

Effetti di medicinali omeopatici in modelli murini di comportamento e ansietà

RIASSUNTO

L'introduzione concerne l'ansietà con le sue diverse espressioni, i trattamenti convenzionali e alcune considerazioni sulle prove su animali. Successivamente riportiamo una sintesi dei nostri studi sperimentali con medicinali omeopatici sui sintomi comportamentali correlati con ansietà, in un modello murino di laboratorio (topo). Dopo uno screening di alcuni medicinali alla diluizione/dinamizzazione 5CH si è concentrata l'attenzione su *Gelsemium sempervirens* (*Gelsemium s.*) i cui effetti sono stati testati in diversi contesti sperimentali e diluizioni/dinamizzazioni differenti con i topi di ceppo ICR-CD1. I topi di controllo sono stati trattati con Soluzione idroalcolica (veicolo) mentre i farmaci allopatrici utilizzati sono stati il Diazepam o il Buspirone nella stessa soluzione idroalcolica (0,3%), usata per diluire e dinamizzare i medicinali omeopatici. Le prove sono state approvate dal comitato etico ed eseguite con soluzioni codificate e controlli in doppio cieco. Sono stati osservati effetti statisticamente significativi di *Gelsemium sempervirens* alle diluizioni/dinamizzazioni 5CH, 7CH, 9CH e 30CH in diversi "sintomi" comportamentali convenzionalmente assimilati alla presenza di ansietà, come il tempo trascorso nello spazio aperto del test di Light-Dark, il numero di passaggi attraverso un foro tra due compartimenti e la tendenza a spostarsi verso il centro dell'Open Field. In conclusione, il *Gelsemium s.* in varie diluizioni comprese quelle oltre il numero di Avogadro-Loschmidt, ha dato risultati molto consistenti in questi modelli, in cui si sono rilevate diverse sensibilità ai diversi test a seconda del setting sperimentale.

PAROLE CHIAVE

Comportamento; paura; ansia; modelli animali; rimedi omeopatici

SUMMARY

The introduction concerns the anxiety, its different treatments and the meaning of animal models. We then report a synthesis of our studies on a precise experimental model of anxiety-like behavioural symptoms in mice. After a screening of several compounds at the 5CH dilution/dynamization, we focused our attention on *Gelsemium sempervirens* (*Gelsemium s.*), whose anxiolytic-like effects were tested in various experimental settings and different dilutions with mice ICR-CD1 strain. Control mice were treated with Hydroalcoholic solution (vehicle), while allopathic drugs are Diazepam (0,5 mg/kg-1 mg/kg), or Buspirone (5 mg/kg) in the same hydroalcoholic (0,3%) solution used to dilute the homeopathic medicines. The test was approved by ethical committee and was performed with coded drugs/controls in double blind. High scattering of data due to inter-individual variability was often noted. *Gelsemium s.* at the dilutions/dynamizations of 5CH, 7CH, 9CH and 30CH induced statistically significant effects in several "symptoms" of anxiety-like behaviour such as the time spent in the illuminated compartment in light/dark test, the number of transitions through a hole separating two different chambers or the tendency to go in the centre of the Open Field. In conclusion, *Gelsemium s.* consistently proved to be effective in these models, even at dilutions beyond the Avogadro-Loschmidt constant, with different sensitivity to different dilutions/dynamizations according to the experimental settings.

KEYWORDS

Behaviour; fear; Anxiety; animals models; Homeopathic remedies

INTRODUZIONE

Secondo le più recenti statistiche, circa il 20% della popolazione, a un certo punto della vita, sperimenta un disturbo psicologico legato all'ansietà, come descritto dal DSM-IV (vedi Tabella 1). Si stima che negli USA il costo complessivo per la cura di questi disturbi sia di 44 miliardi di dollari l'anno (1). La più antica ed ancor oggi più diffusa terapia farmacologica dell'ansia, nonostante la rapida ascesa degli antidepressivi serotoninergici, è basata sulle benzodiazepine. Questi farmaci agiscono sul recettore, chiamato proprio recettore per le benzodiazepine, che stimola la neurotrasmissione del GABA, acido gamma-amminobutirrico. Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio del cervello: ha quindi un effetto sedativo e ansiolitico. Altro farmaco ansiolitico, diverso dalle benzodiazepine, è il buspirone, che non interagisce direttamente con il sistema gabaergico e sembra esercitare il suo effetto ansiolitico agendo come agonista parziale del recettore cerebrale 5-HT_{1A}, ma presenta anche affinità per i recettori dopaminergici. Il Buspirone, a differenza delle benzodiazepine, necessita di più di una settimana per esercitare in modo ottimale gli effetti ansiolitici nell'uomo, rendendolo più consigliabile per trattamenti cronici e

sub-cronici. Il farmaco è utilizzato negli stati generalizzati di ansia, ma meno negli attacchi di panico (2,3). I farmaci "ansiolitici" convenzionali agiscono ovviamente come farmaci "anti"-patici (4), sopprimendo uno o pochi sintomi piuttosto che curare la causa o il meccanismo originale, procedura talvolta necessaria, ma spesso utilizzata in modo superficiale e acritico anche come automedicazione. I problemi dei farmaci convenzionali come le benzodiazepine, soprattutto se assunti cronicamente, stanno anche nel fatto che si può sviluppare tolleranza e/o dipendenza fisica. Pertanto, la ricerca di nuovi farmaci e di nuovi approcci non farmacologici alla terapia dei disturbi d'ansia è ancora molto attiva. In questo contesto, ci siamo inseriti con un ap-

proccio sperimentale che ha testato medicinali omeopatici tradizionalmente usati per pazienti che presentano disturbi d'ansia.

L'ansietà è un sintomo che spesso si presenta anche in pazienti che chiedono di essere curati con l'omeopatia e, d'altra parte, questa terapia ha nel suo repertorio numerosi medicinali che comprendono tale sintomo, con le sue numerose diverse sfumature. Si tratta di prodotti privi di effetti avversi rispetto ai farmaci tradizionali e con uno spazio commerciale sempre più in via di sviluppo. Sempre più persone ne fanno uso e vogliono sapere come funziona questo tipo di rimedi e il nostro gruppo di ricerca da anni si interessa sulla possibilità di dare risposte a queste questioni seguendo un metodo

scientifico. Una recente rassegna (5) sulle prove di evidenza dell'Omeopatia nelle sindromi ansiose (ansia da test, disordine d'ansia generalizzato, ansia legata a condizioni patologiche di vario tipo) ha identificato otto trials sull'argomento. Tuttavia, le conclusioni sono che le evidenze di una sicura efficacia sono scarse e spesso i risultati sono contraddittori. Ci sono anche notevoli problemi metodologici nel disegno degli studi. Vari studi osservazionali sembrano suggerire un'efficacia ed una soddisfazione dei pazienti, ma la mancanza di un gruppo di controllo adeguato preclude una sicura conclusione sul ruolo del medicinale omeopatico. Gli studi concordano sul fatto che gli effetti avversi o collaterali siano scarsi e che si limitino alle reazioni al medicinale che consistono in transitori peggioramenti dei sintomi (aggravamento omeopatico). Esistono pochissime (meno di una ventina) ricerche sperimentali su modelli animali, ma i metodi spesso sono poco chiari o i risultati riportati senza statistiche, le pubblicazioni sono su riviste non indicizzate e difficilmente accessibili (6). Pertanto, sono necessarie altre ricerche per migliorare la conoscenza degli effetti dell'Omeopatia nell'ansia. In questo lavoro presentiamo un resoconto dei nostri studi, effettuati negli ultimi tre anni, volti ad indagare l'effetto di medicinali omeopatici in modelli di comportamento e di ansietà su animali da esperimento (7-9). Una via sperimentale, finora poco percorsa, per studiare i medicinali omeopatici è la sperimentazione animale. Questo tipo di ricerche su animale in campo omeopatico iniziarono nel 1960 con J. e M. Tetau; quest'ultimo fu affiancato da A.-Marie Binsard e J. Guillemain tra gli anni '70-'80 (6, 10-16), ma finora la gran parte delle conoscenze è rimasta di tipo preliminare e confinata nelle riviste non indicizzate nelle ban-

Tabella 1. Disturbi d'ansia più comuni, loro diffusione e trattamento standard

Disturbi	Sintomi Principali	Prevalenza (percentuale)	Terapie
Ansia Generalizzata	Preoccupazione esagerata irrealistica e duratura, tensione motoria, incapacità a rilassarsi, irritabilità, difficoltà a dormire, ipervigilanza	5	Benzodiazepine, antidepressivi, psicoterapia cognitivo-comportamentale
Disturbi di panico (spesso associato con agorafobia)	Brevi ricorrenti, inattesi episodi di terrore, crisi neurovegetative simpatiche (sudorazione e rialzo pressorio), dispnea (respiro corto), paura di perdere il controllo, de-realizzazione	3	Benzodiazepine, antidepressivi, psicoterapia cognitivo-comportamentale
Disturbi da stress post-traumatico	In seguito a un evento estremamente stressante (con danni reali o minacciati), episodi ricorrenti di paura, spesso scatenati da ricordi del trauma iniziale, attivazione neurovegetativa	3	Antidepressivi (SSRI), benzodiazepine, psicoterapia cognitivo-comportamentale
Fobia Sociale	Avversione, paura, attivazione neurovegetativa in contesti sociali non familiari	13	Antidepressivi (SSRI), benzodiazepine, psicoterapia cognitivo-comportamentale
Fobia Specifica	Avversione, paura, attivazione neurovegetativa in situazioni specifiche (animali, sangue ed altro)	11	Psicoterapia cognitivo-comportamentale
Disturbi Ossessivo-Compulsivo	Pensieri ossessivi e atti ripetitivi ricorrenti e necessari (compulsioni) per scaricare l'ansia	2	Antidepressivi, psicoterapia cognitivo-comportamentale

1. DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA E DIAGNOSTICA, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA;

2. DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA E MEDICINA DI COMUNITÀ, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA.

che dati internazionali. Certamente esistono problemi non indifferenti nell'applicazione degli studi sperimentali su animali all'uomo ed esistono pure problemi etici nell'utilizzo di animali da esperimento per il fine dello studio dei farmaci. Questi problemi riguardano sia i farmaci convenzionali sia i medicinali omeopatici, anche se con diversi aspetti teorici e applicativi. Non pare qui il caso di affrontare il problema etico se non per riferire che le nostre sperimentazioni sono state approvate da due commissioni etiche indipendenti e, per di più, sono state effettuate con dosi assolutamente non tossiche e senza infliggere agli animali stress artificiali. Per quanto riguarda il problema dell'obiettivo dello studio, è ovvio che la sperimentazione animale non potrà mai sostituire quella sull'uomo come prova di efficacia clinica (a parte il caso della veterinaria in cui invece è indispensabile), ma ha notevoli vantaggi nello studio pre-clinico e in quello sul meccanismo d'azione, perché si svolge in condizioni più standardizzate e permette di esaminare in modo preliminare un maggior numero di variabili. Durante gli anni Quaranta e Cinquanta, la maggior parte dei comportamentisti credeva che i processi fondamentali dell'apprendimento fossero gli stessi per gli esseri umani e gli altri animali; così cercarono di scoprire questi principi studiando gli animali in un laboratorio in cui fosse possibile controllare e manipolare ogni aspetto del loro ambiente. La psicologia è molto cambiata dai tempi del comportamentismo ed oggi è opinione comune che gli esseri umani, con le loro peculiari capacità linguistiche e la loro struttura cerebrale altamente sviluppata, siano caratterizzati da processi di pensiero molto specifici. Inizialmente la psicologia comportamentista è stata profondamente influenzata dalle ricerche sull'apprendimento animale condotte da due uomini: il fisio-

logo russo I. Pavlov (1849-1936) e lo psicologo americano B.F. Skinner (1904-1990). Pavlov era interessato a capire come gli animali potessero imparare che certi stimoli tendono ad aver luogo insieme e da qui nacque il concetto di "contingenze di stimolo" vale a dire come per esempio un lampo di luce e un rumore riescano ad influire sul comportamento animale. Egli chiamò questo tipo di apprendimento "condizionamento classico". Skinner era interessato al modo in cui gli animali apprendono che certe risposte tendono ad essere evocate da certi stimoli e da qui il concetto di "contingenze di stimolo risposta" vale a dire come per esempio apprendere di andare in un certo luogo per trovarvi in genere del cibo. Skinner chiamò questo tipo di apprendimento "Condizionamento Operante". Secondo l'interpretazione cognitiva del condizionamento classico, gli animali si aspettano che ad uno stimolo segua un altro stimolo. Secondo l'interpretazione del condizionamento operante, invece, gli animali si aspettano che le loro risposte abbiano certe conseguenze: per esempio quando un animale preme una leva durante un esperimento dovrebbe produrre immissione del cibo nella gabbia. L'animale prevede le conseguenze del suo comportamento e sceglie il comportamento che gli permette di giungere al suo scopo.

In questo lavoro, dopo un'approfondita descrizione delle metodologie, si darà conto dell'evoluzione delle indagini e dei risultati, accennando anche ai problemi incontrati come la difficoltà nel fare accettare i lavori per la pubblicazione.

MATERIALI E METODI

Di solito, gli studi su animali sono la base per disegnare studi clinici con maggiore probabilità di successo e si-

curezza. Tra i metodi disponibili ricorderemo, ad esempio, l'analisi neurochimica di processi cellulari specifici e le indagini elettrofisiologiche sull'attività elettrica di singole cellule o del cervello. Le varie manifestazioni comportamentali di un organismo risultano dall'integrazione di numerose attività cerebrali: lo studio del comportamento ci fornirà pertanto una visione olistica della funzione cerebrale. Gli psicologi della Gestalt ritenevano che per studiare l'"Insight" vale a dire una "forma di apprendimento e di soluzione dei problemi che dipende da complesse capacità cognitive" sia necessario scegliere una situazione sperimentale appropriata. Tra le metodiche utilizzate nello studio dell'ansia su animale si annoverano gli studi che si basano sull'osservazione di alcune variabili del comportamento animale, osservate in condizioni standard. Gli atti comportamentali (sintomi) sono le manifestazioni esteriori dell'attività cerebrale, e il loro studio informa sull'attività in corso nel cervello. L'analisi dettagliata delle modalità e delle motivazioni del comportamento di un organismo è un utile contributo alle conoscenze dei processi cerebrali che determinano e modulano il comportamento stesso. Naturalmente, occorre tradurre la patologia ansiosa in sintomi riconducibili all'animale per osservare l'evidenza di un qualsivoglia trattamento (17).

Setting sperimentale

Nel Dicembre del 2006 è stato costituito un nuovo laboratorio di comportamento animale presso lo Stabulario della Farmacologia del Centro Interdipartimentale di Ricerca Sperimentale sugli Animali di Laboratorio dell'Università di Verona per una sperimentazione su modelli murini di ansia. Da un'attenta analisi della letteratura esistente, si sono analizzate le condizioni

sperimentali e i test più utili per tale sperimentazione in modo da effettuare le prove in linea con le ricerche effettuate su farmaci allopatrici in maniera rigorosamente scientifica. Si sono considerati i dettagli sull'esecuzione del test comportamentale (es. le condizioni di allevamento e stabulazione, la distribuzione del cibo e dell'acqua, la frequenza e la durata delle manipolazioni prima e durante l'esperimento, oltre al grado di stress indotto dallo sperimentatore e dall'ambiente), che sono fattori in grado di influenzare l'attività cerebrale e quindi la prestazione degli animali. Inoltre le ricerche comportamentali sono state effettuate in ambiente il più possibile insonorizzato e soprattutto con un rumore di fondo stabile. Negli studi sull'ansia nell'animale, un topo non è mai testato di nuovo con uno qualsiasi dei test comportamentali utilizzati: i test non possono e non devono essere ripetuti perché si introdurrebbe un "effetto memoria". Tutte le procedure sono video registrate ed effettuate in assenza di altri disturbi.

In questo progetto l'ansia è stata indotta e valutata attraverso una o più metodiche etologiche ed è stato valutato l'effetto ansiolitico di alcuni medicinali omeopatici utilizzati nell'uomo per disturbi correlati all'ansia (irritabilità, nervosismo, disturbi del sonno). Durante lo studio del protocollo di ricerca su modelli di ansia, si è pensato di utilizzare test comportamentali di paura e ansia che si avvicinino il più possibile alle condizioni naturali, inducendo minore sofferenza possibile agli animali. Si è scelto – anche per motivi etici - di utilizzare metodi comportamentali senza l'utilizzo di correnti elettriche, di stressare il meno possibile gli animali e di non utilizzare forme di contenimento o di immobilizzazione dell'animale. A questo punto viene naturale chiedersi come è stato

possibile creare ansia nell'animale, volendo curare i sintomi con rimedi omeopatici e allopatrici. In realtà, gli stessi apparati sperimentali, il Light-Dark box, il Plus Maze test o l'Open Field test, forniscono già lo stimolo sufficiente per creare questo tipo di sintomatologia nei roditori: infatti l'animale è improvvisamente estratto dalla sua gabbia di stabulazione prendendolo per la coda (paura del predatore), immesso nella arena e testato da solo (mentre solitamente sta in gabbia con altri), in un ambiente mai conosciuto (neofobia), sotto un'illuminazione superiore al solito (paura della luce), con colore diverso da quello abituale, senza cibo e acqua a disposizione nei minuti del test, in spazio aperto e ampio (agorafobia). Come si vede, non si tratta di stress particolarmente violenti, ma sufficienti ad indurre emozioni che si cerca di modificare o attenuare con il medicinale testato. Questo tipo di test detti "modelli comportamentali con procedure non condizionate" permette di studiare e valutare lo stato di ansietà dell'animale avvicinandosi il più possibile alle reali condizioni naturali prive di qualsiasi condizionamento e coinvolgimento emozionale in aggiunta alla prova stessa (18).

L'idea originale che ci ha indotto a utilizzare questi modelli per indagare l'efficacia del medicinale omeopatico è nata dalla necessità di un test in cui l'animale fosse messo in una situazione di "incertezza" quasi fisiologica sul come comportarsi, là dove il suo movimento non fosse dettato da una necessità di difesa o di fuga inderogabile, ma rappresentasse una scelta aperta a varie possibilità (es. nel momento in cui l'animale si affaccia dallo spazio chiuso a quello aperto spesso si osserva la sua incertezza: a volte prende coraggio ed esce, altre volte si ritira di nuovo nella "tana"). Abbiamo ipotiz-

zato che in tal modo la più piccola influenza regolante lo stato emotivo, come quella possibilmente dovuta a un'alta diluizione omeopatica (ma specificamente indirizzata ai centri nervosi dell'ansietà), potesse rivelarsi decisiva proprio al momento della scelta di quale percorso intraprendere. Quest'ipotesi è strettamente legata agli studi sulla complessità e il caos che da noi e da altri sono stati collegati proprio alle teorie del funzionamento del medicinale omeopatico (19-24).

Animali utilizzati

Sono stati utilizzati solo topi del ceppo ICR-CD1, uno dei ceppi albini più usati in laboratorio, caratterizzato da un livello di risposta "simil-ansiosa" di grado medio. Animali maschi di 4-5 settimane, del peso di circa 20-22 grammi, venivano randomizzati e distribuiti al loro arrivo in numero di 4 o 2 per gabbia (vedi risultati) ed utilizzati dopo 8 e 9 giorni a 30-32 grammi di peso. Gli animali erano mantenuti con cibo e acqua nelle gabbie delle dimensioni di 25 × 14 × 12 cm, con cicli di luce/buio di 12 ore (luce dalle 7 del mattino alle 19 di sera). L'umidità nella stanza di stabulazione era mantenuta a 50+/-5 % e la temperatura a 22+/-2 gradi Celsius. Tutti gli studi sono stati effettuati in conformità con le norme italiane NIH per l'uso di animali nella ricerca e le procedure sono state approvate dal Comitato Etico per gli Animali dell'Università degli Studi di Verona e dalla Commissione del Ministero della Salute Italiano per il Benessere Animale. Al termine delle prove gli animali erano sacrificati mediante anestesia gassosa profonda.

Medicinali

Tutte le prove, a partire dalla preparazione del medicinale, sono state svolte in condizioni di randomizzazione e doppio cieco. Sono state testate diverse diluizioni centesimali e farmaci allopa-

tici come il Diazepam (Valium) (alla dose di 0,5 mg/kg nello screening e poi 1mg/kg somministrato nei giorni degli esperimenti) o il Buspirone (alla dose di 5 mg/kg somministrato tutti i giorni compresi quelli della sperimentazione), utilizzando come controllo lo stesso solvente utilizzato anche per la preparazione dei rimedi omeopatici. Le diluizioni/dinamizzazioni 3CH, 4CH, 6CH, 8CH e 29CH e lo stesso solvente usato per diluire (etanolo al 30% in acqua distillata) sono state preparate e messe a nostra disposizione da Laboratoires Boiron e tenute al buio e a temperatura ambiente, avvolte da foglio di alluminio. Il giorno precedente l'inizio delle somministrazioni, le soluzioni venivano da noi ulteriormente diluite/dinamizzate 100 X, sostanzialmente per ridurre il grado alcolico allo 0,3%, che si è visto da prove preliminari non avere alcun effetto né tossico né ansiolitico. Quindi le diluizioni/dinamizzazioni sono state la 4 CH ottenuta dalla 3 CH, la 5 CH ottenuta dalla 4 CH, la 7 CH ottenuta dalla 6 CH, la 9 CH ottenuta dalla 8 CH e la 30 CH ottenuta dalla 29 CH. Ogni volta, si sono preparati il numero desiderato di flaconi sterili (marcati con etichetta numerata rimuovibile) contenenti 39,6 ml di acqua distillata cui si sono aggiunti 0,4 ml della soluzione omeopatica e ciascun flacone è stato sottoposto a forte scuotimento manuale con 20 colpi dall'alto in basso. In seguito una persona, estranea a questa sperimentazione, procedeva alla codifica, scambiando l'etichetta del numero con una lettera dell'alfabeto estratta a sorte; tale codifica era poi custodita in busta chiusa fino al termine dell'analisi degli esperimenti. Una volta preparata, ogni provetta da 40 ml veniva distribuita in altre 10 provette sterili di polistirene da 15 ml (4 ml/provetta, sufficienti per la som-

ministrazione giornaliera). Ogni provetta è stata ricoperta da alluminio e il tutto è stato poi riposto in camera fredda a +5°C.

Ogni giorno prima delle iniezioni, le provette erano tenute fuori dalla camera fredda fino al raggiungimento della temperatura ambientale, quindi venivano nuovamente dinamizzate manualmente. Ad ogni topo è stata somministrata intraperitonealmente una dose di 0,3 ml del farmaco, complessivamente per dieci giorni e mezz'ora prima della seduta sperimentale, utilizzando siringhe da insulina.

Light-dark test

Questo test comportamentale utilizza un apparato costituito da due camere: in un'area di dimensioni 30x30 cm viene mantenuto un ambiente luminoso (200 lux), nell'altra di dimensioni 15x30 cm un ambiente buio. Il test è ampiamente validato sia dal punto di vista etologico-comportamentale, che farmacologico, in quanto la maggior parte delle sostanze ad azione ansiolitica inducono una maggiore permanenza e aumento di passaggi nella parte luminosa – espressione quindi di una ridotta risposta emozionale, capacità esplorativa e di minor paura di ambiente nuovo (25).

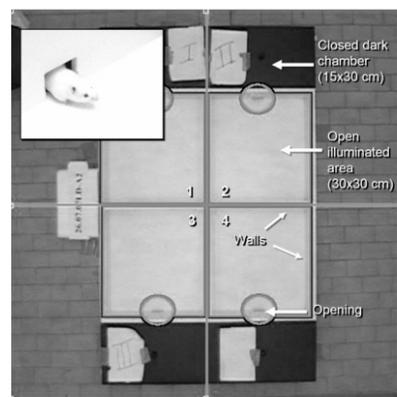


Figura 1. Apparato di Light-Dark box per topo, dove vengono condotte quattro sessioni comportamentali di 4 topi simultaneamente.

Test di "Open Field"

Il topo viene messo in una vasca detta "arena" di dimensioni 50x50 cm di colore nero; in questo modo viene facilmente rilevato dalle telecamere e seguito nel suo percorso di esplorazione. Il topo è libero di muoversi incondizionatamente per cui la distanza percorsa in 10 minuti è indice della sua motilità (aumenta nella iper-eccitazione e diminuisce nella sedazione). Solitamente, se l'animale segue il perimetro dell'arena, senza andare nel centro, manifesta uno stato psicologico per cui non si sente al sicuro ed è considerato in stato ansioso o fobico (indice di "tigmotassi"); se, al contrario, comincia l'esplorazione al centro dell'arena, è in stato di normalità e non si sente più "preda". (26).

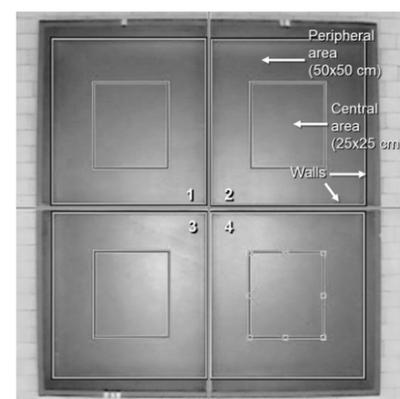


Figura 2. Apparato di Open Field test per topo, dove vengono condotte quattro sessioni comportamentali di 4 topi simultaneamente. Nel disegno l'area centrale è da considerarsi come area virtuale tracciata dal software.

Sono stati effettuati anche altri tipi di elaborazione (valutazione del tempo di stazionamento, delle deiezioni, della direzione del movimento, ecc) e altri test, come il "Plus Maze", che consente di verificare, attraverso due diramazioni di un labirinto, se l'animale è tranquillo o ansioso, a seconda della strada che decide di percorrere all'interno del labirinto a

forma di croce – e quello di "Social Interaction", che consente di valutare il numero di contatti tra animali. Tali test qui non sono trattati sia per brevità sia perché – allo stato attuale delle analisi dei risultati (una procedura molto complessa dato l'alto numero dei casi) - non hanno dato risultati particolarmente significativi o diversi da quelli dei parametri di comportamento qui riportati.

Video tracking

Tutte le sessioni sperimentali vengono registrate con videocamera (GZ-MG135, JVC, Japan) e i files generati sono successivamente masterizzati su supporti rigidi DVD. Un software "Smart" VTS system della PanLab di Barcellona è poi utilizzato per tracciare il percorso del movimento registrato dell'animale durante le sedute sperimentali e viene calcolato il tempo trascorso e lo spazio percorso in diverse zone dell'apparato sperimentale su computer (figura 3 a e 3 b).

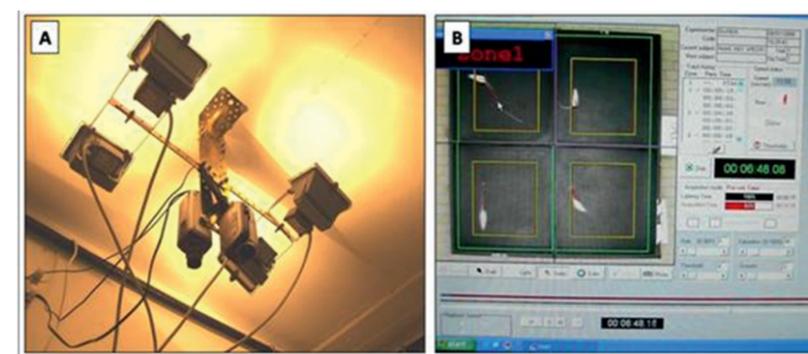


Figura 3. Sistema di illuminazione e videoregistrazione (A) e analisi dei tracciati (B)

Statistiche

I dati delle prove sono stati analizzati mediante test per analisi della varianza (ANOVA SPSS, versione 11 per Windows, Chicago, IL). Dopo tale test sono state eseguite le correzioni per regolare i confronti multipli assumendo pari varianze con il test della Least Significant Difference (LSD).

RISULTATI

Preliminarmente sono stati valutati gli effetti di alcuni rimedi omeopatici scelti all'interno delle Materie Mediche per sindromi caratterizzate da sintomatologia ansiosa: *Aconitum*, *Belladonna*, *Gelsemium s.*, *Nux Vomica*, *Argentum nitricum* e *Tabacum* (figura 4). Avendo a disposizione, per ragioni tecniche, la possibilità di effettuare lo screening su una sola diluizione/dinamizzazione, si è scelta la 5CH perché è sufficientemente alta da eliminare ogni dubbio sulla tossicità e sufficientemente bassa da contenere almeno qualche molecola del principio attivo iniziale. Quest'ultimo criterio è stato adottato soprattutto perché la pianificazione dei nostri esperimenti è stata effettuata in stretta collaborazione con degli esperti in studi sperimentali di comportamento animale ed è stato necessario trovare un "compromesso" tra due diverse vedute della farmacologia.

dalla farmacologia, di somministrazione per via orale di una quantità precisa, il cosiddetto "gavage" (che consiste nella somministrazione mediante un sondino nello stomaco), ma esso oltre ad essere indaginoso e più stressante per l'animale, non avrebbe comunque rispettato le normali vie di somministrazione del rimedio omeopatico. Ciascun rimedio è stato testato su 12 topi. Tale screening iniziale ha dato i risultati mostrati in figura 4 e che possono essere così sintetizzati:

Nel test del Light-Dark il tempo trascorso nello spazio illuminato è aumentato nel gruppo di topi trattati con il farmaco allopatico Diazepam. Dei 6 rimedi testati solo *Gelsemium s.*, *Aconitum* e in misura minore *Argentum Nitricum* hanno mostrato un effetto ansiolitico. Il numero di transizioni tra i due compartimenti del Light-Dark test è aumentato con il Diazepam ed il *Gelsemium s.* ma non con altri rimedi omeopatici.

Nel test di Open Field, *Gelsemium s.*, *Tabacum* ed in misura minore *Argentum Nitricum* hanno mostrato effetto stimolante sul tempo trascorso nel centro dell'arena, e ciò indicherebbe un effetto ansiolitico con aumento della tendenza all'esplorazione e una diminuzione della thigmotaxis. Si è notato solo con il *Gelsemium s.*, un aumento della distanza percorsa nel centro del test di Open Field. Il Diazepam in questo test si è rilevato inefficace probabilmente perché avrebbe generato un effetto sedativo sulla locomozione con conseguente diminuzione dello spazio percorso nel centro.

Questa prima fase ci ha permesso di identificare il *Gelsemium s.* come il medicinale più promettente, in quanto l'unico attivo su tutti i parametri considerati. I risultati del primo screening sui diversi rimedi omeopatici sono stati riportati per la prima volta al 63rd LHMI World Congress delle Evidence Based Homeopathy che si è tenuto a Oostende in Belgio nel maggio 2008 (7).

A causa della variabilità dei soggetti (anche i topi hanno una loro "individualità" di carattere) per raggiungere una significatività statistica è stato necessario effettuare in seguito molti esperimenti, ciascuno con una notevole numerosità di topi, da cui è emerso che effettivamente il *Gelsemium s.* ha un effetto ansiolitico. Va sottolineato che ciascun esperimento necessita di circa un mese di lavoro tra allevamento degli animali, trattamenti, sessioni di test e analisi dei dati. Sono state condotte due serie complete di sperimentazione di varie diluizioni di *Gelsemium s.*, con piccole modifiche e adattamenti di metodo: nella prima

serie il test di Light-Dark che è stato eseguito il giorno prima dell'Open Field test sugli animali provenienti dalla Harlan Laboratories, che sono stati ospitati 4 per gabbia; nella seconda serie di studi, invece, il test LD effettuato il giorno dopo il test di Open Field su animali provenienti da Charles River Laboratories, che sono stati stabulati 2 per gabbia. Nella prima serie si è valutato sistematicamente l'effetto del *Gelsemium s.* 5CH (8 esperimenti) rispetto al Diazepam. Questi studi hanno dimostrato, con valutazioni statistiche accurate, che *Gelsemium s.* 5CH migliora alcuni indici comportamentali di ansietà nel topo, so-

prattutto nell'Open Field (figura 5), mentre nel Light-Dark test l'effetto era piccolo e non significativo. In modo altrettanto inatteso, nell'Open Field, il Diazepam non ha avuto alcun effetto. I risultati di questa prima sperimentazione sistematica sono stati inviati a riviste di farmacologia come "European Journal of Pharmacology", "Journal of Ethnopharmacology" e "Pharmacological Research" (quest'ultimo l'organo ufficiale della Società Italiana di Farmacologia). Tutte queste riviste hanno rifiutato di considerarlo per la pubblicazione senza apprezzabili motivi, vale a dire senza nemmeno inviarlo ai referees. A una nostra motivata richiesta di spie-

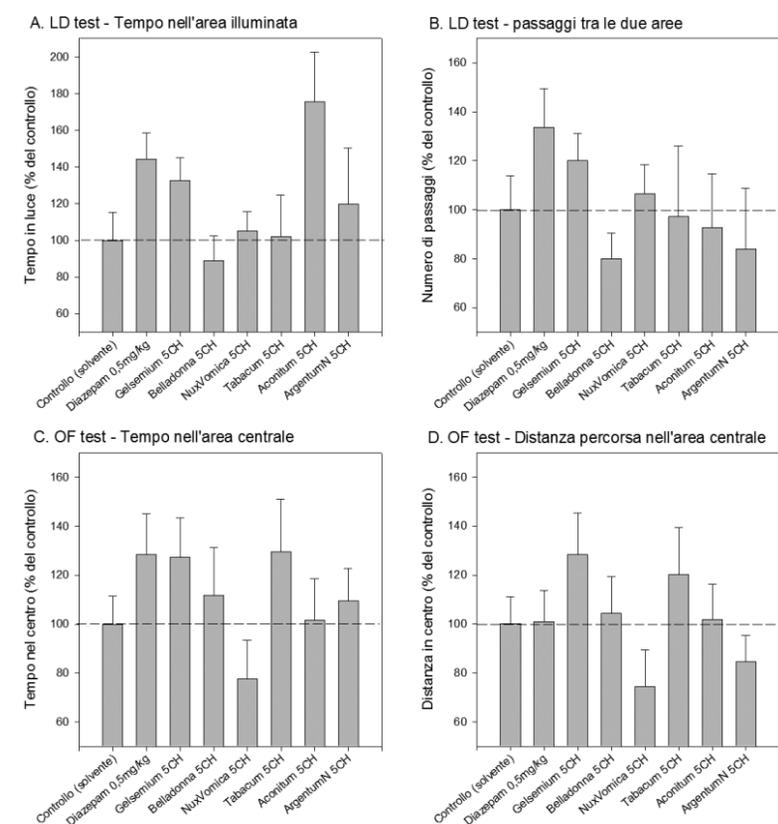


Figura 4. Effetto di diversi rimedi omeopatici e del Diazepam su diversi parametri comportamentali nel test di screening. In questa figura il controllo è posto come 100 % di attività e i medicinali sono paragonati con la media dei controlli di ciascun esperimento.

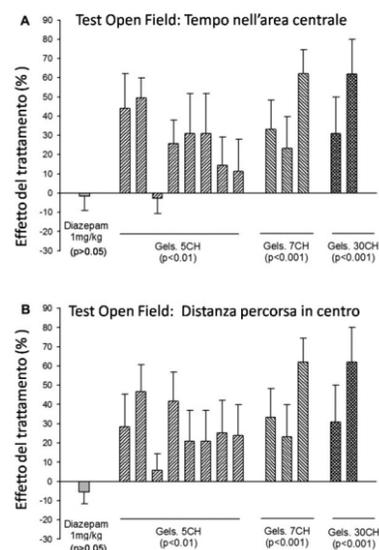


Figura 5. Effetti di *Gelsemium s.* 5CH, 7CH e 30CH sui due principali parametri comportamentali nel Test Open Field. I dati sono espressi come effetto percentuale rispetto al valore dei controlli posto uguale a zero. Si riportano la media di 5 prove con il Diazepam (N = 69 topi raggruppati in 4 per gabbia), 8 esperimenti con il *Gelsemium s.* 5CH (totale n = 118), 3 esperimenti con *Gelsemium s.* 7CH (N = 47) e 2 esperimenti con *Gelsemium s.* 30CH (N = 32). I valori di P sono derivati da analisi ANOVA globale per tutti i topi trattati con un certo medicinale e confrontati con i valori medi dei topi di controllo dello stesso esperimento, seguita da test LSD. (9)

gazioni l'Editore di Pharmacological Research non ha dato risposta. Abbiamo quindi inviato il lavoro alla rivista Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, una rivista di medicina complementare molto qualificata e indicizzata nelle banche dati internazionali con Impact Factor. Finalmente il lavoro ha ricevuto una considerazione e la risposta comprendeva molte richieste di modifica, che sono state effettuate, tra cui fornire qualche risultato di altre diluizioni. Pertanto si sono effettuati alcuni esperimenti supplementari con la diluizione/dinamizzazione 7CH e 30CH (figura 5) e il lavoro è stato accettato per la pubblicazione (ora è disponibile online in

advance access). Anche queste diluizioni/dinamizzazioni hanno dato risultati positivi nell'Open Field e nel Light Dark test, ma in quest'ultimo caso non ancora statisticamente significativi. A seguito di questa prima serie di studi restavano aperte tre questioni, la prima era la mancanza di significatività nel Light-Dark test, che è uno dei più usati nella farmacologia sperimentale, la seconda la questione delle diluizioni/dinamizzazioni, affrontata solo in modo preliminare e non sistematico nel lavoro precedente, la terza il mancato effetto del Diazepam nell'Open-Field. Si è deciso di effettuare una serie di test con un maggior numero di di-

luizioni/dinamizzazioni e in condizioni ancor più standardizzate. Sono stati fatti 6 esperimenti, ciascuno con gruppi di 8 topi (quindi un totale di 48 topi per gruppo di trattamento) e inserendo ben due gruppi di controllo, entrambi trattati con il solvente (acqua con 0,3% di etanolo, sottoposta a dinamizzazione). L'inserimento di due gruppi di controllo serve a valutare la variabilità tra due gruppi teoricamente identici e a stabilire meglio l'intervallo di "normalità" da cui eventualmente si discostano i gruppi trattati. Al posto del Diazepam si è utilizzato il Buspirone (alle dosi comunemente impiegate nel topo in questo tipo di test), che secondo alcuni autori sarebbe più indicato per i trattamenti cronici non dando assuefazione. I principali risultati sono riportati in figura 6. In questi esperimenti si è sostanzialmente ripetuta la prova di un effetto positivo del *Gelsemium s.*, con la differenza che i risultati sono stati molto più netti col test Light-Dark. Innanzitutto si è eseguito il test Open-Field in cui si è misurata la distanza totale percorsa (Figura 6, pannello A): il *Gelse-*

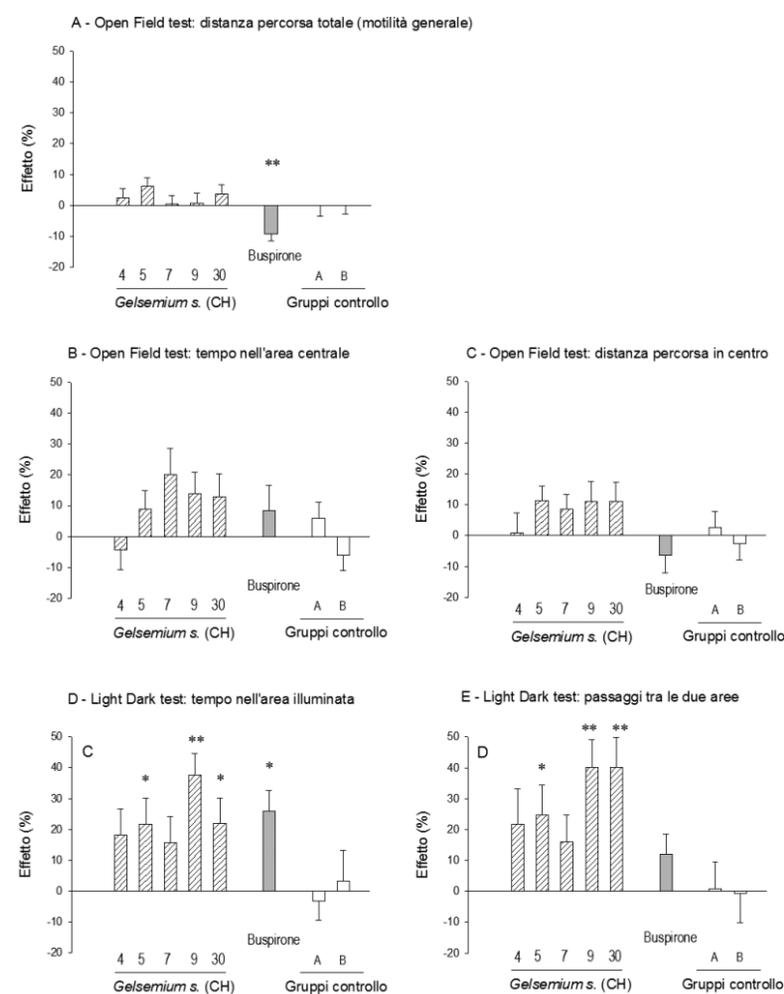


Figura 6. Effetti di *Gelsemium s.* in diverse diluizioni/dinamizzazioni: 4CH, 5CH, 7CH, 9CH e 30CH sui parametri di Open Field e di Light Dark della seconda serie di esperimenti (con 2 topi per gabbia, da allevamenti Charles River; eseguito prima OF test, poi LD test). I dati provenienti da 6 esperimenti con Buspirone e le varie diluizioni omeopatiche e il solvente (gruppi controllo) (N = 48 topi) sono stati raggruppati e sono riportati i valori medi ± errore standard. In ogni esperimento i valori per ciascun topo trattato sono calcolati come la percentuale di effetto rispetto ai valori medi di topi di controllo dello stesso esperimento. I valori di P (*<0.05, **<0.01) sono derivati da analisi ANOVA globale per tutti i topi trattati con un certo medicinale e confrontati con i valori medi dei topi di controllo dello stesso esperimento, seguita da test LSD.

mium s. non ha modificato tale parametro (c'è stato solo un leggero aumento di motilità con la 5CH e la 30CH, ma non significativo), mentre il Buspirone ha ridotto la distanza totale percorsa, mostrando quindi un effetto sedativo. Nel test OF (tempo nell'area centrale, pannello B) il *Gelsemium s.*, in tutte le diluizioni/dinamizzazioni tranne la 4CH, ha aumentato il tempo di permanenza centrale, in accordo con i dati degli studi precedenti. Tuttavia, a causa delle alte varianze tra i dati, i valori di ANOVA globali non erano statisticamente significativi, pur essendo molto vicini alla significatività ($p=0,060$), per cui non è stato possibile effettuare il test "Post hoc" LSD. I parametri evidenziati nei test ANOVA globali sul Light-Dark erano invece altamente significativi ($P=0.002$ e $P=0.001$ nei dati del pannello D e E rispettivamente) e si è avuta una significatività dell'effetto del *Gelsemium s.* alta nella diluizione/dinamizzazione 5CH e altissima nelle diluizioni/dinamizzazioni 9CH e 30 CH. Anche le altre diluizioni/dinamizzazioni hanno avuto effetto positivo, ma a causa delle variabilità sperimentale la significatività statistica non si è raggiunta. È interessante notare che anche nel Light-Dark test (Permanenza nell'area aperta, pannello D) il buspirone ha mostrato l'effetto ansiolitico che ci si attendeva, mentre nella distanza percorsa (pannello E) ha evidenziato poca risposta, probabilmente per il sovrapporsi dell'effetto di tipo sedativo a quello ansiolitico. Questo accurato studio dose-risposta è stato sottoposto successivamente alle riviste "Pharmacological Biochemistry and Behavior" e "Behavioral and Brain Functions", entrambe le quali hanno risposto di non considerarlo neppure perché avevano altre priorità e suggerito di inviarlo a riviste "più specialistiche". Ciò indica nettamente una propensione a non considerare

l'omeopatia nell'area della farmacologia. La prestigiosa rivista "Psychopharmacology" inizialmente aveva rifiutato il lavoro adducendo varie motivazioni tecniche più il fatto che secondo un revisore "non si tratta di psicofarmacologia" (sigh!). Tuttavia, a seguito di nostra contro-deduzione alle osservazioni dei revisori ha accettato di riconsiderarlo ed infine, dopo un ulteriore accurato processo di revisione, di pubblicarlo (20 aprile 2010) (8).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro abbiamo riportato gli elementi di prova per l'efficacia di alcuni rimedi omeopatici nel controllo dei sintomi di ansia negli animali. Anche se l'ansia negli animali da esperimento, in un ambiente particolare, si differenzia chiaramente da ansia nell'uomo, rimane vero che alcuni modelli di comportamento (paura, fuga, neofobia, agorafobia, tendenza a camminare lungo i muri, ecc) sono ancestrali e hanno una base neurobiologica comune nell'uomo e negli animali. In realtà, questi modelli sono stati utilizzati fin dall'inizio, negli studi preclinici di tutti i farmaci ansiolitici, e si sono dimostrati validi e predittivi. Specialmente quando si usano più test contemporaneamente, in situazioni che non comportano condizionamento con stress eccessivo e artificiale, è possibile delineare un profilo di attività che riflette lo stato emotivo dell'animale e può essere valutato oggettivamente. I disturbi di ansia sono tra i disturbi psichiatrici più frequenti con una prevalenza addirittura superiore ai disturbi dell'umore (1, 27, 28). Essi sono associati a rischio suicidario, soprattutto se concomitanti al disturbo depressivo maggiore (28), aumentato rischio per patologia cardiovascolare (27), significativa disabi-

lità e compromessa qualità di vita (29), significativo carico economico a livello globale (1). I tranquillanti più noti o ansiolitici sono quelli della famiglia delle benzodiazepine, che agiscono modulando i recettori GABAergici, ma molti altri sono conosciuti, compresi i farmaci buspirone e gli altri appartenenti alla classe di composti azaspirodecanedione, che agiscono come agonisti dei recettori serotoninergici (5-HT_{1A}). Tuttavia, l'uso clinico di questi farmaci non è privo di inconvenienti, soprattutto a causa del rischio di effetti collaterali quali alterazioni psicomotorie o di potenziamento di altri farmaci depressori centrali (30,31). Per di più, il 25% dei pazienti con disturbi d'ansia non risponde sufficientemente al trattamento di prima linea (32). Le benzodiazepine non sono raccomandate per il trattamento a lungo termine dei disturbi d'ansia generalizzato, a causa dello sviluppo associato di tolleranza, turbe cognitive e cambiamenti della memoria, dipendenza fisica, e la reazione di ritiro con la sospensione (33). I rimedi naturali che hanno la stessa efficacia dei farmaci convenzionali, ma con minori effetti collaterali, sarebbero dunque una preziosa aggiunta alle opzioni di trattamento per i disturbi d'ansia-correlati. Tuttavia l'accettazione di rimedi alternativi è stata finora ostacolata dalla scarsità di studi farmacologici chiarire le loro indicazioni, dei limiti e meccanismi di azione (5,35). *Gelsemium s.* è una bella pianta rampicante dell'America del Nord, appartenente alla famiglia Loganiaceae, introdotto in Europa nel '600, usato prevalentemente come pianta ornamentale per i magnifici fiori gialli imbutiformi, che festonano ancora oggi gli alberi della Virginia e della Florida. Appartiene alla stessa famiglia del curaro, dell'*Ignatia Amara*, della *NuxVomica* e della *Spigelia antelmintica*. Tutte le parti di questa pianta contengono alcaloidi tossici connessi con la stricnina come la gelseminina e la sempervirina (36). La

tintura madre viene preparata dalla corteccia dei rizomi e dalle radici fresche e contiene alcaloidi di cui due, la gelseminina e la gelsemicina, sono altamente tossici e deprimono i motoneuroni (37). Nella tradizionale Materia Medica, *Gelsemium s.* (*Gelsemium s.*) viene descritto come un rimedio per una varietà di sintomi psicologici e comportamentali simil-ansiosi (38-40), tuttavia indizi concordanti della sua efficacia sono carenti. La Gelseminina è stata identificata come il principale marcatore urinario di esposizione a *Gelsemium s.* (41) I segni neurologici caratterizzati da marcata progressiva debolezza e convulsioni che si conclude con la morte sono stati osservati nelle capre dopo l'ingestione di *Gelsemium s.* e conseguente tossicosi (42), il nettare è tossico per le api (43). Nella letteratura fitoterapica, *Gelsemium s.* è stato riportato avere proprietà sedative, analgesiche e anticonvulsivanti, anche se le dosi efficaci non sono chiare (44-46). Inoltre va notato che quest'ultimo effetto protettivo (46) contro le convulsioni era stato ottenuto utilizzando un estratto miscelato con *Laterniflora Scutellaria* e *Datura Stramonium*. Attraverso tali test comportamentali si sono raggiunte solide evidenze statistiche che dimostrano l'efficacia di *Gelsemium s.* alle diverse diluizioni di 5CH, 7CH e 30CH, ma soprattutto alla 9CH; gli effetti del medicinale concernono soprattutto avversione a spazio aperto, tendenza a camminare lungo i muri, paura della luce e miglioramento dei sintomi col movimento. Il fatto che *Gelsemium s.* sia più attivo nel test di OF in determinate condizioni, ma più attivo nella prova LD in altre condizioni forse dipende dal modo in cui vengono manipolati gli animali, o allevati, o le loro precedenti esperienze con i test che potrebbero creare un diverso stato di ansietà dovuto alla aspettativa. Nel nostro lavoro abbiamo riscontrato un effetto benefico del *Gelsemium s.* su alcuni sintomi che nell'animale riflettono l'ansietà e la paura. Estrapo-

lando tali risultati all'uomo, potremmo tentare un raffronto con alcuni sintomi e modalità riportati dalla materia medica del *Gelsemium* quali ad esempio: MIND - ANXIETY - walking - air, in open - amel.; MIND - ANXIETY - walking - amel.; MIND - WALKING - air; in the open - amel.; GENERALS - WALKING - air; in open - amel.; GENERALS - WALKING - rapidly - amel.; GENERALS - WALKING - slowly - amel.; MIND: FEELING AS IN DANGER OF FALLING; MIND: DREAD/DESIRE OF BEING ALONE; MIND: IMPATIENT AND IRRITABLE; MIND: NERVOUS DREAD OF APPEARING IN PUBLIC. Logicamente, si tratta solo di una analogia ma molto suggestiva di una azione anche sull'espressione di sintomi comportamentali e mentali anche nel sistema animale di laboratorio. I meccanismi di azione di *Gelsemium s.* a livello cellulare potrebbero coinvolgere il sistema limbico e il midollo spinale, a livello dei centri di controllo del dolore e dell'ansia. In effetti, è stato osservato che la gelseminina, il principale componente del *Gelsemium s.*, stimola la biosintesi del neurosteroido 3 alfa, 5 alfa tetraidroprogesterone (THP) attraverso l'attivazione dei recettori per la glicina (Gly-R) (47-49). Il THP, chiamato anche allopregnanolone, agisce sui siti allosterici situati sul recettore A dell'acido gamma-amminobutirrico di tipo A (GABA_A), lo stesso su cui agisce il diazepam, ma su un sito diverso. Lo stesso gruppo ha studiato gli effetti di *Gelsemium s.* e della gelseminina in una serie di diluizioni omeopatiche (5, 9, 15CH) e ha dimostrato che le diluizioni 5CH e 9CH stimolano la sintesi di 3alfa, 5alfa-THP sia nell'ippocampo sia nel midollo spinale in vitro. Un fatto particolarmente interessante è che gli effetti del rimedio omeopatico in vitro sono stati bloccati dalla stricnina, un inibitore selettivo glicinergico ben conosciuto. Pertanto gli effetti in vitro del *Gelsemium s.* e della gelseminina concordano con pos-

sibili utilizzi nei disturbi del sistema nervoso accompagnati a sintomi di ansia, fobia sociale, e potenzialmente anche a malattie psichiatriche ed encefalopatie. La Gelseminina era presente nella tintura madre delle potenze utilizzate nella nostra indagine alla concentrazione di 6.5×10^{-4} moli /l. Dal momento che ogni passaggio di diluizione comporta una diminuzione 100 volte nella concentrazione, la concentrazione teorica di gelseminina alle diluizioni 5CH, 7CH, 9CH e 30CH era rispettivamente 6.5×10^{-14} , 6.5×10^{-18} , 6.5×10^{-22} e 6.5×10^{-64} moli /l. Così, i nostri risultati, ottenuti pienamente randomizzati, in condizioni controllate e di doppio cieco, confermano e rafforzano le osservazioni - che emergono da vari campi di ricerca - che composti biologicamente attivi possano effettivamente avere effetti di alta diluizione che imitano quelli di minore diluizione (a dosi più alte): in omeopatia non esiste una linearità o una proporzionalità tra la concentrazione molecolare di principi attivi e gli effetti biologici (50-56). Riteniamo che la nostra pubblicazione sia stata la migliore risposta alla incauta dichiarazione di una associazione di medici britannici - ampiamente ripresa dai nostri organi di stampa - secondo i quali l'omeopatia sarebbe "stregoneria"! Di solito in ambito omeopatico per la cura del mentale, più si aumenta la diluizione, più si dovrebbe risultare evidente un effetto nel paziente se il rimedio è quello giusto; nella sperimentazione riguardante modelli murini di ansia è risultato che la diluizione 9CH prevale come effetto sulle altre e questo ci induce a supporre che il creare un effetto significativo utilizzando rimedi omeopatici a livello mentale non sia sempre l'utilizzo di un'alta diluizione, ma ben determinati meccanismi probabilmente legati a forze elettromagnetiche, dove il grado di trasferimento di un'informazione tra ed entro le cellule dipenderebbe dalla "Coerenza" del segnale e dal grado di "Riso-

nanza” tra le cellule (57). Naturalmente, queste conclusioni sono limitate dal fatto che per ragioni tecniche non abbiamo potuto esplorare diluizioni/dinamizzazioni più alte e dal fatto che la terapia è stata indirizzata ad una specie animale e certamente non si può sostenere di aver utilizzato il rimedio “simillimum” per l’animale ma solo un rimedio “simile” a uno o pochi sintomi. Va comunque segnalato un altro aspetto importante della nostra ricerca: in modo maggiore o minore tutte le diluizioni/dinamizzazioni testate (ad eccezione forse della 4 CH) hanno mostrato una significativa attività e nella stessa direzione ansiolitica; estrapolando questo risultato all’utilizzo clinico, si potrebbe suggerire che, una volta individuato il rimedio “simile”, un eventuale “errore” nella scelta della diluizione/dinamizzazione ottimale comporterebbe comunque una attività farmacologica nelle direzioni desiderate.

Il fatto che *Gelsemium s.* (o qualche altro rimedio, come *Ignatia* e le altre menzionate in questa recensione), abbia un’azione dimostrabile su alcuni dei meccanismi neurobiologici che controllano l’ansia, non significa che sia indicato in tutti i disturbi del comportamento associati a questi tipi di sintomi. Questo avvertimento è fondato sulle stesse scoperte sperimentali che mostrano la variabilità delle risposte degli animali a seconda del test impiegato e altri dettagli che distinguono i diversi approcci sperimentali. Se queste considerazioni sono estrapolate per l’uomo, dobbiamo concludere che *Gelsemium s.* - anche in diluizioni molto elevate - può funzionare, ma il “tipo sensibile” deve essere selezionato sulla base di una esperienza molto approfondita e accurata discriminazione dei sintomi diversi e della storia individuale. L’omeopatia classica, così come la maggior parte di altri approcci alternativi, sottolinea una visione olistica della malattia in cui il giudizio individuale e il trattamento sono importanti. Questo implica che un rimedio omeopatico deve essere scelto prendendo in

considerazione l’organismo nel suo complesso, compresi la personalità e il comportamento, e non soltanto i sintomi nel sistema dell’organo colpito. Di conseguenza, un approccio riduzionista sperimentale può essere valido per gli avanzamenti scientifici che esso consente, ma non fornisce una “prova” o una “confutazione” dell’omeopatia stessa come metodo clinico.

Le nostre ricerche attualmente proseguono con l’analisi degli effetti di *Ignatia amara* e di *Aconitum Napellus* sugli stessi modelli sperimentali e sarà molto interessante vedere analogie e differenze tra questi rimedi. In conclusione, è oggi possibile sostenere che un medicinale omeopatico, tradizionalmente usato nell’uomo, è provato anche efficacemente nell’animale, dove è stato anche identificato un possibile meccanismo d’azione a livello centrale. Sono necessari ulteriori progressi per ampliare le attuali conoscenze sulla fisiologia dell’ansia, sui diversi possibili rimedi omeopatici e sui meccanismi recettoriali implicati nella loro azione.

Ringraziamenti

Le ricerche sono state eseguite grazie ad un accordo di collaborazione scientifica tra Università di Verona e Laboratoires Boiron. I ricercatori sono privi di conflitti di interesse e l’oggetto dell’indagine non è coperto da brevetti. Si ringraziano Silvia Nencioni, Naoual Boujedaini e Luigi Marrari per i consigli e la collaborazione nella scelta e preparazione dei medicinali.

BIBLIOGRAFIA

1. GREENBERG P.E., SISITSKY, KESSLER R.C., ET AL. *The economic burden of anxiety disorders in the 1990s.* J. Clin. Psychiatry 1999, 60, 427-35
2. CROSS C., HEN R. *The developmental origins of anxiety.* Nature Rev. Neurosci. 2004, 5, 545-552.
3. SAINÉ A. *Il metodo omeopatico e la sua applicazione nel trattamento del paziente psichiatrico.* Salus Infirmerum Snc, Padova, 2003, 4, 331-333.
4. HAHNEMANN S., *Organon*, 5 Ed. 1842, Par 56-58.

5. PILKINGTON K., KIRKWOOD G., RAMPES H., FISHER P., RICHARDSON J., *Homeopathy for anxiety and anxiety disorders: a systematic review of the research.* Homeopathy 2006, 95, 151-162.
6. BELLAVITE P., MAGNANI P., MARZOTTO M., CONFORTI A., *Assays of homeopathic remedies in rodent behavioural and psychopathological models.* Homeopathy 2009, 98, 208-227.
7. MAGNANI P., CONFORTI A., BELLAVITE P. *Effects of homeopathic drugs on the anxiety-like behaviour in mice.* In: Van Wassenhoven M (ed). Proceedings of 63rd World Congress of the Liga Medicorum Homeopathica Internationalis. Ostend: LMHI Edition, 2008.
8. MAGNANI P., CONFORTI A., ZANOLIN E., MARZOTTO M., BELLAVITE P., *Dose-effect study of Gelsemium sempervirens in high dilutions on anxiety-related responses in mice.* Psychopharmacol. 2010, 210, 533-545.
9. BELLAVITE P., P MAGNANI P., ZANOLIN, AND CONFORTI A., *Homeopathic doses of Gelsemium sempervirens improve the behavior of mice in response to novel environments ECAM J.*, 2009, DOI:10.1093/ecam/nep139.
10. TETAU J., TETAU M., *Pharmacologie et psychopharmacologie de Thuya.* Ann. Homéop. Fr. 1960, 2, 669-678.
11. JULIAN O.A., LAUNAY J. *Psycho-pathological test on animals by reserpine and Cicuta virosa, according to the homeopathic laws of analogy and identity.* J. Am. Inst. Homeopath. 1966, 59, 155-164.
12. BINSARD A. M., *Étude psycho-pharmacologique de dilutions homéopathiques d’Ignatia.* Ann. Homéop. Fr. 1978, 20, 313-321.
13. BINSARD A. M., *Étude psycho-pharmacologique d’Ignatia et rapprochement avec un autre polychreste.* Ann. Homéop. Fr. 1979, 21, 369-378.
14. BINSARD A. M., GUILLEMAIN J., PLATEL A., ET AL., *Étude psycho-pharmacologique de dilutions homéopathiques de Gelsemium s. et d’Ignatia.* Ann. Homéop. Fr. 1980, 22, 35-50.
15. GUILLEMAIN J., HUGUET F., BINSARD A. M., TETAU M., NARCISSE G., *Action anti-convulsivante expérimentale de dilutions d’Ignatia chez la souris.* Ann. Homéop. Fr., 1981, 23, 35-41.
16. GUILLEMAIN J., ROUSSEAU A., DORFMAN P., TETAU M., *Recherche en psychopharmacologie.* Cah. Biother., 1989, 103, 53-66.
17. VAN REE JAN M. E DE WIED D. *Approccio comportamentale allo studio del cervello di ratto.* Discuss. Neurosci., 1990, Volume V, N°1: 12.
18. BOURIN M., PETIT-DEMOULIERE B., DHONNCHADHA-B.N., HASCOET M., *Animal models of anxiety in mice.* Fundam. Clin. Pharmacol. 2007, 21 (6), 567-574.
19. SHEPPERD J. *Chaos theory: Implications for homeopathy.* J. Am. Inst. Homeopath. 1994, 87, 22-29.
20. TORRES J.L., RUIZ G. *Stochastic resonance and the homeopathic effect.* Brit. Hom. J., 1996, 85, 134-140.
21. BELL I. R., BALDWIN C. M., SCHWARTZ G. E. *Translating a nonlinear systems theory model for homeopathy into empirical tests.* Altern. Ther. Health Med., 2002, 8, 58-66.
22. BELLAVITE P., *Complexity science and homeopathy. A synthetic overview.* Homeopathy 2003, 92, 203-212.
23. BELLAVITE P., *Biodinamica, malattia e similitudine.*

Parte prima: la forza vitale (omeo-dinamica dei sistemi complessi). Il Medico Omeopata, 2004, 25, 34-42.

24. BELLAVITE P., SIGNORINI A., *The Emerging Science of Homeopathy.* North Atlantic, Berkeley (CA) 2002.
25. GRIEBEL G., BELZUNG C., MISSLIN R., VOGEL E., *The free exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia reducing drugs.* Behav. Pharmacol. 1993; 4, 637-644.
26. SIMON P., DUPUIS R., COSTENTIN J., *Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions.* Behav. Brain Res. 1994, 61, 59-64
27. ALBERT C.M., CHAE C.U., REXRODE K.M., MANSON J.E., KAWACHI I., *Phobic anxiety and risk of coronary heart disease and sudden cardiac death among women.* Circulation 2005, 111, 4, 480-87
28. SAREEN J. COX B.J., AFIFTO, ET AL. *Anxiety disorders and risk for suicidal ideation and suicide attempts: a population-based longitudinal study of adults.* Arch. Gen. Psychiatry 2005, 62, 11, 1249-57.,
29. MENDLOWICZ M.V.; STEIN M.B. *Quality of life in individuals with anxiety disorders.* Am. J. Psychiatry 2000, 157, 5, 669-82
30. LADER M. *Effectiveness of benzodiazepines: do they work or not?* Expert Rev. Neurother. 2008, 8:1189-1191.
31. CLOOS J. M., FERREIRA, V. *Current use of benzodiazepines in anxiety disorders.* Curt. Opin. Psychiatry 2009, 22, 90-95.
32. SCHOSSER A., KASPER S., *The role of pharmacogenetics in the treatment of depression and anxiety disorders.* Int. Clin. Psychopharmacol., 2009, 24, 277-288.
33. ALLGULANDER C., BANDELOW B., HOLLANDER E., ET AL., *WCA recommendations for the long-term treatment of generalized anxiety disorder.* CNS. Spectr., 2003, 8, 53-61.
34. MAJTANI R., CIMINO A., *A primer of complementary and alternative medicine and its relevance in the treatment of mental health problems.* Psychiatr Q, 2002, 73, 367-381.
35. PILKINGTON K., RAMPES H., RICHARDSON J. *Complementary medicine for depression.* Expert Rev. Neurother., 2006, 6, 1741-1751

36. SCHUNY., CORDELL G. A. *Cytotoxic steroids of Gelsemium sempervirens.* J. Nat. Prod., 1987, 50, 195-198
37. DUJANY R., *Materia Medica Omeopatica*, Cortina Editore, 1988.
38. BOERICKE W., *Materia medica with repertory*, 9th edn. Boericke & Tafel, Inc, Santa Rosa, 1927.
39. BARBANCEY J. *Pratique Homéopathique en psychopathologie*, Tome II. Editions Similia, Paris, 1987.
40. GUERMONPREZ, M. *Homéopathie, Principes-Clinique-Techniques.* CEDH, Paris, 2000.
41. LAI C.K., CHAN Y.W. *Confirmation of Gelsemium s. poisoning by targeted analysis of toxic Gelsemium s. alkaloids in urine.* J. Anal. Toxicol., 2009, 33:56-61.
42. THOMPSON L.J., FRAZIER K., STIVER S., STYER E., *Multiple animal intoxications associated with Carolina jessamine (Gelsemium sempervirens) ingestions.* Vet. Hum. Toxicol., 2002, 44, 272-273.
43. IRWIN R.E., ADLER, L.S., *Correlations among traits associated with herbivore resistance and pollination: implications for pollination and nectar robbing in a distylous plant.* Am. J. Botany, 2006, 93, 64-72.
44. VALNET J., *Phytothérapie.* Maloine, Paris, 1992;
45. DEMARQUE D., JOUANNY J., POITTEVIN B., SAINT-JEAN Y., *Pharmacologie et matière médicale homéopathique*, 2nd edn. Boiron, C.E. DH, Lyon, France, 1995;
46. PEREDERY O., PERSINGER M. A., *Herbal treatment following postseizure induction in rat by lithium pilocarpine: Scutellaria lateriflora (Skullcap), Gelsemium sempervirens (Gelsemium s.) and Datura stramonium (Jimson Weed) may prevent development of spontaneous seizures.* Phytother. Res. 2004, 18, 700-705.
47. DI GIORGIO A., BERTOLINO M., *Nardini Razionale per gli interventi Farmacologici.* Facts News Views vol. 9 n°1, 2008, 15-19.
48. VENARD C., BOUJEDAINI N., BELON P., MENSAH-NYAGAN A.G., PATTE-MENSAH C. *Pharmacological modulators of the glycinergic system regulate allopregnanolone biosynthesis in the rat spinal cord.* In: Panzica GC, Gotti S (eds). Proceedings of the 4th International Meeting on Steroids

and Nervous System. Madrid: Trabajos del instituto Cajal, 2007, 262.

49. VENARD C., BOUJEDAINI N., BELON P., MENSAH-NYAGAN A.G., PATTE-MENSAH C., *Regulation of neurosteroid allopregnanolone biosynthesis in the rat spinal cord by glycine and the alkaloidal analogs strychnine and gelsemine.* Neurosci. 2008, 153, 154-161
50. RUIZ-VEGA G., ESTEVEZ-DELGADO G. *Non-linearity modeling of ultra-dilutions: the histamine disturbances case.* In: Bonamin L.V., ed. Signals and Images. Contributions and contradictions about high dilution research., Springer Science, Dordrecht, 2008, 67-82.
51. WITT C.M., BLUTH M., ALBRECHT H., ET AL. *The in vitro evidence for an effect of high homeopathic potencies—a systematic review of the literature.* Complement. Ther. Med. 2007, 15, 128-138.
52. BROWN V., ENNIS M. *Flow-cytometric analysis of basophil activation: inhibition by histamine at conventional and homeopathic concentrations.* Inflamm. Res. 2001, 50, 2, S47-S48.
53. BELON P., CUMPS J., ENNIS M., MANNAIONI P., ROBERFROID M., SAINTE-LAUDY J., WIEGANT F. *Histamine dilutions modulate basophil activation.* Inflamm. Res. 2004, 53, 181-188.
54. EIZAYAGA F.X., AGUEJOUF O., BELON P., DOUTREMEPUICH C., *Platelet aggregation in portal hypertension and its modification by ultra-low doses of aspirin.* Pathophysiol. Haemost. Thromb. 2005, 34, 29-34.
55. BELLAVITE P., CONFORTI A., PONTAROLLO F., ORTOLANI R., *Immunology and Homeopathy. 2. Cells of the Immune System and Inflammation.* ECAM J. 2006, 3, 13-24.
56. CHIRIMBOLO S., BRIZZI M., ORTOLANI R., VELLA A., BELLAVITE P. *Inhibition of CD203c membrane up-regulation in human basophils by high dilutions of histamine: a controlled replication study.* Inflamm. Res. 2009, 58, 755-764.
57. BELLAVITE P., *La Complessità in Medicina, Fondamenti di un approccio sistemico-dinamico alla salute, alla patologia e alle terapie integrate*, Tecniche Nuove, Milano, 2009.



FEDERAZIONE ITALIANA
ASSOCIAZIONI E MEDICI OMEOPATI

FIAMO

LA VOCE FORTE DELLA MEDICINA DOLCE

Iscriviti o rinnova la tua iscrizione per il 2010
Le quote di Iscrizione per il 2010 sono le seguenti:

• Soci ordinari* Medici/ Iscrizione FIAMO-LIGA	€ 120,00
• Soci ordinari* Veterinari/ Iscrizione FIAMO-LIGA	€ 90,00
• Soci aggregati** Iscrizione FIAMO	€ 60,00
• Allievi Scuole del Dipartimento Fiamo	€ 50,00
• Iscrizione ECH	€ 25,00

*Socio Ordinario: Medico Omeopata italiano o non, che opera e risiede in Italia.
**Socio Aggregato: studente di Medicina e Chirurgia e di Medicina Veterinaria nonchè Medico Chirurgo, Medico Veterinario e Farmacista che non eserciti l’Omeopatia.

MODALITÀ di PAGAMENTO

- **Bollettino postale:**
FIAMO sede Amm.va, via C. Beccaria, 22 05100 Terni
C/C/P 12334058
- **Bonifico Bancario:**
FIAMO – Banca delle Marche sede di Terni CIN-K
ABI 06055 – CAB 14400 – C/C/B 000 000 000 443
IBAN IT89 K 06055 14400 000 000 000 443 BIC: BAMAIT3A
con causale: Iscrizione Fiamo 2010

Info: Sede Amm.va FIAMO
via C. Beccaria, 22 – 05100 Terni – tel./fax 0744.429900
www.fiamo.it – omeopatia@fiamo.it

Abbonamento Il GRANULO:
• n° 100 copie per 3 numeri / 2010 € 90,00