



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE  
AGRO-ALIMENTARI

## Relazione Finale

Bando Ricerca Premio FIAMO 2022 (Dott.ssa Francesca Truzzi)

### “Studio delle proprietà preventive o curative in vitro di trattamenti omeopatici sugli effetti infiammatori mediati da alimenti”

#### Scopo del lavoro

L'**obiettivo originale** di questo progetto è stato quello di studiare, mediante l'utilizzo di modelli cellulari di intestino, la capacità di **interleuchina omeopatizzata (IL6)** e di **prodotti omeopatici classici** (Licopodium, Argentum Nitricum, Podofillum) **di prevenire o di curare gli effetti infiammatori mediati da alimenti**. Tuttavia dato che il finanziamento è stato ridotto di oltre il 50% rispetto a quanto previsto al momento di sottoporre la proposta, si è dovuto procedere ad un taglio delle attività: in particolare **lo studio è stato focalizzato sui soli effetti preventivi** dei trattamenti omeopatici selezionati.

In particolare, le attività sono state focalizzate sui seguenti due obiettivi specifici:

- 1) Analisi degli effetti preventivi dei prodotti omeopatici selezionati sull'infiammazione mediata da alimenti in sistemi cellulari. L'epitelio della mucosa intestinale costituisce una delle principali barriere in termini di estensione tra l'ambiente esterno (il lume intestinale) e gli organi interni. In quanto tale, esso costituisce un doppio bersaglio di eventuali insulti tossici provenienti da farmaci o sostanze nella dieta. Il glutine rappresenta sicuramente una componente alimentare caratterizzata da alto potere infiammatorio. Le proteine del frumento sono quindi state estratte dalla farina e digerite *in vitro* utilizzando proteasi. Per studiare gli effetti protettivi e/o curativi dei trattamenti omeopatici selezionati sull'infiammazione intestinale, cellule del tessuto intestinale sono quindi state trattate con estratti proteici da frumento. Come controllo positivo dello stimolo infiammatorio, è stato utilizzato il lipopolisaccaride (LPS). Per gli studi di questa prima parte, sono stati utilizzati due tipi cellulari: le cellule dell'epitelio intestinale Caco-2 e una linea cellulare di monociti umani U937. Le Caco-2 sono cellule derivanti dal colon, in grado di differenziare in coltura in un monostrato di cellule polarizzate, accoppiate da giunzioni, che esprimono molte caratteristiche morfo-funzionali dell'epitelio assorbente dell'intestino tenue. Le U937 sono invece una linea cellulare di monociti umana in grado di differenziare in macrofagi se specificatamente attivati.

Per studiare gli effetti dei 4 trattamenti omeopatici, ovvero Argentum nitricum (AN), Interleuchina 6 (IL), Licopodium (LC) e Podofillum (PP), è stato messo a punto il seguente modello preventivo: le cellule, 24 ore dopo la semina, sono state trattate con i prodotti omeopatici selezionati a 4 potenze (5, 15, 30, 200 CH). Il giorno successivo è stato cambiato il terreno e sono state aggiunte proteine del frumento precedentemente estratte e digerite. Per verificare la capacità dei prodotti omeopatici di prevenire gli effetti tossici delle proteine estratte o dell'LPS, sulle cellule **Caco-2** e **U937** sono stati eseguiti test di tossicità cellulare mediante MTT assay (composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), un saggio metabolico che permette di valutare alterazioni cellulari dell'attività mitocondriale. Ogni prova è stata ripetuta almeno tre volte, con almeno 6 repliche per ogni prova, non includendo il controllo negativo, non trattato.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE  
AGRO-ALIMENTARI

- 2) Analisi degli effetti preventivi dei prodotti omeopatici selezionati sull'infiammazione mediata da alimenti in sistemi "tridimensionali in vitro di intestino equivalente". Per studiare se i prodotti omeopatici possano avere un ruolo nel ridurre l'infiammazione intestinale mediata dalle proteine del frumento, è stato utilizzato un modello cellulare tridimensionale definito "intestino equivalente", sviluppato presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari della Università di Bologna (Truzzi et al., 2021). Il modello è stato realizzato generando un "derma equivalente" ottenuto dall'unione di fibroblasti (utilizzando la linea cellulare L929), monociti (U937) e collagene di tipo I ottenuto dalla coda di ratto. Sul derma equivalente, sono state seminate le cellule epiteliali (Caco-2) e dopo 5 giorni di incubazione, i modelli tridimensionali sono stati inclusi in paraffina per studi istologici (ematossilina ed eosina). Per il modello preventivo, gli intestini ricostruiti una volta formati, sono stati trattati con i prodotti omeopatici selezionati. 24 ore dopo il trattamento sono state aggiunte le proteine estratte di frumento o LPS e 24 ore dopo i campioni sono stati fissati ed inclusi in paraffina per gli studi successivi.

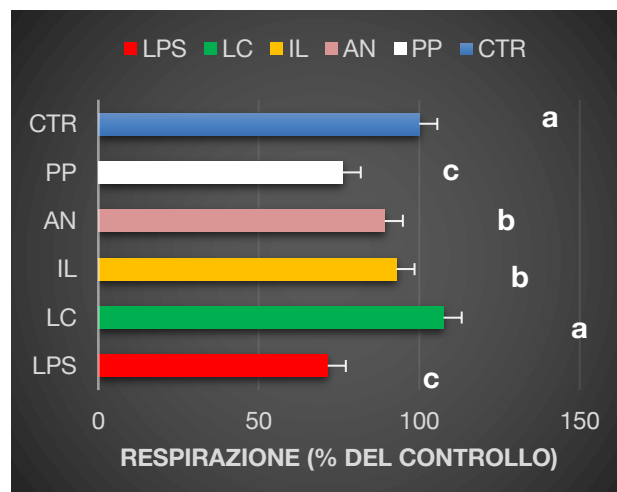
Analisi statistica: I test cellulari sono stati eseguiti ripetendo tre volte le prove (con un numero di repliche pari ad almeno 6 ripetizioni) e i dati sono stati espressi nei grafici come valori medi dei tre diversi esperimenti. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando GraphPad Prism versione 9.3.1 (2021) e la significatività è stata determinata mediante analisi della varianza (ANOVA) a due vie al livello minimo di confidenza del 95% ( $P < 0.05$ ).

## Risultati

- 1) Analisi degli effetti preventivi dei prodotti omeopatici selezionati sull'infiammazione mediata da alimenti in sistemi cellulari

### Linea cellulare Caco-2

Per facilitare l'interpretazione dei risultati sono state separate le prove sperimentali relative ai trattamenti con il composto pro-infiammatorio LPS e il glutine, estratto da frumento tenero.



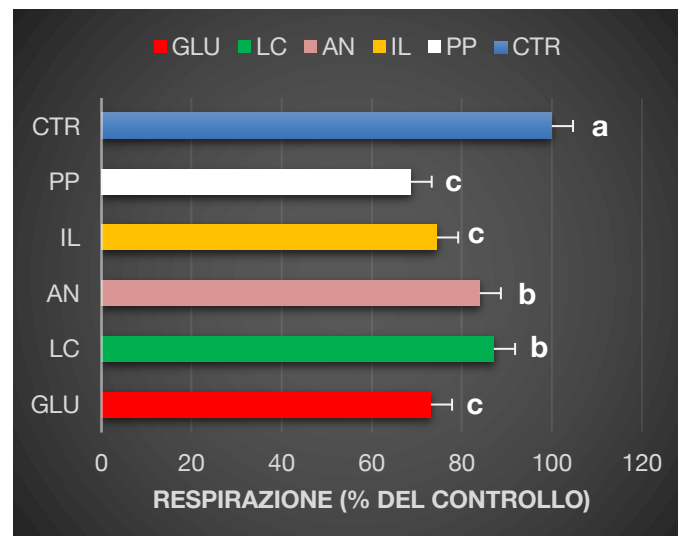
**Figura 1:** Effetto di diversi trattamenti omeopatici preventivi (AN = Argentum nitricum, IL = Interleuchina 6; LC = Licopodium; PP = Podofillum) applicati alle potenze 5, 15, 30, 200 CH su linea cellulare Caco-2 preventivamente trattata con l'agente pro-infiammatorio LPS. I dati sono espressi come valori percentuali medi



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE  
AGRO-ALIMENTARI

di respirazione rispetto al controllo (CTR) non trattato. Lettere diverse indicano valori statisticamente differenti per  $P < 0.05$ .

Per quanto riguarda lo stimolo indotto da LPS, la elaborazione statistica (ANOVA a due fattori) ha evidenziato un'elevata significatività ( $P < 0.001$ ) per il fattore TRATTAMENTO (ovvero i diversi prodotti omeopatici), ma non ha evidenziato alcuna significatività per il fattore POTENZA. In altri termini le diverse potenze testate (5, 15, 30, 200 CH) non hanno avuto effetti diretti sulla risposta cellulare (test di respirazione MIT). Tale evidenza è da ricondurre al fatto che per i diversi trattamenti la potenza ha esercitato effetti diversi, spesso contrastanti tra loro. La risposta alle diverse potenze del trattamento con Licopodium (LC) ha evidenziato un andamento di tipo esponenziale negativo ( $R^2 = 0.867$ ), con risposta massima per la potenza 5 CH e minima per la potenza 200 CH (dati non mostrati). Viceversa per Argentum nitricum (AN), Interleuchina 6 (IL) e Podofillum (PP) la risposta alle diverse potenze è risultata di tipo sinusoidale ( $R^2$  compreso tra 0.823 e 0.945) (dati non mostrati). Per AN e PP le risposte sinusoidali sono risultate in fase, con massimi di attività alle potenze di 5 e 30 CH, mentre la risposta di IL è risultata in fase opposta rispetto a AN e PP, con massimi di attività alle potenze 15 e 200 CH (dati non mostrati). Anche la interazione TRATTAMENTO x POTENZA è risultata non significativa, indicando che la risposta ai trattamenti non è stata influenzata dalle potenze testate. Dal momento che l'interazione è risultata non statisticamente significativa, al pari dell'altro fattore POTENZA, risulta possibile presentare i dati sotto forma del fattore TRATTAMENTO. Come riportato in **Figura 1**, l'agente pro-infiammatorio LPS, alla dose scelta per le prove sperimentali ha indotto una riduzione dell'attività respirativa cellulare, rispetto al controllo non trattato, di circa il 25%. E' inoltre risultato evidente come i trattamenti preventivi con LC siano stati in grado di riportare la respirazione cellulare allo stesso livello del controllo non trattato. All'opposta, i trattamenti preventivi con PP non hanno prodotto effetti significativi, in quanto i livelli respiratori sono risultati del tutto analoghi a quanto osservato dopo il trattamento con LPS. Infine AN e IL hanno evidenziato un comportamento intermedio: pur non riuscendo a riportare i livelli di respirazione a quelli osservati per il controllo, i valori sono risultati comunque statisticamente superiori rispetto alle cellule Caco-2 trattate con il solo LPS.



**Figura 2:** Effetto di diversi trattamenti omeopatici preventivi (AN = Argentum nitricum, IL = Interleuchina 6; LC = Licopodium; PP = Podofillum) applicati alle potenze 5, 15, 30, 200 CH su linea cellulare Caco-2 preventivamente trattata con glutine. I dati sono espressi come valori percentuali medi di respirazione rispetto al controllo (CTR) non trattato. Lettere diverse indicano valori statisticamente differenti per  $P < 0.05$ .

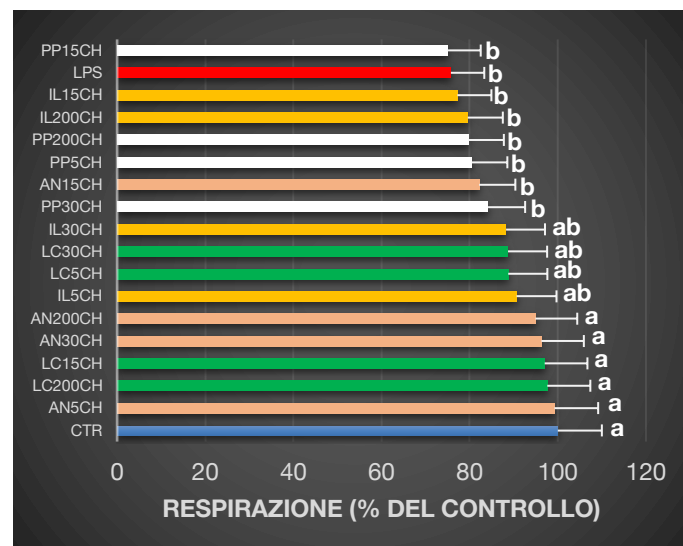


DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE  
AGRO-ALIMENTARI

Per quanto riguarda lo stimolo indotto dal glutine, i risultati hanno manifestato notevoli analogie con quanto osservato in seguito ai trattamenti con LPS. Infatti la elaborazione statistica (ANOVA a due fattori) ha evidenziato un'elevata significatività ( $P < 0.001$ ) per il fattore TRATTAMENTO (ovvero i diversi prodotti omeopatici), ma non ha evidenziato alcuna significatività per il fattore POTENZA. In altri termini le diverse potenze testate (5, 15, 30, 200 CH) non hanno avuto effetti diretti sulla risposta cellulare (test di respirazione MTT). Similmente a quanto riportato per i trattamenti con LPS, tale evidenza è da ricondurre al fatto che per i diversi trattamenti la potenza ha esercitato effetti diversi, spesso contrastanti tra loro. La risposta alle diverse potenze dei trattamenti con IL, LC e PP Licopodium (LC) ha evidenziato un andamento di tipo esponenziale positivo ( $R^2$  compreso tra 0.667 e 0.904), con risposta massima per la potenza 200 CH e minima per la potenza 5CH (dati non mostrati). Viceversa per AN la risposta alle diverse potenze è risultata di tipo esponenziale negativo ( $R^2 = 0.723$ ), con risposta massima alla potenza 5 CH e risposta minima alla potenza 200 CH (dati non mostrati). Anche la interazione TRATTAMENTO x POTENZA è risultata non significativa, indicando che la risposta ai trattamenti non è stata influenzata dalle potenze testate. Dal momento che l'interazione non è risultata statisticamente significativa, al pari dell'altro fattore POTENZA, risulta possibile presentare i dati sotto forma del fattore TRATTAMENTO. Come riportato in **Figura 2**, il glutine, alla dose scelta per le prove sperimentali, similmente all'agente pro-infiammatorio LPS, ha indotto una riduzione dell'attività respiratoria cellulare di circa il 25%, rispetto al controllo non trattato. Nessuno dei trattamenti omeopatici testati è stato in grado di ripristinare l'attività respiratoria ai livelli osservati per il controllo. Tuttavia, i trattamenti preventivi con LC e AN hanno comunque consentito un miglioramento della attività respiratoria: per entrambi i valori sono risultati comunque statisticamente superiori rispetto alle cellule Caco-2, trattate con il solo glutine. Infine i trattamenti preventivi con IL e PP non hanno avuto effetti rilevanti, dal momento che l'attività respiratoria delle cellule trattate con questi rimedi non è risultata differire da quella delle cellule trattate con il glutine.

Linea cellulare U937

Similmente a quanto riportato per la linea cellulare Caco-2, anche nel caso della linea cellulare U937 per facilitare l'interpretazione dei risultati sono state separate le prove sperimentali relative ai trattamenti con l'agente pro-infiammatorio LPS e il glutine, estratto da frumento tenero.



**Figura 3:** Effetto di diversi trattamenti omeopatici preventivi (AN = Argentum nitricum, IL = Interleuchina 6; LC = Licopodium; PP = Podofillum) applicati alle potenze 5, 15, 30, 200 CH su linea cellulare U937 preventivamente trattata con l'agente pro-infiammatorio LPS. I dati sono espressi come valori percentuali medi



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE  
AGRO-ALIMENTARI

di respirazione rispetto al controllo (CTR) non trattato. Lettere diverse indicano valori statisticamente differenti per  $P < 0.05$ .

Per quanto riguarda lo stimolo indotto da LPS, la elaborazione statistica (ANOVA a due fattori) ha evidenziato un'elevata significatività ( $P < 0.001$ ) per il fattore TRATTAMENTO (ovvero i diversi prodotti omeopatici), ma anche ha evidenziato significatività per il fattore POTENZA ( $p < 0.05$ ). Anche la interazione TRATTAMENTO x POTENZA è risultata altamente significativa ( $P < 0.01$ ), indicando che la risposta ai trattamenti non è indipendente alla potenza testata. Dal momento che l'interazione è risultata statisticamente significativa, non sarebbe corretto mostrare i dati relativi ai singoli fattori: si riportano pertanto i valori medi osservati per ciascun singolo trattamento, ovvero di ogni singola combinazione di trattamento omeopatico e della sua relativa potenza (**Figura 3**). L'agente pro-infiammatorio LPS, alla dose scelta per le prove sperimentali ha indotto una riduzione dell'attività respirativa cellulare, rispetto al controllo non trattato, di circa il 25%. Gli unici trattamenti che hanno consentito di riportare la respirazione ai livelli osservati per il controllo non trattato sono stati quelli a base di AG alle potenze di 5, 30 e 200 CH, e quelli a base di LC alle potenze di 15 e 200 CH. Tutti gli altri trattamenti non hanno evidenziato livelli di respirazione statisticamente differenti rispetto ai campioni trattati con l'agente pro-infiammatorio LPS.

Per quanto riguarda lo stimolo indotto dal glutine, i risultati hanno manifestato un andamento diverso rispetto a quanto osservato per i trattamenti con LPS. L'elaborazione statistica (ANOVA a due fattori) ha evidenziato contemporaneamente un'elevata significatività ( $P < 0.001$ ) per il fattore TRATTAMENTO (ovvero i diversi prodotti omeopatici) e per il fattore POTENZA ( $P < 0.01$ ). Inoltre anche la interazione TRATTAMENTO x POTENZA è risultata altamente significativa ( $P < 0.05$ ), indicando che la risposta ai trattamenti è stata influenzata dalle potenze testate. Dal momento che l'interazione è risultata statisticamente significativa, i dati devono essere presentati riportando i valori medi osservati per ciascun singolo trattamento, ovvero di ogni singola combinazione di trattamento omeopatico e della sua relativa potenza (Figura 4). Il glutine, alla dose scelta per le prove sperimentali, similmente all'agente pro-infiammatorio LPS, ha indotto una riduzione dell'attività respiratoria cellulare di circa il 25%, rispetto al controllo non trattato. Gli unici trattamenti che hanno consentito di riportare la respirazione ai livelli osservati per il controllo non trattato sono stati quelli a base di IL alle potenze di 5, 15 e 200 CH, e quelli a base di PP alle potenze di 5 e 15 CH. Tutti gli altri trattamenti non hanno evidenziato livelli di respirazione statisticamente differenti rispetto ai campioni trattati con l'agente pro-infiammatorio LPS.

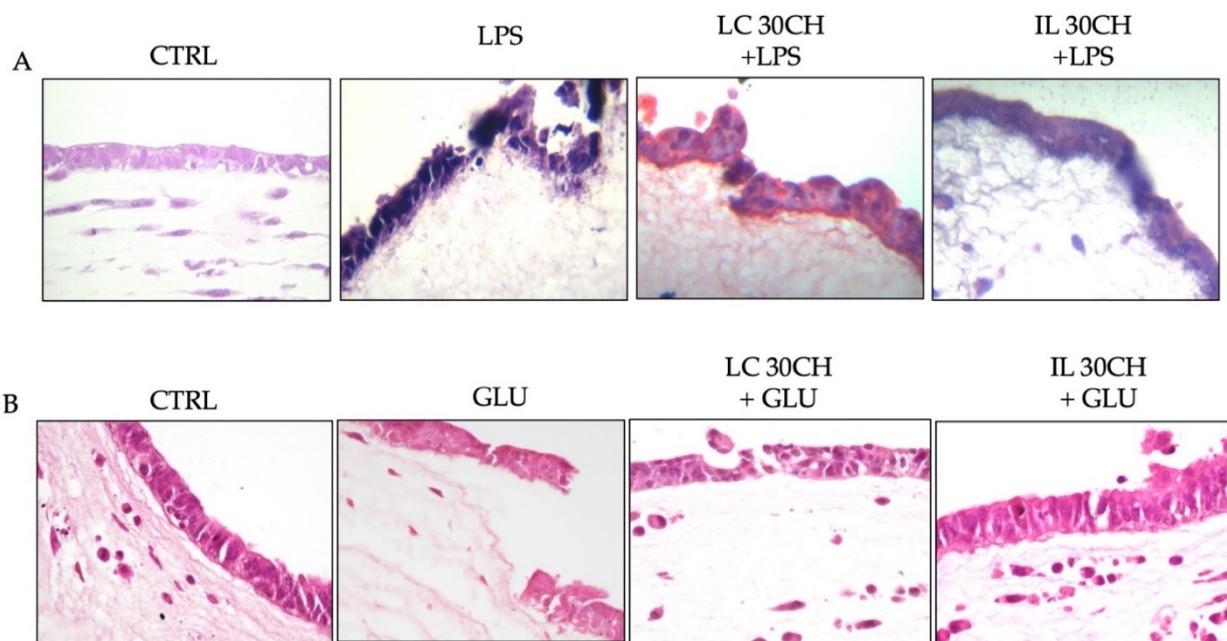




DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE  
AGRO-ALIMENTARI

**Figura 4:** Effetto di diversi trattamenti omeopatici preventivi (AN = Argentum nitricum, IL = Interleuchina 6; LC = Licopodium; PP = Podofillum) applicati alle potenze 5, 15, 30, 200 CH su linea cellulare U937 preventivamente trattata con glutine. I dati sono espressi come valori percentuali medi di respirazione rispetto al controllo (CTR) non trattato. Lettere diverse indicano valori statisticamente differenti per  $P < 0.05$ .

2) Analisi degli effetti preventivi dei prodotti omeopatici selezionati sull'infiammazione mediata da alimenti in sistemi "tridimensionali *in vitro* di intestino equivalente"



**Figura 5:** Immagini istologiche (colorazione con ematossilina eosina) di modelli di intestino equivalente non trattati (CTRL), trattati con l'agente pro-infiammatorio LPS o con Glutine (GLU), con Licopodium (LC, 30 CH) precedentemente all'applicazione di LPS e GLU o con Interleuchina 6 (IL, 30 CH) precedentemente all'applicazione di LPS e GLU

Vengono riportati nella **Figura 5**, i primi risultati ottenuti applicando due trattamenti omeopatici (LC e IL) alla potenza 30 CH sui modelli di intestino equivalente precedentemente stressati con l'agente pro-infiammatorio LPS o con il glutine. Nelle immagini A) CTRL e B) CTRL si possono osservare i tessuti epiteliali del modello intestinale nella loro integrità: in particolare risulta bene visibile il monostrato, continuo, degli enterociti, nella porzione apicale della sezione trasversale del tessuto ricostruito. Questo tessuto risulta particolarmente danneggiato dalla aggiunta degli agenti pro-infiammatori LPS e glutine: si osserva in modo particolare lo scollamento dello strato epiteliale degli enterociti dalla sottostante lamina propria (A) LPS; B) GLU). Inoltre lo strato degli enterociti è risultato in entrambi i casi non continuo e interrotto a causa del processo di infiammazione. Viceversa l'aggiunta preliminare di Licopodium o di Interleuchina 6 alla potenza di 30 CH ha consentito di inibire almeno in parte il danno infiammatorio causato dai due agenti pro-infiammatori: si osserva infatti che lo strato di enterociti risulta essere più compatto e meno frammentato rispetto ai trattamenti infiammatori (A) LC 30CH + LPS; B) IL 30 CH + LPS; A) LC 30CH + GLU; B) IL 30 CH + GLU).



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE  
AGRO-ALIMENTARI

## Conclusioni

Gli esperimenti sono stati svolti in un arco temporale di oltre otto mesi, tra marzo e novembre 2023. Per ogni condizione sperimentale le prove sono state ripetute 3 volte (in un ampio lasso temporale di quasi otto mesi) e per ciascun trattamento sono state predisposte in ogni prova almeno 6 repliche. Questo significa che ogni dato presentato rappresenta il valore medio di un set analitico composto da 18 valori (6 repliche x 3 prove sperimentali). Questo è un importante indice della robustezza dei dati presentati e del loro valore statistico.

Le analisi hanno evidenziato alcuni aspetti di particolare interesse:

- a) Nessuno dei trattamenti testati in via preventiva ha indotto effetti negativi o peggiorativi rispetto ai campioni trattati con i due agenti pro-infiammatori (LPS o glutine). Nel caso peggiore non sono stati osservati effetti statisticamente differenti rispetto ai campioni trattati con glutine o LPS;
- b) Nel modello cellulare con cellule intestinali Caco-2 sia in seguito a trattamento con LPS o con glutine il rimedio omeopatico Licopodium ha manifestato la maggiore azione nel contrastare gli effetti infiammatori: tale effetto è stato anche confermato dal modello intestinale tridimensionale. Anche se meno efficaci rispetto a Licopodium, un significativo recupero è stato osservato anche in seguito ai trattamenti con Argentum nitricum e Interleuchina. Anche nel caso della Interleuchina gli effetti sul modello cellulare monodimensionale sono stati confermati dal modello cellulare tridimensionale. Infine il rimedio Podofillum non ha evidenziato alcun effetto significativo.
- c) Il modello cellulare con cellule immunitarie U937 in seguito a trattamento con LPS ha confermato quanto osservato con il modello intestinale: infatti effetti significativi di recupero dalla infiammazione sono stati osservati con i trattamenti Licopodium alle potenze 15 e 200 CH, e con Argentum nitricum alle potenze di 5, 30 e 200 CH. Viceversa il modello cellulare con la linea cellulare U937 in seguito a trattamento con glutine è risultato solo parzialmente confermare i risultati ottenuti con gli altri modelli: infatti, oltre a significativi effetti dei trattamenti con Interleuchina 6 alle potenze di 5, 15 e 200 CH, sono stati osservati effetti significativi anche a carico di Podofillum alle potenze di 5 e 15 CH.
- d) Complessivamente si ritiene che il rimedio più promettente per ridurre lo stato infiammatorio intestinale sia Licopodium, seguito da Argentum nitricum e Interleuchina 6. Potrebbe essere interessante investigare potenziali effetti combinatori di questi rimedi, sia su modelli cellulari che in pazienti.