



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

Relazione Finale

Bando Ricerca Premio FIAMO 2021 (Dott.ssa Francesca Truzzi)

“Effetti dei trattamenti omeopatici sull’infiammazione cellulare umana *in vitro*”

Scopo del lavoro

Lo scopo di questo lavoro è stato di studiare gli effetti di alcuni trattamenti omeopatici selezionati in riferimento allo stress ossidativo mediante l'utilizzo di modelli standardizzati di tossicità cellulare e attraverso un modello tridimensionale di intestino equivalente. Poiché l'arsenico omeopatico è uno dei principali rimedi per l'infiammazione in seguito a stress ossidativo (Flora 2011), nel seguente lavoro sono stati studiati gli effetti di alcune diluizioni dell'arsenico, quali: 45 dH, 14 cH, 15 cH, 16 cH, 29 cH, 30 cH, 31 cH, 199 cH, 200 cH, 201 cH, e l'acqua o l'acqua 23 CH che sono state utilizzate come diluenti. Sono stati messi a punto tre diversi modelli cellulari basati su fibroblasti di topo L929, vale a dire approcci sani, curativi e preventivi. Il modello sano consiste nell'applicazione cellulare di stimoli (diverse potenze di arsenico) senza alcun trattamento con H₂O₂. Nel modello curativo, gli stimoli sono stati applicati dopo il trattamento cellulare con H₂O₂, mentre, nel modello preventivo, gli stimoli sono stati applicati prima del trattamento cellulare con H₂O₂.

Materiali e Metodi

Culture cellulari e preparazione dei trattamenti: Le cellule L929 (ATCC CCL-1, clone NCTC 929) sono state coltivate con il terreno Eagle modificato di Dulbecco (DMEM) arricchito con il 10% di siero fetale (FBS) e l'1% penicillina-streptomina (p/s). La linea cellulare epiteliale umana Caco-2 (ATCC HTB-37), ottenuta da adenocarcinoma coloretale, è stata coltivata con DMEM, integrato con 10%, FBS e 1% di p/s. La linea cellulare promonocitica U937, derivata da leucemia mieloide umana (ATCC CRL-1593.2), è stata coltivata in terreno RPMI-1640, integrato con il 10% di FBS e l'1% di p/s.. Le cellule sono state coltivate in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ e il terreno è stato cambiato ogni due giorni. Le colture secondarie subconfluenti di L929 e Caco-2 sono state tripsinizzate con tripsina 0,05%/EDTA 0,02% e seminate per gli esperimenti.

Preparazioni per il trattamento dell'arsenico: ai fibroblasti sono stati aggiunti i trattamenti omeopatici all'arsenico (As 45dH, 14, 15, 16, 29, 30, 31, 199, 200, 201 cH), acqua (W) o acqua 23 cH (W 23 cH) nel terreno base (DMEM) alla diluizione 1:20. Nel controllo (controllo non trattato), le cellule sono state trattate con DMEM da solo.

Trattamento dello stress ossidativo: nei fibroblasti in coltura, lo stress ossidativo cellulare è stato indotto trattando le cellule con 75µM H₂O₂ in PBS per 20 minuti, il solo PBS è stato utilizzato come controllo. Nel modello di **stress ossidativo preventivo**, i trattamenti con arsenico sono stati aggiunti alla cellula 24 ore dopo la semina alla concentrazione 1:20 in DMEM. 24 ore dopo il trattamento delle cellule, è stato aggiunta H₂O₂ e quindi il mezzo completo fresco è stato sostituito nelle cellule per 24 ore. Per il modello di **stress ossidativo curativo**, 24 ore dopo la semina delle cellule, H₂O₂ è stato aggiunta alle cellule. Successivamente sono stati aggiunti trattamenti di arsenico 1:20 alle cellule per 24 ore.

Saggio di proliferazione MTT: le cellule L929 sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti (10.000 cellule/pozzetto), 6 pozzetti sono stati seminati per ciascun trattamento. 24 ore dopo la semina, le cellule sono state trattate con i trattamenti stabiliti. Il test MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) è stato eseguito 24 ore dopo, seguendo la normativa standard ISO10993-5. Brevemente, le cellule proliferanti sono state rilevate mediante incubazione con soluzione MTT (1mg/ml in DMEM) a



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

37°C per 2 ore. Il colorante di formazano prodotto dopo la solubilizzazione dell'isopropanolo è stato valutato mediante uno spettrofotometro a scansione multipozzetto a 595 nm. I risultati sono espressi come O.D. (valore di assorbanza). I risultati sono calcolati come media \pm SD di tre diversi esperimenti.

Modelli tridimensionali di intestino ricostruito: gli intestini equivalenti sono stati costruiti utilizzando le cellule Caco-2, U937 e L929. Brevemente, una soluzione acellulare 0,5 mg/mL di collagene (1,35 mg/mL di collagene di coda di topo di tipo I in DMEM con il 10% di FBS e 1% p/s) è stata aggiunta agli inserti per colture cellulari (Transwell, Costar, Cambridge, MA, USA) in piastre da 12 pozzetti e lasciata polimerizzare. A questo strato è stato aggiunto 1 mL di soluzione contenente L929 ($1 \cdot 10^5$ /mL) insieme alle cellule U937 ($3 \cdot 10^4$ /mL) e collagene di tipo I. Dopo una incubazione a 37°C, le cellule Caco-2 ($2 \cdot 10^5$ /inserto) sono state seminate sul derma ricostruito e lasciate a 37°C con terreno Caco-2, aggiunto sia sulla parte superiore che nella parte inferiore del supporto del filtro. Dopo cinque giorni, i modelli cellulari sono stati trattati con H₂O₂ 75uM e arsenico 45 dH per 24 h. Per le analisi istologiche, i campioni sono stati fissati con formalina per 2 h a temperatura ambiente, disidratati e inclusi in paraffina. Successivamente, sezioni da 4 um di spessore ottenute dagli intestini ricostruiti sono state colorate con ematossilina ed eosina (H&E) e fotografate al microscopio.

Analisi statistica: Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software CoStat ver. 6.450 (2017) (<http://www.cohort.com>). Il test di Bartlett, che verifica l'assunto di base dell'ANOVA come l'omogeneità delle varianze, è risultato statisticamente significativo ($P > 0.05$) per il modello sano, curativo e preventivo. A causa della mancanza di omogeneità della varianza i dati dei tre modelli sono stati elaborati secondo ANOVA non parametrica unidirezionale completamente randomizzata (test di Kruskal-Wallis). Come test post hoc è stato utilizzato il test di Duncan, adeguato nel caso di disomogeneità di varianze.

Risultati

MODELLO SANO

Effetti dei trattamenti dell'arsenico sulla vitalità delle cellule L929

Per testare gli effetti dei diversi stimoli di Arsenico nelle cellule, le cellule L929 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti in terreno completo (come descritto nella sezione M&M). 24 ore dopo, è stato cambiato il terreno con DMEM con gli stimoli precedentemente preparati (As 45dH, 14, 15, 16, 29, 30, 31, 199, 200, 201 cH), acqua (W) o acqua 23 cH (W 23 cH) come descritto in precedenza. Nella condizione di controllo, le cellule sono state trattate con DMEM da solo. La proliferazione delle cellule è stata analizzata utilizzando il test MTT 24 ore dopo. Sono stati eseguiti tre diversi esperimenti. Nella Tabella 1 sono riportati i risultati e l'analisi statistica di ciascun esperimento, mentre nella Tabella 2 sono riportati i risultati medi e l'analisi statistica.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

Treatments	I experiment				II experiment				III experiment			
	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges
Control	0,603	0,021	0,009	a	0,594	0,067	0,028	abcd	0,637	0,046	0,019	bc
W	0,579	0,034	0,014	ab	0,640	0,050	0,020	abc	0,646	0,050	0,021	bc
As 45 dH	0,606	0,052	0,021	a	0,744	0,111	0,045	a	0,774	0,084	0,034	ab
W 23 cH	0,510	0,084	0,034	abc	0,661	0,098	0,040	abc	0,655	0,119	0,049	bc
As 14 cH	0,547	0,048	0,020	abc	0,747	0,099	0,040	a	0,753	0,033	0,013	abc
As 15 cH	0,515	0,068	0,027	abc	0,711	0,110	0,045	ab	0,641	0,073	0,030	bc
As 16 cH	0,554	0,065	0,027	abc	0,699	0,083	0,034	ab	0,797	0,091	0,037	a
As 29 cH	0,528	0,049	0,020	abc	0,549	0,106	0,043	bcd	0,617	0,080	0,033	c
As 30 cH	0,554	0,052	0,021	abc	0,452	0,147	0,060	d	0,661	0,099	0,040	bc
As 31 cH	0,513	0,060	0,024	abc	0,728	0,081	0,033	a	0,683	0,058	0,024	bc
As 199 cH	0,508	0,032	0,013	abc	0,529	0,057	0,023	cd	0,668	0,091	0,037	bc
As 200 cH	0,471	0,038	0,016	c	0,509	0,117	0,048	cd	0,624	0,028	0,012	c
As 201 cH	0,482	0,038	0,015	bc	0,468	0,103	0,042	d	0,641	0,061	0,025	bc

Tabella 1: Risultati (media), la deviazione standard (dev.st), l'errore standard (e.s) e l'analisi statistica (intervalli non significativi) di ciascun esperimento.

Treatments	Average of the 3 experiments				
	Mean	Dev.st	e.s	% respect to control	Non-significant ranges of % respect to control
Control	0,6113	0,049	0,012	100	cde
W	0,6215	0,053	0,012	101,7049	bcd
As 45 dH	0,70825	0,110	0,026	115,8044	a
W 23 cH	0,6087	0,119	0,028	99,58001	cde
As 14 cH	0,6825	0,116	0,027	111,6016	ab
As 15 cH	0,6225	0,116	0,027	101,9579	bcd
As 16 cH	0,6835	0,128	0,030	111,5945	ab
As 29 cH	0,5647	0,086	0,020	92,30751	def
As 30 cH	0,5557	0,133	0,031	90,59983	ef
As 31 cH	0,6415	0,114	0,027	105,002	bc
As 199 cH	0,5685	0,095	0,022	92,76618	def
As 200 cH	0,5346	0,096	0,023	87,25559	f
As 201 cH	0,5306	0,106	0,025	86,50017	f

Tabella 2: Risultati medi (Mean), deviazione standard (Dev.st), errore standard (e.s), % rispetto al controllo e analisi statistica (Frangere non significativi) dei tre esperimenti

Negli esperimenti sono stati inseriti diversi controlli: il controllo non trattato (controllo), l'acqua (W) e l'acqua 23 cH (W 23 cH) come controlli negativi, As 45 dH come controllo positivo. Dall'analisi di ciascun esperimento (Tabella 1), risulta che lo stimolo dell'arsenico esercita solitamente effetti significativi sulla proliferazione dei fibroblasti in relazione al controllo non trattato o all'acqua. I risultati sono chiaramente confermati nella Tabella 2, dove sono riportate le medie e nella Figura 1a. L'acqua e l'acqua 23 cH non esercitano un effetto significativo rispetto al controllo non trattato. D'altra parte, l'As 45 dH stimola in modo significativo la proliferazione cellulare e il suo effetto è maggiore rispetto alle altre diluizioni dell'arsenico. Inoltre, l'analisi statistica ha evidenziato due diversi gruppi di trattamenti: il primo gruppo,



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

comprendente As 14 e 16 cH, ha un effetto positivo sulla proliferazione cellulare, mentre il secondo gruppo, comprendente As 200 e 201 cH, esercita effetti negativi sulla proliferazione cellulare, con particolare riguardo per As 200 e 201 cH. Le diverse diluizioni di arsenico hanno mostrato una variabilità (coefficiente di variazione), che non è mai superiore al 20% (Fig 1b). In particolare alcuni stimoli, ovvero W, W 23 cH, As 45 dH, As 29, 199 e 200 cH hanno mostrato la variabilità più bassa (tra 6 e 12%), mentre As 14, 16, 31, 15, 30 e 201 cH ha mostrato una variabilità tra il 14 e il 18%.

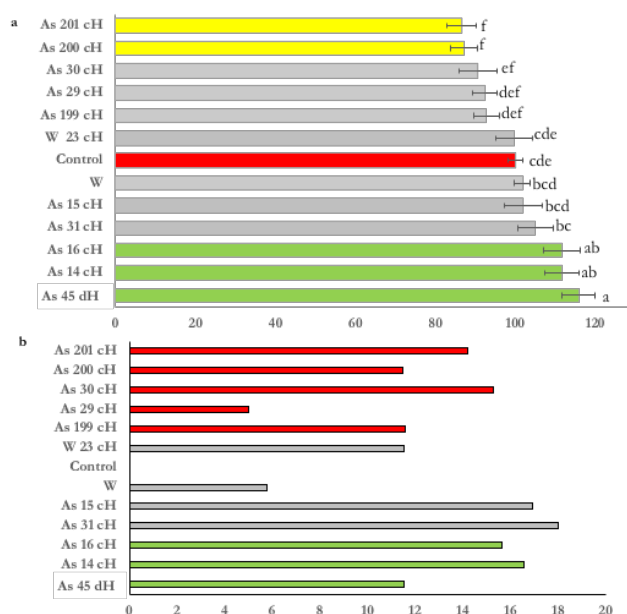


Fig 1: Effetti dell'arsenico sulla proliferazione delle cellule L929. Le cellule L929 sono state trattate con As 45dH, 14, 15, 16, 29, 30, 31, 199, 200, 201 cH, Water (W) o Water 23 cH (W 23 cH) in DMEM alle concentrazioni di 1:20. Il controllo (controllo non trattato) è stato trattato solo con DMEM. (a) I risultati sono riportati come percentuale rispetto al controllo. (b) L'immagine rappresentava il coefficiente di variazione (variabilità) espresso in percentuale (deviazione standard/valore medio).

MODELLO PREVENTIVO

Effetti preventivi dei trattamenti omeopatici di arsenico sulla vitalità delle cellule L929 in un modello di stress ossidativo indotto da H₂O₂

Il modello preventivo è stato pianificato come segue: le cellule L929 sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti. 24 ore dopo, le cellule sono state trattate con i trattamenti omeopatici di arsenico (As 45 dH, 14, 15, 16, 29, 30, 31, 199, 200, 201 cH), Acqua (W) o Acqua 23 cH (W 23 cH) come descritto in precedenza. Nella condizione di controllo, le cellule sono state trattate con DMEM da solo. 24 ore dopo, il terreno è stato rimosso e sono stati aggiunti H₂O₂ 75µM in PBS per 20 minuti. Successivamente, il terreno è stato rimosso e alle cellule è stato aggiunto terreno completo fresco. La proliferazione delle cellule è stata analizzata utilizzando il test MTT 24 ore dopo. L'esperimento è stato ripetuto 5 volte, durante ogni esperimento sono stati seminati 6 pozzetti/condizione.

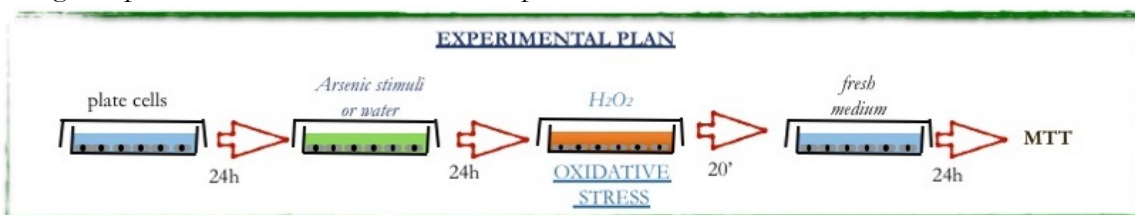


Fig 2: Rappresentazione schematica del piano sperimentale.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati e l'analisi statistica di ciascun esperimento, mentre nella Tabella 4 sono riportate le medie dei cinque esperimenti e l'analisi statistica.

Treatments	I experiment				II experiment				III experiment			
	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges
Control	0,630	0,031	0,012	a	0,827	0,042	0,017	a	0,752	0,058	0,024	a
W	0,411	0,085	0,035	bc	0,523	0,106	0,043	cd	0,512	0,063	0,026	de
H ₂ O ₂	0,409	0,049	0,020	bc	0,590	0,034	0,014	bcd	0,502	0,044	0,018	de
As 45 dH	0,466	0,029	0,012	b	0,606	0,063	0,026	bcd	0,625	0,054	0,022	bcd
W 23 cH	0,411	0,035	0,014	bc	0,560	0,033	0,013	bcd	0,572	0,087	0,036	bede
As 14 cH	0,466	0,054	0,022	b	0,577	0,064	0,026	bcd	0,531	0,066	0,027	bede
As 15 cH	0,439	0,046	0,019	bc	0,707	0,106	0,043	b	0,515	0,074	0,030	de
As 16 cH	0,354	0,057	0,023	cd	0,611	0,100	0,041	bcd	0,670	0,157	0,064	ab
As 29 cH	0,362	0,063	0,026	bcd	0,665	0,094	0,038	bc	0,557	0,090	0,037	bede
As 30 cH	0,423	0,081	0,033	bc	0,618	0,106	0,043	bcd	0,526	0,070	0,029	cde
As 31 cH	0,361	0,061	0,025	bcd	0,494	0,054	0,022	d	0,433	0,074	0,030	e
As 199 cH	0,274	0,042	0,017	d	0,621	0,099	0,040	bcd	0,573	0,109	0,044	bede
As 200 cH	0,379	0,061	0,025	bc	0,710	0,092	0,037	b	0,662	0,048	0,020	abc
As 201 cH	0,334	0,080	0,033	cd	0,570	0,120	0,049	bcd	0,458	0,037	0,015	e

Treatments	IV experiment				V experiment			
	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges
Control	0,692	0,119	0,049	a	0,646	0,070	0,029	a
W	0,361	0,096	0,039	b	0,302	0,044	0,018	bc
H ₂ O ₂	0,399	0,116	0,047	b	0,279	0,018	0,007	bc
As 45 dH	0,553	0,103	0,042	b	0,407	0,050	0,021	b
W 23 cH	0,418	0,088	0,036	b	0,313	0,044	0,018	bc
As 14 cH	0,414	0,085	0,035	b	0,389	0,172	0,070	b
As 15 cH	0,429	0,100	0,041	b	0,360	0,133	0,054	bc
As 16 cH	0,465	0,145	0,059	b	0,407	0,106	0,043	b
As 29 cH	0,531	0,084	0,034	b	0,332	0,054	0,022	bc
As 30 cH	0,475	0,116	0,047	b	0,360	0,093	0,038	bc
As 31 cH	0,438	0,062	0,025	b	0,300	0,042	0,017	bc
As 199 cH	0,420	0,060	0,024	b	0,303	0,051	0,021	bc
As 200 cH	0,398	0,189	0,077	b	0,331	0,080	0,033	bc
As 201 cH	0,350	0,091	0,037	b	0,212	0,015	0,006	c

Tabella 3: Risultati (media), la deviazione standard (dev.st), l'errore standard (e.s) e l'analisi statistica (intervalli non significativi) di ciascun esperimento.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

Treatments	Average of 5 experiments				
	Mean	Dev.st	e.s	% respect to control	Non-significant ranges of % respect to control
Control	0,709	0,099	0,018	99,99	a
W	0,422	0,115	0,021	59,0836	fg
H ₂ O ₂	0,436	0,121	0,022	60,7803	def
As 45 dH	0,531	0,103	0,019	74,6820	b
W 23 cH	0,455	0,116	0,021	63,5668	edef
As 14 cH	0,475	0,116	0,021	66,8937	cde
As 15 cH	0,490	0,151	0,028	68,2518	bc
As 16 cH	0,501	0,165	0,030	69,8676	bc
As 29 cH	0,489	0,147	0,027	67,9997	bcd
As 30 cH	0,480	0,126	0,023	67,2306	cde
As 31 cH	0,405	0,088	0,016	56,8816	fg
As 199 cH	0,438	0,159	0,029	60,5008	ef
As 200 cH	0,496	0,188	0,034	68,5900	bc
As 201 cH	0,385	0,143	0,026	53,2243	g

Table 4: Risultati medi (Mean), deviazione standard (Dev.st), errore standard (e.s), % rispetto al controllo e analisi statistica (range non significativi) dei tre esperimenti

Ad eccezione del controllo non trattato (controllo); le cellule per tutti gli altri stimoli sono state trattate con H₂O₂ 75µM. Dall'analisi di ogni singolo esperimento (Tabella 3), l'H₂O₂ ha sempre ridotto la proliferazione cellulare rispetto al controllo non trattato. L'applicazione di acqua e acqua 23 cH ha sempre ridotto la proliferazione cellulare in modo simile al trattamento con H₂O₂. Al contrario, l'arsenico 45 dH, nella maggior parte degli esperimenti, ha esercitato il maggiore effetto protettivo nei confronti dello stress ossidativo, anche se non è mai in grado di riportare la proliferazione cellulare al livello del controllo non trattato. I risultati sono chiaramente confermati nella Tabella 4, dove sono riportate le medie e nella Figura 3a (risultati medi espressi come percentuale del controllo). L'analisi statistica ha evidenziato due differenti gruppi di stimoli: il primo gruppo comprendente As 16, 200 e 15 cH ha avuto un effetto preventivo sulla proliferazione cellulare, paragonabile all'effetto di As 45 dH (controllo positivo), mentre il secondo gruppo comprendente As 31 e 201cH non hanno esercitato un effetto preventivo sulla proliferazione cellulare, riducendo la proliferazione cellulare rispetto al trattamento con H₂O₂. I diversi stimoli dell'arsenico hanno mostrato una certa variabilità (coefficiente di variazione), mai superiore al 30% (Fig 3b). La variabilità più elevata è stata osservata per As 201, 200 e 199 cH che presentano un coefficiente di variazione intorno al 25%. I risultati suggeriscono che questi trattamenti non sono realmente riproducibili in questo modello di stress ossidativo. Tutti gli altri stimoli, invece, hanno mostrato una variabilità compresa tra il 10 e il 18%, indicando che i loro effetti sono abbastanza riproducibili.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

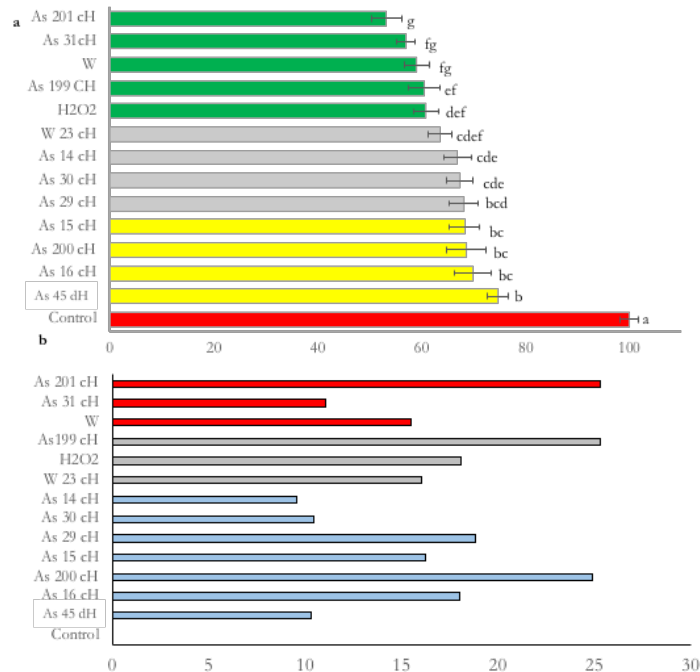


Fig 3: Effetti dell'arsenico sulla proliferazione delle cellule L929. Le cellule L929 sono state trattate con As 45dH, 14, 15, 16, 29, 30, 31, 199, 200, 201 cH, Water (W) o Water 23 cH (W 23 cH) in DMEM alle concentrazioni di 1:20. Il controllo (controllo non trattato) è stato trattato solo con DMEM. 24 ore dopo, tutti i pozzetti, una parte del controllo non trattato, sono stati trattati con 75µM H2O2 e 24 ore dopo è stato eseguito il test MTT (a) I risultati sono riportati come percentuale rispetto al controllo. (b) L'immagine rappresentava il coefficiente di variazione (variabilità) espresso in percentuale (deviazione standard/valore medio).

MODELLO CURATIVO

Effetti curativi dei trattamenti omeopatici di arsenico sulla vitalità delle cellule L929 nel modello di stress ossidativo mediato da H₂O₂

Il modello curativo è stato pianificato come segue: le cellule L929 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti. 24 ore dopo, le cellule sono state trattate con H₂O₂ 75µM in PBS per 20 minuti, dopodiché trattamenti con arsenico (As 45dH, 14, 15, 16, 29, 30, 31, 199, 200, 201 cH), acqua (W) o acqua 23 cH (W 23 cH) sono stati aggiunti alle cellule come descritto in precedenza. Nella condizione di controllo, le cellule sono state trattate con DMEM da solo. 24 ore dopo, la proliferazione cellulare è stata analizzata utilizzando il test MTT. L'esperimento è stato ripetuto 5 volte, durante ogni esperimento sono stati placcati 6 pozzetti/condizione.

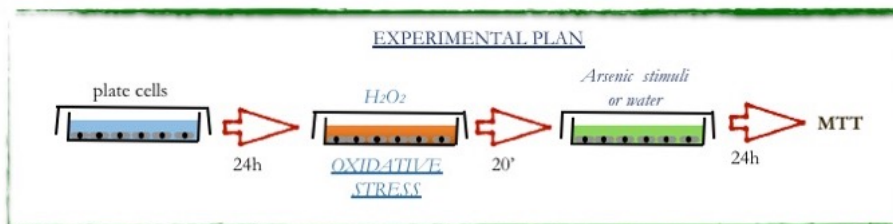


Fig 4: Rappresentazione schematica del piano sperimentale.

Nella Tabella 5 sono riportati i risultati e l'analisi statistica di ciascun esperimento, mentre nella Tabella 6 sono riportate le medie dei cinque esperimenti e l'analisi statistica.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

Treatments	I experiment				II experiment				III experiment			
	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges
Control	0,421	0,035	0,014	a	0,408	0,062	0,025	a	0,383	0,056	0,023	a
W	0,285	0,029	0,012	bc	0,231	0,032	0,013	b	0,235	0,038	0,016	bc
H ₂ O ₂	0,283	0,006	0,002	bc	0,222	0,020	0,008	b	0,218	0,017	0,007	c
As 45 dH	0,330	0,023	0,009	b	0,288	0,047	0,019	b	0,288	0,009	0,004	bc
W 23 cH	0,254	0,071	0,029	c	0,246	0,063	0,026	b	0,238	0,036	0,015	bc
As 14 cH	0,341	0,021	0,009	b	0,224	0,054	0,022	b	0,239	0,034	0,014	bc
As 15 cH	0,300	0,040	0,016	bc	0,233	0,062	0,025	b	0,255	0,023	0,009	bc
As 16 cH	0,280	0,059	0,024	bc	0,259	0,045	0,018	b	0,273	0,057	0,023	bc
As 29 cH	0,333	0,019	0,008	b	0,324	0,060	0,024	ab	0,292	0,027	0,011	bc
As 30 cH	0,313	0,047	0,019	bc	0,399	0,069	0,028	ab	0,309	0,034	0,014	bc
As 31 cH	0,301	0,053	0,022	bc	0,267	0,069	0,028	a	0,325	0,046	0,019	b
As 199 cH	0,318	0,047	0,019	bc	0,296	0,072	0,029	b	0,296	0,091	0,037	bc
As 200 cH	0,333	0,048	0,020	b	0,272	0,077	0,032	b	0,257	0,069	0,028	bc
As 201 cH	0,328	0,060	0,024	b	0,323	0,050	0,020	ab	0,278	0,061	0,025	bc

Treatments	IV experiment				V experiment			
	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges	Mean	Dev.st	e.s	Non-significant ranges
Control	0,308	0,043	0,017	a	0,381	0,110	0,045	a
W	0,134	0,040	0,016	bc	0,150	0,029	0,012	c
H ₂ O ₂	0,126	0,041	0,017	c	0,153	0,007	0,003	c
As 45 dH	0,190	0,033	0,014	b	0,196	0,020	0,008	bc
W 23 cH	0,125	0,027	0,011	c	0,140	0,034	0,014	c
As 14 cH	0,140	0,028	0,012	bc	0,188	0,062	0,026	bc
As 15 cH	0,129	0,021	0,009	c	0,149	0,033	0,013	c
As 16 cH	0,121	0,030	0,012	c	0,189	0,041	0,017	bc
As 29 cH	0,144	0,028	0,011	bc	0,203	0,019	0,008	bc
As 30 cH	0,125	0,034	0,014	c	0,187	0,028	0,012	bc
As 31 cH	0,150	0,042	0,017	bc	0,177	0,037	0,015	bc
As 199 cH	0,160	0,045	0,018	bc	0,174	0,035	0,014	bc
As 200 cH	0,153	0,028	0,011	bc	0,263	0,087	0,035	b
As 201 cH	0,112	0,006	0,002	c	0,213	0,043	0,018	bc

Tabella 5: Risultati (media), la deviazione standard (dev.st), l'errore standard (e.s) e l'analisi statistica (intervalli non significativi) di ciascun esperimento.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

Treatments	Average of 5 experiments				Non-significant ranges of % respect to control
	Mean	Dev.st	e.s	% respect to control	
Control	0,380	0,073	0,013	100	a
W	0,207	0,066	0,012	53,6571	d
H ₂ O ₂	0,200	0,060	0,011	51,8994	d
As 45 dH	0,258	0,063	0,011	67,4919	b
W 23 cH	0,192	0,070	0,013	51,6014	d
As 14 cH	0,227	0,079	0,014	58,6947	cd
As 15 cH	0,213	0,075	0,014	55,22814	d
As 16 cH	0,224	0,076	0,014	58,0721	cd
As 29 cH	0,259	0,081	0,015	66,9195	b
As 30 cH	0,267	0,108	0,020	68,54995	b
As 31 cH	0,244	0,084	0,015	63,3707	bc
As 199 cH	0,249	0,089	0,016	64,5905	bc
As 200 cH	0,256	0,085	0,015	66,3065	b
As 201 cH	0,251	0,094	0,017	64,3727	bc

Tabella 6: Risultati medi (Mean), deviazione standard (Dev.st), errore standard (e.s), % rispetto al controllo e analisi statistica (range non significativi) dei tre esperimenti

Ad eccezione del controllo non trattato (controllo); le cellule per tutti gli altri stimoli sono state trattate con H₂O₂ 75µM. Dall'analisi di ogni singolo esperimento (Tabella 5), l'H₂O₂ ha sempre ridotto la proliferazione cellulare rispetto al controllo non trattato. L'aggiunta di acqua e acqua 23 cH ha sempre ridotto la proliferazione cellulare in modo simile al trattamento con H₂O₂. Al contrario, l'arsenico 45 dH, nella maggior parte degli esperimenti, ha esercitato il maggior effetto curativo rispetto allo stress ossidativo, anche se non è mai in grado di riportare la proliferazione cellulare al livello del controllo non trattato. I risultati sono chiaramente confermati nella Tabella 6, dove sono riportate le medie e nella Figura 4a (risultati medi espressi come percentuale del controllo). L'analisi statistica ha evidenziato due diversi gruppi di stimoli: il primo gruppo comprendente As 30, 29 e 200 cH ha avuto un effetto curativo sulla proliferazione cellulare, che è paragonabile all'effetto di As 45 dH (controllo positivo), mentre il secondo gruppo comprendente As 14, 16 e 15 cH non hanno esercitato un effetto curativo sulla proliferazione cellulare. I diversi stimoli di arsenico hanno mostrato una variabilità (coefficiente di variazione), che non è mai superiore al 35% (Fig. 4b). La variabilità più elevata è stata osservata per As 30, 201 e 15 cH che presentano un coefficiente di variazione intorno al 35%.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

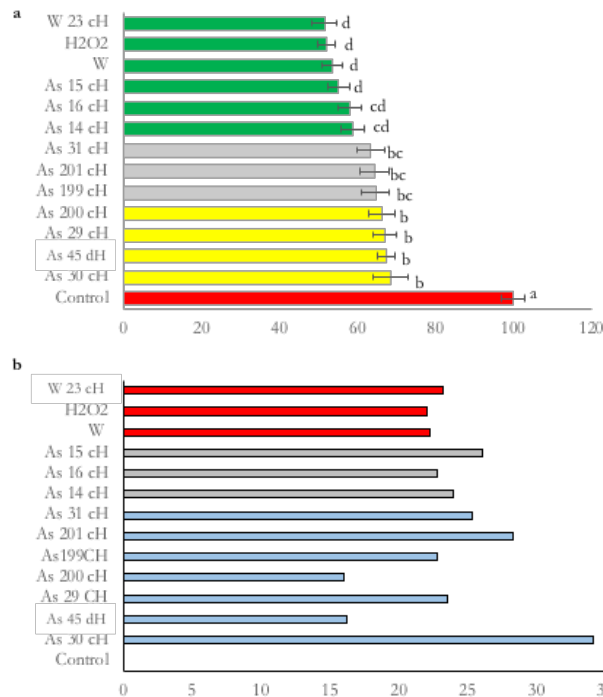


Fig 5: Effetti dell'arsenico sulla proliferazione delle cellule L929. Le cellule L929 sono state trattate con As 45dH, 14, 15, 16, 29, 30, 31, 199, 200, 201 cH, Water (W) o Water 23 cH (W 23 cH) in DMEM alle concentrazioni di 1:20. Il controllo (controllo non trattato) è stato trattato solo con DMEM. 24 ore dopo, tutti i pozzi, una parte del controllo non trattato, sono stati trattati con 75 μ M H₂O₂ e 24 ore dopo è stato eseguito il test MTT (a) I risultati sono riportati come percentuale rispetto al controllo. (b) L'immagine rappresentava il coefficiente di variazione (variabilità) espresso in percentuale (deviazione standard/valore medio).

Effetti curativi dell'Arsenico su modelli tridimensionali di intestino ricostruito

Al fine di analizzare la capacità dell'arsenico a diluizioni omeopatiche di ridurre gli effetti dello stress ossidativo indotto dall'H₂O₂ su modelli di intestino ricostruito, è stato sviluppato un modello di intestino equivalente tridimensionale, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Al termine della formazione del modello tridimensionale di intestino, sono stati aggiunti i trattamenti secondo lo schema sperimentale rappresentato in Figura 6. In breve, 24 ore dalla formazione del modello tridimensionale, è stata aggiunta H₂O₂ (75 μ M) o nessun trattamento (controllo). 24 ore dopo, ai campioni è stato aggiunto arsenico 45dH alla diluizione 1:20 o 1:5 nel terreno base DMEM. Nel campione di controllo non è stato aggiunto alcun trattamento. 24 ore dopo l'aggiunta dei trattamenti, gli intestini equivalenti sono stati inclusi in paraffina e sono state eseguite analisi istologiche su sezioni di 4 μ m.

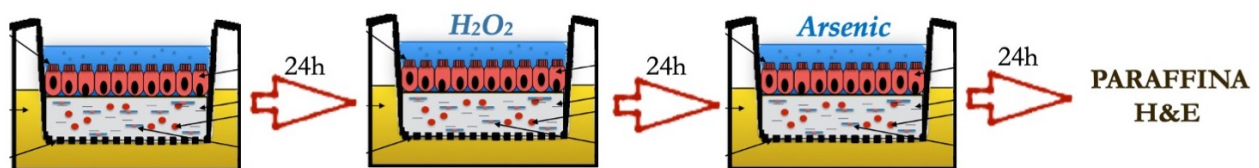


Fig 6: Rappresentazione schematica del piano sperimentale.

L'analisi istologica (Fig7) mostra come il trattamento con H₂O₂ porti ad una sofferenza del modello di intestino ricostruito, caratterizzato da una minore integrità del tessuto epiteliale che risulta frammentato e discontinuo rispetto al controllo non trattato. Interessante notare come l'aggiunta dell'arsenico 45dH riduca, almeno in parte, l'effetto frammentato esercitato dall' H₂O₂. Si può infatti osservare un tessuto epiteliale più compatto rispetto al trattamento da solo, maggiormente evidente quando l'arsenico 45dH è



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
AGRO-ALIMENTARI

presente alla diluizione 1:20 rispetto a quella 1:5, suggerendo come una più alta diluizione potrebbe avere un effetto “curativo” maggiore dello stress indotto dall' H_2O_2 .

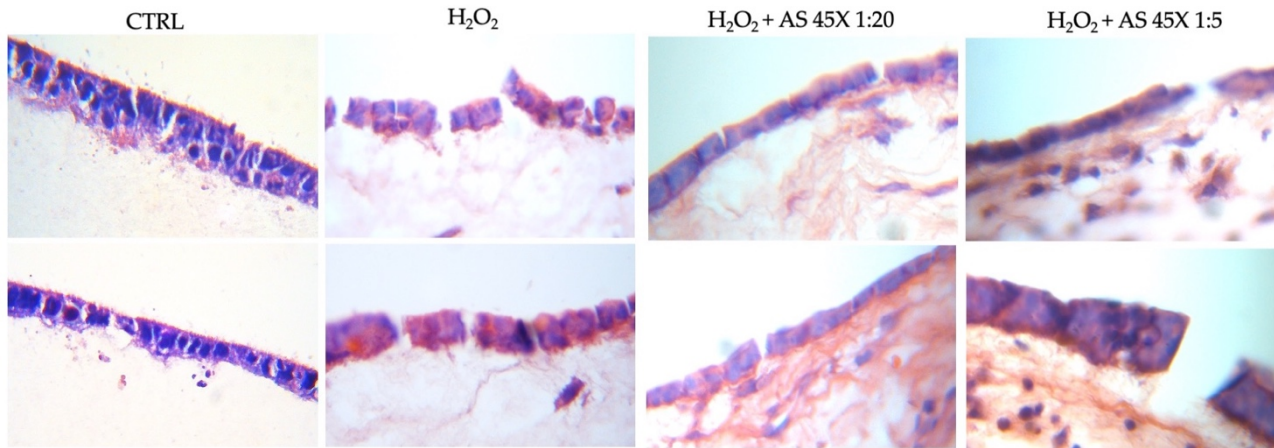


Fig 7: Ematossilina ed Eosina di modelli di intestino ricostruito trattato con H_2O_2 e Arsenico 45dH alle diluizioni 1:20 e 1:5.

Conclusioni

In conclusione, è possibile osservare che alcuni stimoli di Arsenico hanno mostrato lo stesso comportamento tra i diversi modelli cellulari *in vitro*. **L'As 45 dH è risultato esercitare un effetto positivo sulla proliferazione cellulare in tutti i modelli cellulari ed è stato lo stimolo, tra tutti gli altri, con il maggior effetto positivo.** Questo risultato sembra essere confermato anche quando l'As 45dH viene aggiunto ad un modello di intestino ricostruito, suggerendo un suo potenziale effetto curativo, anche se altri studi saranno necessari per confermare o meno questo risultato. Questo dato sembra essere confermato anche dai risultati sul modello di crescita del grano *in vitro* (Betti et al 1997; Brizzi et al 2005). In questi esperimenti l'As 45 dH, applicato dopo aver avvelenato i semi con una dose subletale di As_2O_3 , ha indotto un aumento significativo della lunghezza del germoglio rispetto ai semi avvelenati cresciuti in acqua distillata. Tra gli altri stimoli dell'arsenico, rispetto all'acqua non succussa (W), l'As 16 cH ha sovraregolato la proliferazione dei fibroblasti sia nel modello cellulare sano che in quello preventivo. As 29, 30 e 200 cH hanno ridotto l'effetto dello stress indotto da H_2O_2 sulla proliferazione dei fibroblasti nel modello curativo, mentre un effetto simile è stato indotto da As 200 cH anche nel modello preventivo.

Bibliografia

- Betti L, Brizzi M, Nani D, Peruzzi M. (1997) Effect of high dilutions of *Arsenicum album* on wheat seedlings from seed poisoned with the same substance. Br Hom J 86: 86-89.
- Brizzi M, Lazzarato L, Nani D, Borghini F, Peruzzi M, Betti L. (2005) A biostatistical insight into the As_2O_3 high dilution effects on the rate and variability of wheat seedling growth. Forsch Komplementärmed 12: 277-283.
- Truzzi F, Valerii MC, Tibaldi C, Zhang Y, Abduazizova V, Spisni E, Dinelli G. Are Supplements Safe? Effects of Gallic and Ferulic Acids on In Vitro Cell Models. Nutrients. 2020 May 29;12(6):1591. doi: 10.3390/nu12061591.