

**Il sinergismo di somatostatina, melatonina, retinoidi, vitamin E, D3, C, inibitori prolattinici ed estrogenici, microdosi metronomiche di ciclofosfamide, ha incrementato sopravvivenza, risposte obiettive, performance status, in 297 casi di carcinomi del seno.**

**Keywords:** carcinoma mammella, somatostatina, octreotide, estrogeni, prolattina, melatonina, retinoidi, vitamine. E, D, C, Metodo Di Bella(DBM).

### **Abstract**

**Obiettivi:** migliorare la sopravvivenza, la risposta obiettiva ,la qualità di vita con una terapia biologica atossica, in considerazione che le neoplasie della mammella costituiscono ancora in tutto il mondo la prima causa di morte delle donne.

**Metodo:** il MDB con MLT, Retinoidi, solubilizzati in vitamina E, vitamine D3, C, Folati, proteoglicani, Calcio, esercita un effetto differenziante citostatico, antiangiogenico, immunomodulante, fattorialmente sinergico, potenziando contemporaneamente quelle funzioni che la fisiologia considera essenziali per la vita. Con Somatostatina e/o analoghi, inibitori prolattinici D2R agonisti, blocco estrogenico, esercita un'interazione antiproliferativa e antiangiogenica, antimetastatica, regolando negativamente increti pituitari come GH-PRL, le cui proprietà mitogene sono esaltate dal concorso di ormoni ovarici come l'estrogeno. La regolazione negativa del GH si estende a IGF-1, EGF, VEGF, GH-dipendenti. Il MDB impiega minimali dosaggi metronomici apoptotici, non citotossici e non mutageni, di ciclofosfamide, la cui tollerabilità è esaltata dalla MLT e dalle vitamine del MDB.

**Risultati:** risposte obiettive complete e stabili senza chemioterapia citolitica, in alcuni casi anche senza chirurgia, radioterapia, con miglioramento generalizzato della qualità di vita e assenza di rilevante e/o prolungata tossicità. Il dato più rilevante la sopravvivenza a 5 anni del 69,4% allo Stadio IV, contro il 26,3% del NCI.

### **Abbreviazioni**

- ATRA            – All Trans Retinoic Acid
- DBM            – Di Bella's Method
- EGF             – Epidermal Growth Factor
- EGFR           – Epidermal Growth Factor Receptor

- ER – Estrogen Receptor
- FGF – Fibroblastic Growth Factor
- G – Gastrin
- GF – Growth Factor
- GH – Growth Hormone
- GHR – Growth Hormone Receptor
- HGF – Hepatocyte Growth Factor,
- IGF1-2 – Insulin-like Growth Factor 1-2
- IGFR – Insulin-like Growth Factor Receptor
- IL8 – Interleuchin 8
- MRI – Magnetic Resonance Imaging
- MLT – Melatonin
- NGF – Nerve Growth Factor
- NHL – Non-Hodgkin’s Lymphoma
- NOSe – Endothelial Nitric Oxide Synthase
- PDGF – Platelet-Derived Growth Factor
- PET – Positron Emission Tomography
- PG2 – Prostaglandin 2
- SST – Somatostatin
- SSTR – Somatostatin Receptor
- TGF – Transforming Growth Factor
- TRK – Tyrosine-kinase
- VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor
- VIP – Vasoactive Intestinal Peptide
- 

## **INTRODUZIONE**

Nel cancro al seno è generalmente indicata la chirurgica, associabile a chemioterapia, blocco estrogenico, radioterapia singolarmente o variamente associate, oltre ad anticorpi monoclonali selettivi per i recettori del fattore di crescita epidermico (EGFR).

Il tumore della mammella è la più frequente neoplasia femminile, e la prima causa di morte delle donne.

Negli ultimi anni numerose molecole biologiche componenti del MDB, come la somatostatina e analoghi, agonisti dei D2R, la melatonina, componenti della matrice extracellulare come calcio e

condroitinsolfato, differenti classi di vitamine, quali Retinoidi, Vitamina D3, C, Tocoferoli, Folati, si sono mostrate utili nella prevenzione e terapia del tumore al seno (Seitz et al. 2013; Sanchez-Barcelo et al. 2012; Tang & Gudas 2012; Mehta et al. 2012; Frati et al. 2011; Fulan et al. 2011;). Numerosi studi in vitro condotti su svariate linee cellulari, ne hanno evidenziato le spiccate attività antitumorali, chiarendo da una parte i meccanismi d'azione, e aprendo la strada al raggiungimento di risultati incoraggianti nella pratica clinica (Proietti et al. 2012; Margheri et al. 2012; Cescon et al. 2012; Ostendorf et al. 2012; Suhail et al. 2012; Zhang et al. 2012; Proietti et al. 2011; He et al. 2009; Watt et al. 2009; Lee et al. 2008). Recentemente sono stati pubblicati vari studi clinici sull'impiego della questa terapia biologica MDB in un rilevante numero dei pazienti di numerose e differenti varietà neoplastiche a dimostrazione che essi agiscano sui denominatori comuni basilari della biologia neoplastica. Gli autori riportano di seguito un studio clinico osservazionale retrospettivo con monitoraggio fino a 5 anni, condotto su 297 pazienti affette da carcinoma mammario, alle quali è stata somministrata la terapia biologica (Metodo Di Bella, DBM).

## **MATERIALI E METODI**

### **Criteri di arruolamento.**

Sono state arruolate esclusivamente le pazienti con diagnosi istologica di tumore al seno e con caratteristiche di malattia misurabile in accordo con i Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) (Patrick et al. 2000).

Sono state monitorate 297 pazienti affette da cancro al seno con esame istologico, grado nucleare, esami immunoistochimici, determinazione del recettore dell'estrogeno, progesterone, del fattore epidermico di crescita, Cromogranina, NSE, indice proliferativo ed esami strumentali come CT-PET-RMN - ECOGRAFIE del collo, seni, cavi ascellari, addome pelvi, - esami DEL SANGUE - Emocromo, azotemia, glicemia, urine, creatinina, ves, got, gpt, ggt, bilirubina, fosfatasi alcalina, alfafetoproteina, ammoniemia, uricemia, LDH, proteine totali e frazionate, sideremia, calcemia, elettroliti sierici ferritina, Ft3, Ft4, TSH, GH, IGF1, LH, FSH, Estradiolo, Progesterone, Prolattina, Cromogranina NSE, CEA, Ca 15-3, Ca 125, Ca 19-9. Ogni paziente è stata trattata con i componenti del Metodo Di Bella

In base allo stadio del cancro al seno, al momento dell'inizio del trattamento, le pazienti sono state divise in 3 gruppi.

Il primo gruppo, CANCRO AL SENO LOCALE, con neoplasia limitata ad un solo distretto anatomico.

Il secondo gruppo CANCRO AL SENO REGIONALE con neoplasia estesa ai linfonodi.

Il terzo gruppo CANCRO AL SENO AVANZATO con neoplasia metastatica.

In base all'ordine di inserimento del MDB nell'approccio terapeutico dei tumori del seno sono stati così suddivisi:

1°) MDB di prima linea, per le pazienti che precedentemente avevano subito solo l'intervento chirurgico

2°) Il MDB di seconda linea in pazienti in cui il MDB è stato preceduto dai protocolli oncologici adiuvanti tradizionali per la durata massima di 6 mesi.

3°) pazienti al 4° stadio in progressione che hanno iniziato il MDB dopo ripetuti trattamenti polichemio-radioterapici per periodi superiori ad un anno.

Le risposte cliniche obiettive sono state ordinate e statisticamente classificate in tre gruppi: REGRESSIONE, STABILITA', PROGRESSIONE. Sono stati anche valutati tra gli effetti del MDB la tossicità, e la qualità di vita. E' stata valutata anche la sopravvivenza RELATIVA, ovvero alla percentuale di pazienti sopravvissute dopo 5 anni dalla diagnosi di cancro al seno, in rapporto alla sopravvivenza media di un gruppo di donne della stessa età, e provenienza geografica, in buone condizioni di salute. Quest'ultimo indice è stato poi confrontato con i risultati pubblicati dal "National Cancer Institute", prima agenzia Americana per la raccolta e la gestione di dati relativi a pazienti oncologici.

## **RISULTATI :**

La **Tab.1** (mostra l'esito clinico in termini di, REGRESSIONE, STABILITA' e PROGRESSIONE della patologia. I maggiori successi clinici, come era atteso, si sono avuti nel primo gruppo di pazienti, CANCRO AL SENO LOCALE, in cui si è costantemente riscontrata una risposta clinica di regressione sempre maggiore dell'80 %. Nel secondo gruppo di pazienti con patologia LOCALMENTE AVANZATA, i risultati più promettenti si sono registrati nel trattamento con MDB di prima linea, dove ben l' 87, 5 % delle pazienti è andato in regressione. Per quanto riguarda invece, CANCRO AL SENO METASTATICO, sia il trattamento di prima linea, sia quello di seconda linea registrano una percentuale di casi in regressione pari al 20 %, la metà invece, il 10 %, si ha quando il trattamento Di Bella è stato applicato in pazienti ripetutamente polichemio-radiotrattate, in progressione, non più responsive, generalmente in condizioni critiche, scadute..

**Table 1** Percentage of patients with remission, stability and progression, after DBM with different treatment modality (exclusive, adjuvant or 2<sup>nd</sup>/ 3<sup>rd</sup> line therapy), for different staging at the date of enrolment.

Staging at the date of Enrolment	Treatment Modality	Patients n.	Result	%
Early Stage Breast Cancer (Stage I - II - III)	Exclusive Therapy	27	Remission=23	81.50%
			Stability=1	3.70%
			Progression=3	14.80%
	Adjuvant Therapy	87	Remission=74	81.50%
			Stability=2	2.30%
			Progression=11	12.60%
	2 <sup>nd</sup> / 3 <sup>rd</sup> Line Therapy or Supportive	34	Remission=28	82.40%
			Stability=5	14.70%
			Progression=1	2.90%
Locally advanced	Exclusive Therapy	4	Remission=1	25%
			Stability=1	25%
			Progression=2	50%
	Adjuvant Therapy	8	Remission=7	87.50%
			Progression=1	12.50%
	2 <sup>nd</sup> / 3 <sup>rd</sup> Line Therapy or Supportive	3	Remission=1	33.30%
Metastatic Breast Cancer	Exclusive Therapy	9	Remission=2	22.20%
			Stability=2	22.20%
			Progression=5	55.60%
	Adjuvant Therapy	18	Remission=4	22.20%
			Stability=1	5.60%
			Progression=13	72.20%
	2 <sup>nd</sup> / 3 <sup>rd</sup> Line Therapy or Supportive	104	Remission=11	10.60%
			Stability=20	19.20%
			Progression=73	70.20%
Stage not defined		3	-	-
Total			297	

**Table 2** Statistical Observation on Survival (Observed and Relative) at 5 years after diagnosis and initial stage: (Localized=confined to primary site - Regional=extended to regional lymph nodes - Distant=metastatic tumor).

MDB- Observed and Relative Survival (5 years)				
Initial diagnosis	Observed patients N.	Survived patients n.	Observed Survival (%)	Relative Survival (%)
Localized	52	49	94.2%	98.1%
Regional	91	77	84.60%	88%
Distant	15	10	66.70%	69.40%
Undefined initial diagnosis	29	27	93.1%	96.2%
SubTotal	187	163	87.2%	90.4%
Others (data/diagnosis <5years)	107	-	-	-
No classiable	3	-	-	-
Total	297	-	-	-

Nella **Tab.3** il risultato di una sub-analisi effettuata sui 40 casi (a tutti gli stadi) trattati con MDB in “Terapia Esclusiva”.

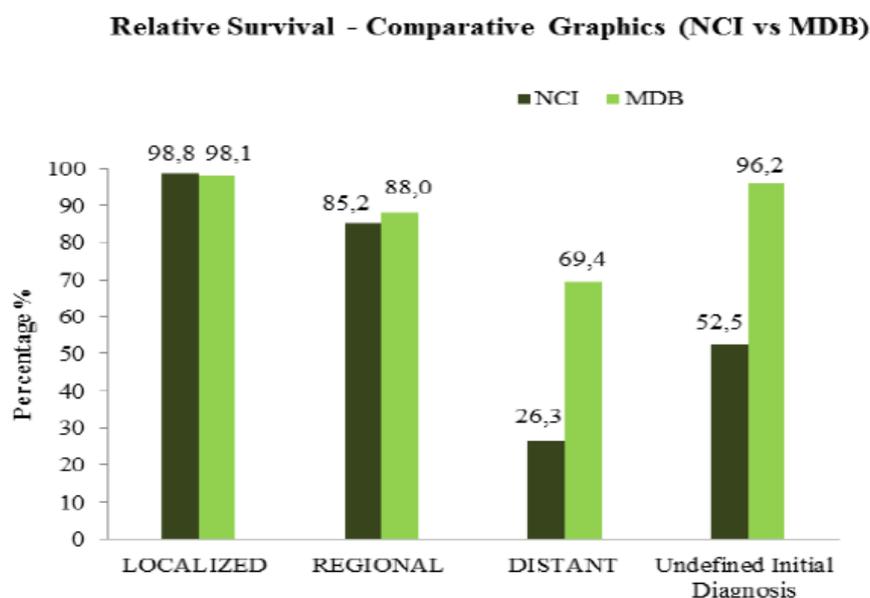
I 40 casi sono classificati in base al tipo di risposta ottenuto nel periodo di osservazione (criteri RECIST) CR = Complete Response; PR = Partial Response; SD = Stable Disease; PD = Progressive Disease; DFS = Periodo libero da malattia; PFS = Sopravvivenza Libera da Progressione

Table 3 Observation of therapeutic response of 40 cases of breast cancer treated with only DBM.

Identity and Staging					Overall Response (global Response)				Maintenance of clinical remission					PFS			
Patient ID	Age at Diagnosis	Age at Enrolment	Grade	Stage	CR	PR	SD	PD	Start therapy	Stable response over time	Temporary answer	No answer	DFS (month)	Conclusion of the observation	Observation period (months)	PFS (month)	PFS / observation period
138	51	51	n.d.	IIA	X	-	-	-	Dec-04	X	-	-	105	Nov-14	119	119	100%
586	62	68	n.d.	IV	-	X	-	-	Dec-06	X	-	-	-	Oct-10	42	42	100%
601	52	52	G2	I	X	-	-	-	Mar-06	X	-	-	104	Still under obser	118	118	100%
614	56	56	n.d.	IIA	-	X	-	-	Jul-06	X	-	-	-	Jul-11	60	60	100%
657	57	57	n.d.	IIA	-	X	-	-	Jun-06	X	-	-	-	Oct-07	17	17	100%
799	42	43	G3	IIIC	-	-	-	X	Jan-07	-	X	-	-	May-08	18	2	11%
895	72	72	n.d.	IIIB	-	-	-	X	Mar-07	-	-	X	-	Feb-08	5	0	0%
970	69	69	G3	IV	-	-	-	X	Apr-08	-	X	-	-	Sep-09	17	2	12%
994	54	55	G3	IV	-	-	-	X	May-09	-	X	-	13	Jan-15	75	41	55%
1101	50	51	nd	IIB	X	-	-	-	Mar-07	X	-	-	106	Still under obser.	117	117	100%
1941	47	47	n.d.	IIA	X	-	-	-	Apr-09	X	-	-	45	Sep-13	65	65	100%
2178	68	68	n.d.	IIA	-	X	-	-	Jun-09	X	-	-	-	Still under obser.	81	81	100%
2224	52	65	G1	IV	-	-	-	X	Aug-09	-	X	-	-	Aug-11	24	10	42%
2580	55	55	G2	IIIA	-	-	-	X	Mar-10	-	X	-	-	Jul-13	40	0	0%
2706	37	37	G2	IIB	-	X	-	-	May-10	X	-	-	-	Sep-12	27	27	100%
2898	55	55	G2	I	X	-	-	-	Sep-10	X	-	-	5	Nov-13	22	22	100%
3029	45	45	G1	IIA	X	-	-	-	Dec-10	X	-	-	48	Still under obser.	72	72	100%
3048	49	49	G3	IIB	X	-	-	-	Dec-10	X	-	-	34	May-14	42	42	100%
3056	62	62	G2	IIB	-	X	-	-	Dec-10	X	-	-	-	Still under obser.	92	92	100%
3361	34	35	G2	IIIB	X	-	-	-	Feb-11	X	-	-	59	Still under obser.	74	74	100%
3617	41	41	G1	IIA	X	-	-	-	Jul-11	X	-	-	48	Still under obser.	60	60	100%
3696	53	53	G2	IIA	X	-	-	-	Sep-11	X	-	-	9	Nov-12	14	14	100%
3734	37	39	n.d.	I	-	X	-	-	Oct-99	X	-	-	-	Still under obser.	171	171	100%
3950	64	64	n.d.	IIA	-	-	-	X	Dec-11	-	X	-	-	Jan-15	36	25	69%
4253	49	56	G1	I	-	X	-	-	Mar-12	X	-	-	-	Still under obser.	57	57	100%
4358	43	43	G2	IIIA	X	-	-	-	Apr-12	X	-	-	41	Still under obser.	45	45	100%
4548	45	45	n.d.	IIB	-	-	-	X	Jul-12	-	X	-	-	Still under obser.	57	25	44%
4614	48	48	n.d.	I	X	-	-	-	Sep-12	X	-	-	42	Still under obser.	54	54	100%
4688	67	67	G3	IIIB	-	-	X	-	Sep-12	X	-	-	-	Nov-15	36	36	100%
4851	31	31	n.d.	IIB	X	-	-	-	Aug-12	X	-	-	22	Oct-14	26	26	100%
4967	64	65	n.d.	IIA	X	-	-	-	Mar-12	X	-	-	19	Still under obser.	51	51	100%
4971	46	46	G3	IV	-	-	-	X	Feb-13	-	X	-	-	Aug-16	42	16	38%
5502	59	59	G2	I	-	-	X	-	Sep-13	X	-	-	-	Still under obser.	38	38	100%
5779	60	60	G3	IV	-	-	X	-	Sep-13	X	-	-	-	Mar-14	6	6	100%
5826	64	64	G2	IV	-	-	X	-	Jun-13	X	-	-	-	Still under obser.	41	41	100%
6167	48	48	n.d.	IIA	X	-	-	-	Oct-13	X	-	-	24	Still under obser.	41	41	100%
6287	68	68	G2	IIA	X	-	-	-	Jul-12	X	-	-	19	Still under obser.	56	56	100%
6435	41	42	n.d.	IV	-	X	-	-	May-15	X	-	-	-	Still under obser.	21	21	100%
6514	54	54	n.d.	I	-	X	-	-	Mar-13	X	-	-	-	Still under obs.	50	50	100%
6624	47	48	G2	IV	-	-	-	X	May-14	-	-	X	-	Nov-15	6	0	0%

CR=Complete Response; PR=Partial Response; SD=Stable Response; PD=Progressive Response; DFS=Disease Free Survival; PFS=Free from Progressive Survival.

In FIG.2 si ha una valutazione della percentuale di donne sopravvissute 5 anni dalla data di diagnosi, trattate con MDB vs terapia oncologiche ufficiali riportate dal National Cancer Institute.



**Figure 2** Comparative graphics of breast cancer survival 5 years after diagnosis between DBM oncological treatment and official oncological treatment reported by Nation Cancer Institute. The statistic evaluation depends from the type of tumor (localized, regional and distant).

## Trattamento.

Tutte le pazienti hanno ricevuto una combinazione giornaliera di Somatostatina/octreotide, Melatonina, Retinoidi solubilizzati in Alfa Tocoferile Acetato, agonisti dopaminergici, inibitori estrogenici e dosaggi minimali di ciclofosfamide.

Nel dettaglio, sono state somministrate nelle seguenti modalità:

dosaggio graduale per os di:

- **Ac. Retinoico**, [ATRA] gr 0, 25( 488.372 IU), + axeroftolo palmitato gr 0,25 (909000 IU) + Betacarotene gr. 1(3 334 000 IU) solubilizzati in alfa tocoferile acetato gr 500, rapporto stechiometrico 1:1:4:2)(1×106 IU); una volta al dì per sette giorni a digiuno, dopo altri 7 giorni due volte al giorno; dalla terza settimana, per l'intera durata del trattamento, 3 volte al giorno, per os;
- **Diidrotachisterolo** 10 gocce per ogni somministrazione dei retinoidi (15 200 IU) in concomitanza con i Retinoidi, 30 al dì ;
- **Somatostatina** (1mg) somministrazione scalare (1 mg nei primi 7 giorni, con somministrazione finale di 3 mg a 21 giorni di trattamento);
- **Tetracosactide esacetato** (0, 25 mg) aggiunta a giorni alterni nella stessa siringa con la somatostatina,, monitorando costantemente pressione e glicemia;
- **Octreotide** a lento rilascio LAR (20 mg) ogni 3 settimane intramuscolo;
- **Triptoreline..** analoghi LH- FSH 3, 75 mg intramuscolo ogni 4 settimane;

- **Melatonina** idrosolubilizzata in legame d'idrogeno con Adenosina, stabilizzata con Glicina in cpr blisterizzate da 5 mg per os: 3 cpr (15 mg ) a mezzodì, e sera ai pasti oltre a 10 cpr (50) mg prima di coricarsi (dosaggio giornaliero complessivo medio = 80 mg);
- **Cabergolina** per os durante il pasto principale 1 mg (uguale a 1\2 compressa) 2 volte la settimana;
- **Bromocriptina** (2, 5 mg) per os mezza compressa mattino e sera;
- **Anastrozolo cpr 1 mg;**
- **Ciclofosfamide** (50-100 mg) per os, dosaggio graduale: iniziare con 1 compressa al pasto principale, dopo una settimana alternare un giorno 1cpr mattino e sera un giorno solo la sera
- **Idrossiurea** 500-1000 mg/dì se non tollerato l'Endoxan o se ripetizioni cerebrali per la capacità dell'idrossiurea di superare la barriera emato-encefalica;
- **Acido Ascorbico** (Vit C) per os, dosaggio graduale: 1/2 cucchiaino (4 g ) in un bicchiere d'acqua mezzodì e sera durante il pasto insieme a:
- **Calcio lattato gluconato +calcio carbonato** pari a 1000 mg di calcio mezza bustina nello stesso bicchiere;
- **Condroitinsolfato** (500 mg) una capsula mattino mezzodì e sera ai pasti;
- **Ferrograd** una cpr 2 – 3 volte la settimana, in base alla sideremia ed emocromo;
- **Calciolevofolinato** una cps da 22 mg al dì;
- **Acido ursodesossicolico** (UDCA) 300 mg per contrastare l'inibizione coleretica e colagoga dei SST e/o octreotide;
- **Taurina** 1500-2000 mg /dì quando necessario per migliorare la funzionalità cardiaca ed epatica.

### **Valutazione della Sicurezza e della Tossicità:**

Per la valutazione della tossicità sono stati considerati esclusivamente gli eventi avversi potenzialmente correlabili al trattamento (gradi di correlazione: possibile, probabile o certo, espressi come frequenza assoluta (n), relativa (%), ed intervallo di confidenza (CI) al 95%), come descritto dal National Cancer Institute (NCICTC) criteria (<http://www.eortc.be/services/doc/ctc/>).

**Nota:** questo è uno studio sull'uso combinato di farmaci che hanno già superato tutti i test di affidabilità e attività antitumorale. Pertanto, poiché tutti i farmaci sono già ampiamente testati e il cui uso è approvato dalle organizzazioni sanitarie internazionali, ma in questo contesto sono utilizzati solo in una nuova combinazione, è stato deciso di non sottoporsi a qualsiasi comitato etico. Questo studio è stato condotto in accordo con le direttive stabilite dal The Good Clinical Practices directives (Sackett et al. 1996) e dalla Dichiarazione di Helsinki.

Tutte le pazienti hanno pertanto dato il proprio consenso informato per la partecipazione allo studio.

## DISCUSSIONE, RAZIONALE DELLA TERAPIA

La perdita di differenziazione e la proliferazione incontrollata, anche se in misura diversa, sono denominatori comuni a tutte le neoplasie. L'espressione recettoriale ubiquitaria della Prolattina [Ben-Jonathan N 2002, Hooghe R, 1998] e del GH [Lincoln DT, 1998, De Souza I, 1974] rappresenta una delle conferme della potenzialità oncogena generalizzata di queste molecole. (Wu et al. 2011; Xu et al. 2012). Numerosi studi documentano chiaramente che gli ormoni pituitari GH e PRL, hanno un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione dei tumori (Schally et al. 2001; Kamenicky et al. 2010; Perry et al., 2008; Harvey 2012; Bernichtein et al. 2010; Faupel-Badger et al. 2010; Raccurt et al. 2002). Su base endocrina, biologica, biochimica, molecolare, è documentato ed evidente il ruolo primario dell'asse "*Ormone della Crescita-Prolattina-Fattori di crescita*", in tutti i tumori, e nelle neoplasie della mammella, in sinergismo con l'estrogeno.

Il GH è il principale mediatore della crescita postnatale delle cellule somatiche [Le Roith D, 2001], i suoi effetti sulla crescita e differenziazione cellulare sono mediati attraverso l'interazione col recettore (GHR) [Le Roith D, 2001- Zhu T, 2001] che attiva vie di trasduzione del segnale critiche per la crescita cellulare e la sopravvivenza, compresi i trasduttori del segnale (JAK-2 / STAT), la cascata della proteina chinasi mitogeno attivata ( / P44 / 42 (MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase), e della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) [Le Roith D, 2001- Zhu T, 2001]. Il recettore del GH appartiene alla grande famiglia dei recettori delle citochine o ematopoietici, che non contengono il dominio della tirosin-chinasi nella loro regione citoplasmatica.

La famiglia dei recettori di GH\citochine (Classe I) e la famiglia dei recettori di interferone (Classe II) condividono sia caratteristiche strutturali, recentemente identificate, che comuni vie di trasduzione del segnale. Inoltre, entrambe le classi di recettori sono associate con vari membri della famiglia delle Janus tirosin chinasi e attivano una nuova famiglia di fattori di trascrizione, che mettono in relazione i ligandi con l'attivazione dell'espressione genica [Goffin V, 1996].

Un'ampia distribuzione con concentrazioni variabili dei GHR è stata osservata in molti tipi di cellule sia normali che neoplastiche, con netta e significativa prevalenza nelle cellule tumorali proporzionale all'indice proliferativo e alla capacità invasiva e metastatizzante [Lincoln DT, 1998].

È stata anche documentata la sintesi citoplasmatica di GHR a livello del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi [Lincoln DT, 1998], ed evidenziato che il GH nel siero circola complessato con GHBP (Growth Hormone-Binding Protein) [Baumann G, 1986- Herington AC, 1986]. La GHBP sierica umana contiene la porzione extra cellulare del GHR e può essere prodotta da uno specifico taglio proteolitico del dominio extracellulare del GHR [Edens A, 1994]. La porzione proteica extracellulare che lega l'ormone è quindi comune sia al GHR che al GHBP. Anche il recettore nucleare possiede la stessa porzione proteica che lega il GH presente sia nel GHR che nel GHBP [Waters MJ, 1990]. La presenza di GHR nel nucleo conferma l'ipotesi che il GH internalizzato nella cellula possa modulare la trascrizione di specifici geni. È altamente probabile un effetto diretto del GH nell'espressione genica. Il GHR condivide due proprietà dei proto-oncogeni:

- 1) la lunghezza della regione 5' non tradotta del cDNA del recettore è significativamente più lunga della media

2) Il GH possiede due siti di inizio della trascrizione a monte del sito di inizio della traduzione.

Entrambe queste caratteristiche sono in comune nell'mRNA che codifica per proto-oncogeni. Numerose ricerche sulle funzioni biologiche del GH, documentano l'induzione oncogena della sua over-espressione e il rapporto dose dipendente tra la entità dell'espressione di GH/IGF1/GHR e caratteristiche proliferative e aggressive dei cloni neoplastici, [Wu ZS, 2011]. Le concentrazioni di GH, GHR, GHRH e di GHRHR sono nettamente superiori nei tessuti tumorali del seno rispetto alla loro espressione recettoriale fisiologica e peritumorale, con un indice proliferativo dose-dipendente (Gebre-Medhin et al. 2001; Chatzistamou et al. 2004, Lincoln DT, 1998).

***La letteratura ha confermato le proprietà mitogene del GH e i relativi meccanismi d'azione biochimici e molecolari in tutti i tumori. Relativamente ai carcinomi del seno citiamo alcune tra le numerose conferme :-***

L'espressione GHR è associata alla trasformazione maligna della ghiandola mammaria in rapporto dose dipendente [Lincoln DT, 1998];

- GH umano ricombinante aumenta la proliferazione nei tumori del seno [Conte PF, 1990];
- incremento di incidenza e aggressività di neoplasie maligne secondarie tra cui seno in pazienti del Childhood Cancer Survivor Study trattati con rhGH per massimizzare la crescita [Rutter MM, 2007- Neglia JP, 2001- Ergun-Longmire B, 2006- Sklar CA, 2002];
- IGF-1, il mitogeno che funge da intermediario nell'azione del GH, è sovra espresso nel carcinoma della mammella e il legame di IGF-1 è più elevato nel tessuto tumorale mammario rispetto al tessuto normale adiacente [Arteaga CL, 1989- Yee D, 1989];
- nel carcinoma mammario umano è stata identificata l'espressione della proteina e dell'mRNA di GHR [Mertani HC, 1998- Decouvelaere C, 1995];
- linee cellulari di carcinoma mammario producono e secernono IGF-1 [Huff KK, 1986];
- è documentato che il GH umano ricombinante aumenta la proliferazione nei tumori del seno [Conte PF, 1990];
- l'aumento dei livelli di HGHR mRNA in campioni di carcinoma mammario umano rispetto al tessuto normale adiacente [Gebre-Medhin M, 2001];
- la RT-PCR e l'analisi Western hanno dimostrato l'espressione di GHRH e del suo recettore nel tessuto del cancro al seno, e antagonisti di GHRH inibiscono la crescita dei tumori [Schally AV, 2006];
- le proteine che regolano la secrezione di hGH da parte dell'ipofisi sono state implicate nella neoplasia mammaria [Kahan Z, 2004-Chatzistamou I, 1999];
- l'induzione all'espressione forzata di Pit-1 aumenta l'espressione di GH mRNA e della proliferazione nelle cellule di carcinoma mammario umano [Gil-Puig C, 2005];
- il Gh favorisce l'immortalizzazione di linee cellule epiteliali mammarie attraverso l'incremento dei livelli di mRNA e di proteine della subunità catalitica della telomerasi, hTERT [Emerald BS, 2007- Dimri G, 2005- Stewart SA, 2006];
- il GH autocrino inibisce i meccanismi di ancoraggio e adesività nelle cellule di carcinoma mammario e di crescita tumorale in vitro [Kaulsay KK, 1999], [Mukhina S, 2004];
- l'espressione di hGH autocrino soddisfa quindi i criteri per essere considerata come un oncogene per cellule mammarie umane [Lincoln DT, 1998];

- l'espressione di GH in cellule MCF-10A sconvolge la normale architettura acinare mammaria inducendo un riempimento del lume per sovvertimento dell'architettura e dell'ordine proliferativo [Zhu T,2001];
- GH aumenta la metastatizzazione di carcinomi mammari mediante l'interruzione del contatto cellula – cellula e aumento della migrazione e invasione cellulare [Mukhina S,2004];
- IGF-1( GH-correlato), è sovra espresso nel carcinoma della mammella [Yee D,1989];
- GH è più elevato nel tessuto tumorale mammario rispetto al tessuto normale adiacente [Artega CL,1989];
- recenti studi hanno dimostrato che l'espressione GH può aumentare l'attività della telomerasi ed estendere la capacità replicativa di una linea cellulare epiteliale mammaria primaria [Emerald BS,2007];

Sono stati approfonditi e confermati i noti meccanismi molecolari del ruolo mitogeno del GH (Milewicz T. 2011; Chiesa 2011) e della Prolattina (Aksamitiene E. 2011) i cui recettori di membrana sono coespressi e interattivi (Chen M. 2011; Breves JP. 2011; Xu J. 2011) così come è stato confermato che i recettori della Somatostatina e Dopamina interagiscono funzionalmente in senso antiproliferativo (Diakatou 2011; Savenau 2011; Ferone 2010; Gruszka 2001). L'espressione del gene IGF-1 è regolata diversamente dal GH in differenti tessuti [Lowe W,1987]. La dipendenza dal GH di IGF-1 è stata ampiamente confermata negli esseri umani. In pazienti con completa deficienza di GH, i livelli di IGF-1 sono sempre diminuiti, con i livelli più bassi trovati nei pazienti con il nanismo di Laron in cui mancano i GHR [Daughaday WH,1987]. La somministrazione di GH induce un aumento nell'IGF-1 nei pazienti responsivi al GH. Queste due molecole difficilmente non interagiscono; solo raramente in pochi tessuti la sintesi di IGF-1 è indipendente dal GH [Hynes MA,1987], malgrado il fatto che questi tessuti possiedono il GHR, come evidenziato da una potente mitogenesi indipendente da IGF-1 in risposta al GH [Rabonovitch A,1983].

. L'asse GH / IGF-1 è il principale mediatore della crescita somatica, e durante la pubertà svolge un ruolo essenziale nello sviluppo della ghiandola mammaria regolandone proliferazione cellulare, differenziazione e apoptosi [Kleinberg DL.1997]. Parte degli effetti mitogeni del GH nelle cellule somatiche oltre che dal IGF-1 epatico è mediata dall'induzione dell'espressione di vari fattori di crescita tra cui EGF [Vacas E,2016], e di VEGF-A [Brunet-Dunand SE,2009],GH dipendenti. Il legame tra GH e GHR attiva anche la trasduzione di segnale di diversi pathway tra cui JAK-2/STAT, MAPK, PIK3. È pertanto un'evidenza scientifica nella genesi tumorale il ruolo determinante dell'asse GH / IGF-1 [Laban C,2003], e la sua stretta interazione recettoriale, funzionale, con la Prolattina, Fattori di crescita e molecole mitogene dell'apparato digerente, come VIP, CCK, G.

Sta emergendo con evidenza anche l'interazione Estrogeno – IGF1, e pertanto la funzione centrale di IGF come modulatore proliferativo comune a GH, PRL, Estrogeno. L'asse estrogeno-IGF1 è coinvolto nell'iperplasia mammaria, nel carcinoma della mammella (Kleinberg 2011), e interagisce in funzione blastica con altri sistemi endocrini come GH – PRL – IGF1 (Zhou 2011; Mendoza RA et al 2010; Hewitt 2010; Leung 2004; Fürstenberger G. 2003; Juul 2001; Lissoni 1987; Mauri 1985). Il concorso mitogeno di questi sistemi endocrini conferma la base razionale e scientifica dell'inibizione contemporanea e sinergica nelle neoplasie mammarie di GH mediante la Somatostatina ,della PRL con agonisti dei D2R,dell' Estrogeno mediante inibitori delle aromatasi e analoghi di LH-FSH, e, conseguentemente, di IGF-1 [Di Bella G, 2013- Di Bella G, 2008- Di Bella G, 2010].Ciò indipendentemente dall'espressione dell'ER (Buchholz. S 2012) Si può ormai estendere nei tumori

del seno, il concetto di Asse proliferativo GH/GF-1/PRL ad Asse quaternario GH/GF/PRL/ER. [Gallego MI,2001]. Somatostatina e analoghi, non riducono solo il tasso ematico di GH, ma anche l'espressione e la trascrizione di fattori di crescita altamente mitogeni, come IGF1- [Cascinu S, 2001, Pollak M 1997, Schally AV, 2001], EGF [Held-Feindt J, 1999], FGF [Mentlein R, 2001], VEGF, ma estendono la loro regolazione negativa ai rispettivi recettori con evidenti riflessi antiproliferativi, e antiangiogenici [Szepesházi K,1999, Mishima M, 1999]. L'effetto soppressivo della SST e analoghi, sui livelli sierici di IGF1, è sia diretto, attraverso l'inibizione del gene di IGF, che indiretto, mediante la soppressione del GH e pertanto della sua induzione epatica di IGF1 –L'espansione tumorale avviene solo quando il tumore realizza l'angiogenesi. La letteratura ha documentato che tutti i passaggi dell'angiogenesi e i fattori di crescita che ad essa sinergicamente concorrono, sono negativamente regolati dalla somatostatina e dai suoi analoghi[Albini A.1999, Barrie R, 1993, Cascinu S,2001, Florio T, 2003, Jia WD,2003, Turner HE,2000, Vidal S,2000, Watson JC,2001, Wiedermann CJ,1993. Tutti gli altri componenti del MDB, anche se in misura minore rispetto alla somatostatina regolano negativamente l'angiogenesi. Se l'espansione neoplastica ha nell'angiogenesi un passaggio obbligato, e se l'angiogenesi è inibita dalla somatostatina, è ulteriormente chiarita e documentata la sua indicazione in tutti i tumori, in presenza o meno, di SSTR.( FIGURA SUGLI INIBITORI DELL' ANGIOGENESI )

Un ulteriore contributo viene fornito dalla somministrazione giornaliera di basse dosi [50-100 mg/die per os] di Ciclofosfamide (Endoxan). Questa posologia, oltre che ridurre drasticamente i noti effetti antiblastici/mielosoppressori, induce un marcato viraggio dei suoi meccanismi d'azione:

- innesco della cascata apoptotica mitocondrio dipendente;
- azione antiangiogenetica mediante l'abbattimento del VEGF.

L'angiogenesi neoplastica, è realizzata dal concorso di induttori-promotori, come *NOS $\epsilon$* , *IL8*, *C. M*, *PG2*, *VIP*, e fattori di crescita come VEGF, TGF, IGF1, bFGF, HGF, PDGF .

L'inibizione dell'angiogenesi indotta dalla SST è sinergicamente potenziata da MLT [Lissoni P,2001, Di Bella L, 1979, Di Bella L,2006], Retinoidi [McMillan K,1999, Kini AR,2001, Majewski S,1994], Vitamina D3 [Kisker O, 2003, Mantell DJ,2000], Vitamina E [Shklar G,1996, Tang FY,2001, Neuzil J,2002], Vitamina C [Ashino H,2003], inibitori prolattinici [Turner HE,2000], componenti della matrice extracellulare [Liu Y,2005, Ozerdem U,2004]. Ugualmente l'effetto citostatico, antiproliferativo, antimetastatico della Somatostatina è efficacemente sinergizzato dagli altri componenti del MDB: Retinoidi [Hassan HT,1990, Voigt A,2000, Piedrafita FJ,Onogi N,1998], MLT [Bartsch C,1999, Kvetnoř IM,1986, Mediavilla MD,1999, Maestroni GJ,1996, Cos S,2000], Vit D3 [Jensen SS,2001, Barroga EF,2000, Campbell MJ,2000], Cabergolina e Bromocriptina ( inibitori prolattinici) [Gruszka A, 2001, Ben-Jonathan N 2002, Lissoni P,2001, Klijn JG, 1996, Manni A,1989], componenti della matrice extracellulare [Pumphrey CY,2002, Batra RK,1997], Vit E [Turley JM, 1995, Israel K,2000, Malafa MP,2002, Neuzil J,2002, Shklar G,1996] e Vit C [Head KA.1998, Murata A, 1982, Cameron E,1979. La Somatostatina esercita l'attività antiblastica sia direttamente, attraverso l'inibizione dell'espressione del gene IGF1, che indirettamente, mediante la soppressione del GH, da cui dipende l'incremento di IGF1 [Pollak M. 1997, Schally AV,2001, Schally AV,2003]. Ampiamente documentata è anche l'attività inibitoria della SST su un altro potente fattore di crescita mitogeno, EGF, attraverso molteplici meccanismi:

- inibizione dose dipendente della fosforilazione tirosinica indotta dall'attivazione di EGFR da parte di EGF [Mishima M,1999];
- riduzione di EGFR nelle cellule tumorali [Szepesházi K,1999];
- riduzione dell'espressione di EGF [Held-Feindt J 1999];
- abbattimento della concentrazione plasmatica di EGF [Cascinu S,2001].

Mitogeni prodotti dall'apparato gastrointestinale, come VIP, CCK, G, sono potentemente inibiti dalla somatostatina e/o octreotide [Kath R,2000]. È stato dimostrato che i tumori al seno esprimono SSR1, SSR2, SSR3, meno frequentemente SSR5 [Albérini JL, 2000, Schaer JC,1997], che solo nel 50% dei casi sono scintigraficamente visibili, mentre in oltre la metà delle scintigrafie negative, indagini istochimiche, e molecolari hanno rilevato la presenza di SSR. Pertanto la presenza di SSR [Albérini JL, 2000, Barnett P.2003, Pinzani P,2001, van Eijck CH,1998], in una rilevante percentuale dei carcinomi del seno, costituisce un'ulteriore indicazione razionale all'impiego della SS, peraltro già ampiamente giustificata dalla citata regolazione negativa della SS sul GH, gli oncogeni GH-correlati, e l'angiogenesi. Queste azioni della somatostatina e/o octreotide vedono potenziata la loro efficacia antitumorale attraverso un meccanismo sinergico fattoriale con gli altri componenti del MDB tra cui rilevante la melatonina idrosolubilizzata MDB. Numerose ricerche sull'uomo hanno infatti evidenziato i meccanismi d'azione della MLT. Essendo la molecola associata al Signaling Pathways dello sviluppo sia fisiologico epiteliale che neoplastico, tale indolo possiede sia la proprietà di neutralizzare selettivamente i segnali proliferativi degli estrogeni che di modularne negativamente la loro biosintesi locale. L'impiego della MLT si estende a tutti gli istotipi di carcinoma mammario, data l'elevata distribuzione di membrana delle sottoclassi recettoriali MT1-MT2. Numerosi studi epidemiologici hanno altresì dimostrato che tra le molteplici cause predisponenti al carcinoma mammario vi è la diminuzione del tasso ematico di melatonina, e lo stravolgimento dei livelli fisiologici circadiani.

I meccanismi molecolari di questo indolo sono molteplici e riassumibili nei seguenti punti:

abbattimento dell'espressione genica dei recettori per gli estrogeni, nonché del signaling indotto dagli stessi,

interferenza sul metabolismo degli estrogeni,

modulazione epigenetica,

blocco dei processi di motilità cellulare, invasione e metastasi attraverso il blocco dell'espressione delle Metalloproteinasi.

Nel dettaglio:

- la sottoregolazione dell'asse riproduttivo ipotalamico-ipofisario, con conseguente riduzione dei livelli circolanti di estrogeni gonadici, rappresenta uno dei principali meccanismi neuroendocrini diretti della MLT;
- la MLT è un modulatore selettivo del recettore per gli estrogeni: agisce direttamente sulle cellule tumorali mammarie interferendo con l'attivazione recettoriale (ESR).

Infine, la Melatonina regola l'attività delle aromatasi, agendo da vero e proprio modulatore selettivo enzimatico, con azione sinergica con gli inibitori della aromatasi di seconda generazione e retinoidi. L'intuizione del Prof Luigi Di Bella che aveva definito la MLT condizione necessaria, anche se non sufficiente, nella terapia del cancro trovano oggi ampie e crescenti conferme in letteratura (Hill 2011; Korkmaz 2009, Benitez-King 2009; Cabrera 2010; Cucina 2009; Dong 2010; Girgert 2010; Mao 2010; Mediavilla 2010; Rogelsperger 2009-2010).

La letteratura ha anche confermato i meccanismi d'azione antineoplastici differenzianti e antiproliferativi, antiangiogenetici e antimetastatici di ogni singolo componente del MDB, potenziati dall'interazione sinergica fattoriale.

(Seitz et al. 2013; Sanchez-Barcelo et al. 2012; Tang & Gudas 2012; Mehta et al. 2012; Frati et al. 2011; Fulan et al. 2011). (Proietti et al. 2010; Margheri et al. 2012; Cescon et al. 2012; Ostendorf et al. 2012; Suhail et al. 2012; Zhang et al. 2012; Proietti et al. 2011; He et al. 2009; Watt et al. 2009; Lee et al. 2008).

Nei tumori del seno sono stati anche evidenziati meccanismi di segnalazione autocrina e/o paracrina, rilevando la produzione locale del GH e del IGFI sui tessuti di carcinoma mammario, peritumorale e fibroblasti (Kaulsay et al. 2001; Siriwardana et al. 2010). Il GH autocrino attraverso la regolazione differenziale dell'espressione genica regola meccanismi molecolari e biochimici vitali come la crescita cellulare e la sopravvivenza, la migrazione e l'invasione, la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), il potenziale replicativo e la trasformazione oncogenica. Sono noti i geni che il GH autocrino regola positivamente o negativamente per indurre l'oncogenesi. [Perry JK, 2008].

### Conclusioni

la terapia biologica MDB si propone di contrastare la progressione del fenotipo neoplastico attraverso:

- a) l'inibizione della proliferazione neoplastica mediante i processi cellulari di apoptosi/necrosi e privazione dei ormoni e fattori di crescita cellulari;
- b) il contrasto della spiccata tendenza mutagena mediante l'attivazione diretta dei sistemi di riparazione del DNA, ed attraverso la riprogrammazione cellulare epigenetica.
- c) il blocco della progressione neoplastica, mediante l'abbattimento della formazione dei binari ematici (Neoangiogenesi-Linfoangiogenesi) e dei fenomeni di motilità cellulare (migrazione), essenziali per la disseminazione neoplastica
- d) la difesa dall'aggressione neoplastica attraverso il potenziamento delle difese naturali (immunità innata ed acquisita e il miglioramento delle funzioni vitali).

dal

Nei carcinomi mammari monitorati a 5 anni, la multiterapia biologica MDB ha significativamente migliorato qualità di vita, risposta obiettiva e sopravvivenza rispetto agli stessi stadi delle neoplasie del seno trattate con i protocolli oncologici convenzionali. La regolazione negativa dei massimi sistemi mitogeni interattivi: GH-GF-Prolattina-Estrogeno mediante somatostatina e analoghi, agonisti D2R, inibitori delle aromatasi, analoghi di LH-FSH, unitamente all'azione differenziante citostatica, omeostatica, di Retinoidi, Vitamine E, D3, C, Folati, Ca, MLT, Proteoglicani con interazione fattoriale, senza sensibile tossicità, ha consentito questo risultato. Segnaliamo questi risultati terapeutici per migliorare la prognosi nelle neoplasie in generale e in particolare nei carcinoma della mammella. Ancora oggi le neoplasie del seno rappresentano in tutto il mondo, la prima causa assoluta di morte delle donne a dimostrazione delle carenze delle attuali misure di prevenzione e terapia del cancro e della necessità di superare questi gravi limiti terapeutici oncologici con la valorizzazione di evidenze scientifiche ancora sottovalutate. Riportiamo in estrema sintesi, il rationale e i concetti terapeutici formulati dal Prof Luigi Di Bella alla base di questo risultato: :

***“E' 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, associando microdosi (metronomiche, apoptotiche, non citolitiche), di cicofosfamide e/o idrossiurea, probabilmente più attive nel corso dell'attuazione del protocollo proposto". L'essenziale sta nell'attivare tutti gli inibitori dei sistemi endocrini mitogeni e 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. "*