderson MB, Collins A, Dai J, Yuan L, Spriggs LL, Blask DE, Hill SM. Chemoprevention of NMU-induced rat mammary carcinoma with the combination of melatonin and 9-cis-retinoic acid. *Cancer Lett.* 2001 Jul 26;168(2):155-63.
 40. Olivieri et al. Beta-amyloid modulates tyrosine kinase B receptor expression in SHSY5Y neuroblastoma cells: influence of the antioxidant melatonin. *Neuroscience.* 2003; 120(3): 659–65.
 41. Maestroni, Conti, Pierpaoli, Pineal melatonin, its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer, *Ann. NY Acad. Sci.* 1988; 521: 140–8.
 42. Vanecek, Cellular Mechanisms of Melatonin Action, *Physiol Rev* 1998; 78: 687–721.
 43. Codenotti S, Battistelli M, Burattini S, Salucci S, Falcieri E, Rezzani R, Faggi F, Colombi M, Monti E, Fanzani A. Melatonin decreases cell proliferation, impairs myogenic differentiation and triggers apoptotic cell death in rhabdomyosarcoma cell lines. *Oncol Rep.* 2015 Jul;34(1):279-87. doi: 10.3892/or.2015.3987. Epub 2015 May 19.
 44. Taysi et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and nitric oxide during irradiation-induced oxidative injury in the rat liver, *J Pineal Res.* 2003 Apr; 34(3): 173–7.
 45. Margheri M, Pacini N, Tani A, Nosi D, Squecco R, Dama A, Masala E, Francini F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Combined effects of melatonin and all-trans retinoic acid and somatostatin on breast cancer cell proliferation and death: molecular basis for the anticancer effect of these molecules. *Eur J Pharmacol.* 2012 Apr 15;681(1-3):34-43. Epub 2012 Feb 21.
 46. Eck KM, Yuan L, Duffy L, Ram PT, Ayyetey S, Chen I, Cohn CS, Reed JC, Hill SM, A sequential treatment regimen with melatonin and all-trans retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 tumor cells, *British Journal of Cancer.* 77(12):2129-37, 1998 Jun.
 47. Dauchy RT, Blask DE, Sauer LA, Davidson LK, Krause JA, Smith LC, Dauchy EM. Physiologic melatonin concentration, omega-3 fatty acids, and conjugated linoleic acid inhibit fatty acid transport in rodent hind limb skeletal muscle in vivo. *Comp Med.* 2003 Apr;53(2):186-90.

48. García-Mauriño S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 1999;65(20):2143-50
49. Lissoni P, Rovelli F, Neuro Endocrinol Lett. 2001;22(1):45-7. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients.
50. Kim KJ, Choi JS, Kang I, Kim KW, Jeong CH, Jeong JW. Melatonin suppresses tumor progression by reducing angiogenesis stimulated by HIF-1 in a mouse tumor model. *J Pineal Res.* 2013 Apr;54(3):264-70.
51. Kornblihtt LI, Finocchiaro L *J Pineal Res.* 1993 May;14(4):184-91. Inhibitory effect of melatonin on platelet activation induced by collagen and arachidonic acid.
52. Martín V, Herrera F, García-Santos G, *J Pineal Res.* 2007 Oct;43(3):239-44. Involvement of protein kinase C in melatonin's oncostatic effect in C6 glioma cells.
53. Mediavilla MD, Gúezmez A, Ramos S *J Pineal Res.* 1997 Mar;22(2):86-94. Effects of melatonin on mammary gland lesions in transgenic mice overexpressing N-ras proto-oncogene.
54. Di Bella G, Toscano R, Ricchi A, Colori B. Congenital fibrosarcoma in complete remission with Somatostatin, Bromocriptine, Retinoids, Vitamin D3, Vitamin E, Vitamin C, Melatonin, Calcium, Chondroitin sulfate associated with low doses of Cyclophosphamide in a 14-year Follow Up. *Case Report. Neuro Endocrinol Lett.* 2016 Jan 27;36(8):725-733.
55. Di Bella G, Leci J, Ricchi A, Toscano R. Recurrent Glioblastoma Multiforme (grade IV - WHO 2007): a case of complete objective response - concomitant administration of Somatostatin / Octreotide, Retinoids, Vit E, Vit D3, Vit C, Melatonin, D2 R agonists (Di Bella Method). *Neuro Endocrinol Lett.* 2015;36(2):127-32.
56. Di Bella G, Mascia F, Ricchi A, Colori B. Evaluation of the safety and efficacy of the first-line treatment with somatostatin combined with melatonin, retinoids, vitamin D3, and low doses of cyclophosphamide in 20 cases of breast cancer: a preliminary report. *Neuro Endocrinol Lett.* 2013;34(7):660-8.
57. Di Bella G. Complete objective response to biological therapy of plurifocal breast carcinoma. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008 Dec;29(6):857-66.
58. Di Bella G, Mascia F, Colori B. The Di Bella Method (DBM) in the treatment of prostate cancer: a preliminary retrospective study of 16 patients and a review of the literature. *Neuro Endocrinol Lett.* 2013;34(6):523-8. Review.
59. Di Bella G, Colori B. Complete objective response of neuroblastoma to biological treatment. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009;30(4):437-49.

60. Di Bella G, Madarena M. Complete objective response of oesophageal squamocellular carcinoma to biological treatment. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009;30(3):312-21.
61. Norsa A, Martino V (2006). Somatostatin, retinoids, melatonin, vitamin D, bromocriptine, and cyclophosphamide in advanced non-small-cell lung cancer patients with low performance status. *Cancer Biother Radiopharm.* 21(1): 68–73.
62. Di Bella G, Colori B (2012). The Di Bella Method (DBM) improved survival, objective response and performance status in a retrospective observational clinical study on 23 tumours of the head and neck. *Neuro Endocrinol Lett.* 33(3): 249–56.
63. Todisco M (2009). Chronic lymphocytic leukemia: long-lasting remission with combination of cyclophosphamide, somatostatin, bromocriptine, retinoids, melatonin, and ACTH. *Cancer Biother Radiopharm.* 24(3): 353–5.
64. Todisco M, Casaccia P, Rossi N (2001). Cyclophosphamide plus somatostatin, bromocriptin, retinoids, melatonin and ACTH in the treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphomas at advanced stage: results of a phase II trial. *Cancer Biother Radiopharm.* 16(2): 171–7.
65. Di Bella G, Colori B, Mascia F (2012). The Di Bella Method (DBM) improved survival, objective response and performance status in a retrospective observational clinical study on 55 cases of lymphomas. *Neuro Endocrinol Lett.* 33(8): 773–81.

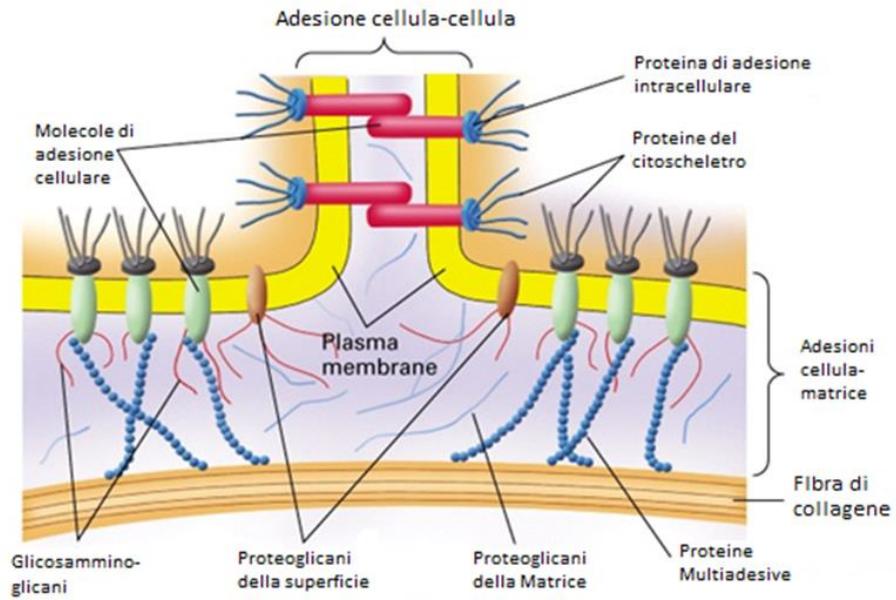


FIGURA 1 : adesione cellula-cellula. La melatonina induce la proteina CX-32 degli spazi di giunzione ed incrementa la polimerizzazione della tubulina con aumento dei microtubuli nelle cellule.

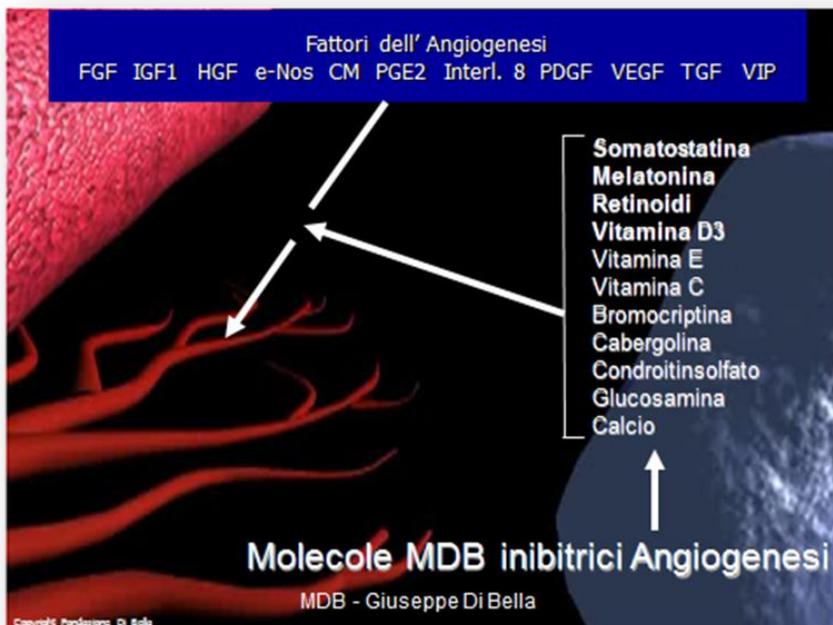


FIGURA 2

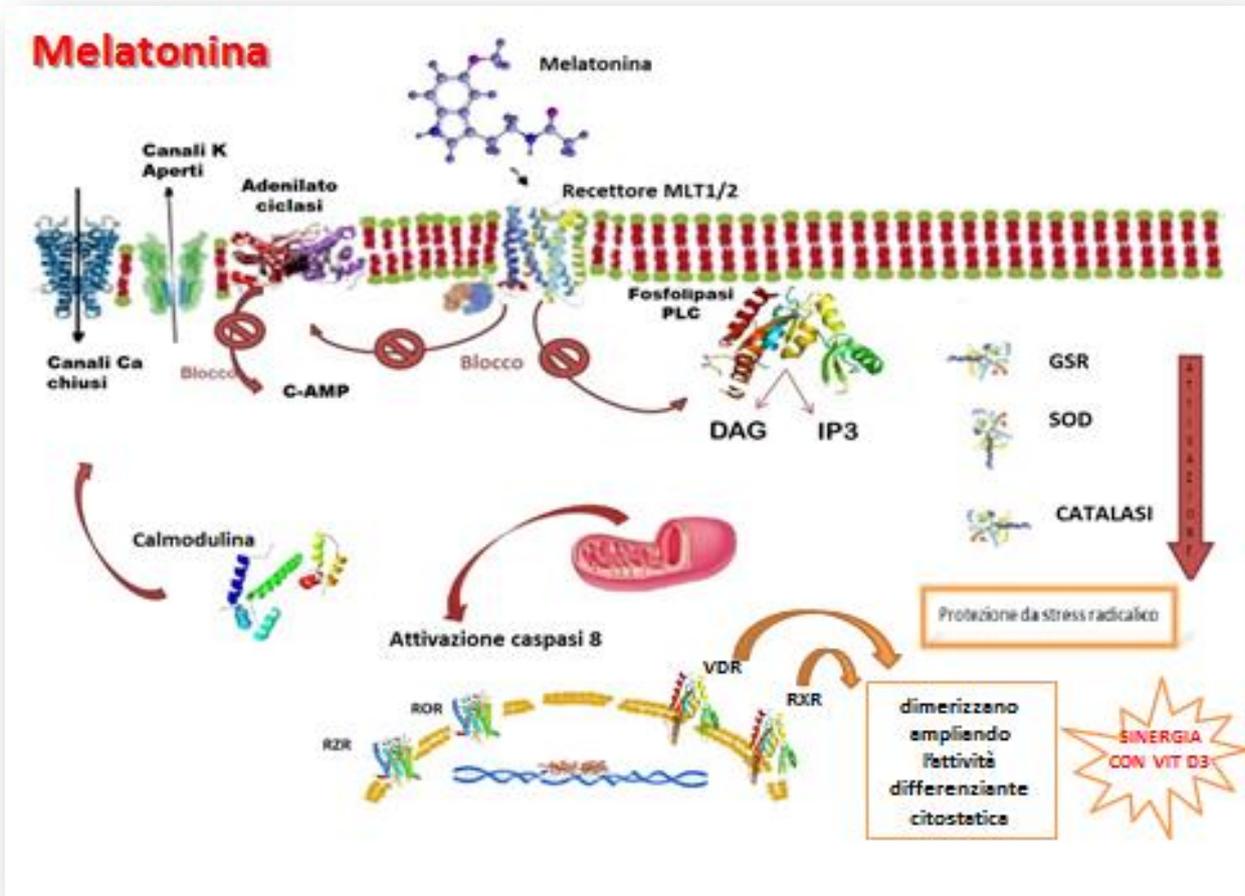


FIGURA 3

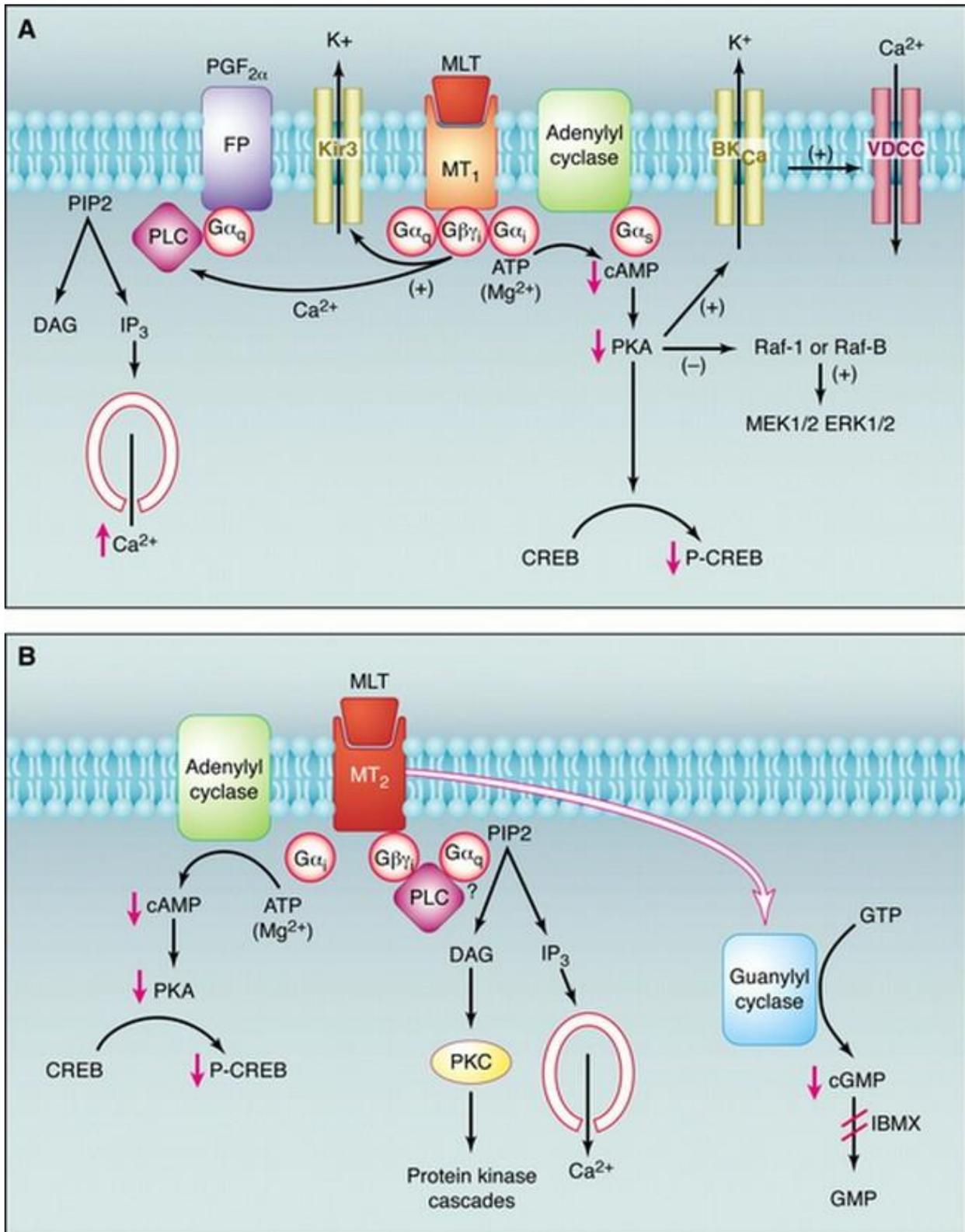


FIGURA 4

- 1) L'idrosolubilizzazione della Melatonina incrementandone biodisponibilità e diffusione ubiquitaria, ne facilita ed potenzia la capacità di legare i recettori nucleari RZR, ROR, e di transmembrana (MT1 e MT2) con 7 domini transmembrana associati a proteine G che, attivano multiple linee di segnalazione :

- il legame col recettore MT1 inibisce l'Adenilato Ciclasi e conseguentemente il secondo messaggero (cAMP) e le reazioni di fosforilazione della proteina PKA;
 - il legame col recettore MT2 inibisce la Guanilato Ciclasi e la formazione del GTP; e della proteina RAS.
- 2) La melatonina regola negativamente la Fosfolipasi C e i secondi messaggeri IP3 e DAG.
 - 3) La melatonina attiva anche la via intrinseca mitocondriale che porta all'attivazione della CASPASI 8 inducendo quindi l'apoptosi.
 - 4) La melatonina è responsabile dell'attivazione di una via citostatica quando è a contatto con la proteina citosolica Calmodulina; il legame MLT-Calmodulina riduce i livelli di Ca²⁺ citosolico e chiude, a livello della membrana plasmatica, in canali di Ca²⁺ in entrata
 - 5) La melatonina, soprattutto a livello preventivo, inibisce le più importanti reazioni di ossidoriduzione, agendo a livello dei seguenti enzimi: Catalasi, superossidodismutasi, glutatione reduttasi. Da qui si ha il blocco delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (NOS).
 - 6) La melatonina a livello della membrana nucleare interagisce con 2 recettori RZR (orfano) e ROR, attivabili anche dai retinoidi. I recettori RAR e RXR dei retinoidi e VDR della vitamina D, ROR e RZR dimerizzano e attivando così, in modo amplificato, i fattori di trascrizione nucleare attraverso reazioni di metilazione, silenziano le sequenze dei geni della mutazione con effetto collaterale citostatico.

(FIGURA 3-4)